

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

На правах рукописи

Мороз Наталья Владимировна

**ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ И
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ,
ИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
И ПРАКТИКА ПРИМЕНЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ОБОСТРЕНИЯ
ЭПИЗОТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ**

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора ветеринарных наук

Научный консультант:

доктор ветеринарных наук, доцент

Ирза В.Н.

Владимир – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	6
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1	Ньюкаслская болезнь	21
1.1.1	Общие сведения о болезни Ньюкасла	21
1.1.2	Профилактика и меры борьбы с болезнью Ньюкасла	27
1.1.3	Вакцины против ньюкаслской болезни	29
1.2	Высокопатогенный грипп птиц	54
1.2.1	Общие сведения о гриппе птиц	54
1.2.2	Профилактика и меры борьбы с гриппом птиц	64
1.2.3	Вакцины против гриппа птиц	82
1.3	Заключение по обзору литературы	104
2	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	114
2.1	МАТЕРИАЛЫ.....	114
2.1.1	Штаммы и изоляты	114
2.1.2	Экспериментальные животные.....	115
2.1.3	Куриные эмбрионы.....	116
2.1.4	Вакцины.....	116
2.1.5	Адьюванты	117
2.1.6	Оборудование.....	117
2.1.7	Реактивы и диагностические наборы.....	118
2.1.8	Растворы и питательные среды.....	118
2.2	МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	119
2.2.1	Культивирование вируса	119
2.2.2	Определение инфекционной активности (титра) вируса.....	120
2.2.3	Инаktivация вируса	120
2.2.4	Определение полноты инаktivации вирусов.....	121
2.2.5	Определение стерильности.....	122
2.2.6	Определение стабильности эмульсии	122
2.2.7	Определение кинематической вязкости	122

2.2.8	Определение безвредности вакцин	122
2.2.9	Оценка местной реакции на введение эмульсионной вакцины	123
2.2.10	Определение антигенной активности вакцин	123
2.2.11	Получение 1%-ной суспензии эритроцитов петуха.....	124
2.2.12	Определение гемагглютинирующей активности.....	125
2.2.13	Определение титра антител в сыворотках крови птиц в РТГА.....	125
2.2.14	Определение стабильности штамма при репродукции последовательными пассажами в КЭ.....	127
2.2.15	Определение индекса интрацеребральной патогенности для цыплят	127
2.2.16	Определение индекса внутривенной патогенности для цыплят	128
2.2.17	Оценка результатов контрольного заражения вакцинированных птиц	128
2.2.18	Оценка показателя PD ₅₀ для инаktivированных вакцин	129
2.2.19	Оценка иммунизирующей (прививной) дозы антигена в размерности ГАЕ	130
2.2.20	ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	130
2.2.21	Секвенирование.....	131
2.2.22	Статистическая обработка результатов экспериментов	131
3	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	132
3.1	Эпизоотологический анализ распространения вирусов болезни Ньюкасла и высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации	132
3.2	Вакцинопрофилактика болезни Ньюкасла	141
3.2.1	Определение эффективности вакцин против болезни Ньюкасла	141
3.2.1.1	Протективная активность вакцин против болезни Ньюкасла производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» в отношении актуальных вирусов VII генотипа	141
3.2.1.2	Сравнительная оценка протективной активности вакцин против ньюкаслской болезни разных производителей в отношении актуального вируса НБ субгенотипа VII L	150

3.2.1.3	Протективная активность схем комбинированной вакцинации против болезни Ньюкасла препаратами разных производителей в отношении вируса НБ субгенотипа VII L на бройлерах	165
3.2.2	Изучение иммунологических свойств инаktivированных вакцин против болезни Ньюкасла на основе антигенов вируса НБ генотипов II («Ла-Сота») и VII (VII L)	177
3.2.3	Разработка инаktivированных вакцин против НБ с вирусом субгенотипа VII L «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» и «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»	182
3.2.3.1	Депонирование производственного штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса болезни Ньюкасла субгенотипа VII L	182
3.2.3.2	Разработка ассоциированной вакцины против ньюкаслской болезни («Ла-Сота» и G7) и гриппа птиц (Y280 и G1) «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» инаktivированной эмульсионной	186
3.2.3.2.1	Доклинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни и гриппа птиц H9N2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»	186
3.2.3.2.2	Клинические испытания вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в производственных условиях...	203
3.2.3.3	Разработка полиштамменной вакцины против ньюкаслской болезни («Ла-Сота» и G7) «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» инаktivированной эмульсионной	207
3.2.3.3.1	Доклинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»	208
3.2.3.3.2	Клинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»	220
3.2.4	Разработка живой вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн»	222
3.2.4.1	Изучение иммуногенности штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ против изолятов ВНБ субгенотипа VII L.....	222
3.2.4.2	Депонирование штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни	228
3.2.4.3	Доклинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» живой сухой	232

3.2.4.4	Клинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» живой сухой	247
3.3	Вакцинопрофилактика высокопатогенного гриппа птиц Н5...	252
3.3.1	Изучение иммуногенности вакцин из высокопатогенного и низкопатогенного гриппа птиц Н5	252
3.3.2	Депонирование штамма «Ямал» вируса гриппа птиц подтипа Н5	272
3.3.3	Разработка инаktivированной вакцины против гриппа птиц Н5 «АвиФлуВак»	277
3.3.3.1	Доклинические исследования вакцины против гриппа птиц Н5 «АвиФлуВак» инаktivированной эмульсионной	277
3.3.3.2	Клинические исследования вакцины против гриппа птиц Н5 «АвиФлуВак» инаktivированной эмульсионной	307
4	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	312
5	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	329
5.1	Выводы.....	329
5.2	Практические предложения.....	330
5.3	Перспективы дальнейшей разработки темы.....	332
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	333
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	335
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	392

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из ведущих отраслей сельского хозяйства, обеспечивающей продовольственную безопасность страны, является птицеводство. Промышленное птицеводство снабжает человечество натуральными высокопитательными диетическими продуктами питания (яйцо и мясо птицы), а также сырьем для промышленной переработки (перо, пух, помет). Птицеводство характеризуется низкой затратностью, гибкостью в изменении масштабов производства и отсутствием сезонности. Мощности российского птицеводства полностью покрывают потребности россиян в яйце, а производство куриного мяса занимает почти половину от доли всей структуры мясной выработки в стране [81].

Несмотря на быстрые темпы развития отрасли птицеводства в мире негативное влияние на ее высокие производственные показатели имеет распространение инфекционных заболеваний. Для интенсивного ведения птицеводства с высокой концентрацией птицепоголовья всегда были актуальными проблемы, связанные с вирусными болезнями. На первом месте среди особо опасных болезней находятся высокопатогенный грипп птиц (ВГП) и болезнь Ньюкасла (НБ). Эти два заболевания, схожие между собой по клиническим и патологоанатомическим признакам, являются наиболее значимыми для промышленного птицеводства, так как их возникновение приводит не только к существенным экономическим убыткам, обусловленным повышенным отходом и высокой смертностью птицы, снижением продуктивности, а также последующим ограничениям в сфере торговли [13; 542]. Эпизоотии вирусных заболеваний, кроме прямого и косвенного экономического ущерба, вызывают негативные социальные последствия, которые связаны с массовыми увольнениями сотрудников птицефабрик, вынужденным переселением, снижением налоговой базы муниципалитетов, подорожанием птицеводческой продукции и прочими факторами.

Некоторые штаммы вируса гриппа птиц, а также высоковирулентные штаммы вируса ньюкаслской болезни имеют зоонозный потенциал, то есть оказывают негативное влияние на здоровье человека [168].

Учитывая широкое распространение вышеназванных болезней, их биологическую, экономическую, экологическую и социальную значимость, ВГП и НБ рассматриваются как два наиболее значимые заболевания сельскохозяйственной птицы, имеющие серьезные последствия для птицеводства.

Научные исследования, проведенные в последние десятилетия, убедительно свидетельствуют о неуклонной эволюции вируса НБ. При этом штаммы новых генотипов часто проявляют себя как высоковирулентные [183; 543]. Выделенные в 80-е годы прошлого века во время эпизоотий, варианты вируса НБ были отнесены к генотипу VII [321], который в течение 20 лет распространился во многие страны с развитым птицеводством [183]. В 2019 году в Российской Федерации было зафиксировано 17 очагов НБ, где был выделен новый субгенотип VII L [1; 83; 236]. При этом у синантропных птиц выявляются антитела к вирусу НБ [15; 16; 46], что предполагает возможность проникновения возбудителя НБ в птицеводческие хозяйства.

Несмотря на доступность и повсеместное применение вакцин, болезнь Ньюкасла остается постоянной угрозой для производителей мяса птицы во всем мире [58; 270; 287]. В последние десятилетия в результате непрерывной эволюции вируса ньюкаслской болезни (ВНБ) появилось более двадцати генотипов, и часто вспышки заболевания отмечаются у вакцинированной птицы [250; 446]. Применение традиционных вакцин против НБ, не соответствующих циркулирующему генотипу ВНБ, даже если предотвращают смертность и заболевание птиц, то не исключает циркуляцию высоковирулентных вирусов в популяции, что может привести к распространению болезни [179; 251; 270; 344; 446; 459; 543]. Miller P.J. и др. в своих исследованиях показали, что вакцины против НБ, созданные на основе

вирусов, филогенетически близких к потенциальным вирусам-возбудителям, могут обеспечить более эффективный контроль ньюкаслской болезни за счёт снижения выделения вируса инфицированными птицами [344]. В некоторых странах применение новых вакцин для домашней птицы, соответствующих генотипу, успешно подавляет циркуляцию вирулентных штаммов ВНБ в полевых условиях [101; 114; 124; 241; 248; 249; 410; 412; 460; 504]. Однако, вирулентный вирус НБ по-прежнему является эндемичным во многих регионах мира, особенно в странах с низким и средним уровнем дохода, что влияет на эффективность птицеводства и продовольственную безопасность. В странах, эндемичных по НБ, несмотря на вакцинацию для борьбы с заболеванием, отсутствие вакцин, соответствующих генотипу, которые могли бы снизить вирусную инфекцию и передачу вируса, а также ненадлежащее введение вакцин на местах снижают эффективность кампании вакцинации [250].

Вирус гриппа птиц представляет угрозу здоровью животных и человека [203; 290; 434; 474; 515]. Подтипы Н5 и Н7 стали причиной многочисленных вспышек заболевания среди диких и домашних птиц и гибели, по меньшей мере, 600 млн сельскохозяйственных птиц с 2005 по 2024 гг. Многие страны в настоящее время озабочены разработкой и применением различных стратегий борьбы с гриппом птиц. В отличие от подтипов вируса Н5N2, Н5N3, Н5N4, Н5N5 и Н5N6, которые обнаруживали на довольно ограниченной территории или в пределах континента, вирус подтипа Н5N1 положил начало масштабному межконтинентальному распространению [202]. Подтип вируса Н5N1 стал причиной значительного количества вспышек заболевания во многих странах Европы, Африки, Азии и Америки [532].

Эпизоотическая ситуация по ВГП на территории Российской Федерации так же, как и во всем мире, является напряженной [6; 12; 36; 51–53; 82]. В период первой волны эпизоотии (2005-2007 гг.) погибло и было уничтожено около трех миллионов голов птиц. Вирус нарушил работу девяти

промышленных предприятий [14]. В течении второй волны эпизоотии гриппа с 2016 по 2024 г. птицеводство РФ потеряло более 20 млн голов продуктивной птицы, включая родительские стада кур, индеек и уток. Несмотря на принятую в стране стратегию ограниченной целевой вакцинации птиц в личных подворных хозяйствах (ЛПХ), не удалось предотвратить распространения вируса и его заноса в крупные промышленные предприятия – в указанный промежуток времени пострадало 49 птицефабрик.

Ситуация по гриппу птиц значительно осложняется в связи с возросшей опасностью для человека. В мире зафиксированы случаи заражения людей «птичьими» штаммами вируса гриппа, такими как H5N1, H5N6, H7N9 [259; 496; 510; 536]. В ноябре 2025 г. задокументирован случай смерти человека от вируса птичьего гриппа H5N5 — подтипа, который ранее не был связан с заболеваниями у людей [389]. Несмотря на небольшое количество таких случаев, летальность среди инфицированных людей превышала 50%, а потенциальная способность вируса быстро мутировать и передаваться от птиц к млекопитающим сохраняется [14; 48; 290; 515].

Вирусы гриппа А, особенно подтипа H5N1, представляют собой постоянную угрозу пандемии из-за их быстрой эволюции, расширения круга хозяев и растущего количества свидетельств передачи вируса между млекопитающими [149; 379; 393; 510]. В последние годы некоторые штаммы возбудителя ВГП адаптировались к новым видам млекопитающих, что делает возможным приобретение вирусом гриппа набора дополнительных адаптивных мутаций [285]. Передача вируса гриппа птиц млекопитающим, в том числе людям, может стать первым шагом на пути к будущей пандемии. Адаптивные мутации в ходе эпизоотии могли увеличить приспособленность вируса за счет повышенной активности полимеразы, чтобы обеспечить передачу менее восприимчивым хозяевам. Это демонстрируют результаты как экспериментальных заражений, так и выделения вируса ВГП у нетипичных хозяев в дикой природе и сельском хозяйстве во время вспышек заболевания: распространение ВГП H5N1 на фермах среди свиней в Индонезии, передача

вируса крупному рогатому скоту, козам и кошкам в США [120; 136; 149; 166; 196; 335; 354; 379]. Явные изменения в эпидемиологии и экологии вируса гриппа в настоящее время представляют собой угрозу здоровью животных, общественному здравоохранению, продовольственной безопасности и биоразнообразию. Традиционные меры контроля, такие как биобезопасность, стемпинг-аут и ограничение передвижения, хотя и являются важными, могут оказаться недостаточными [113; 522].

Опыт борьбы с гриппом птиц, накопленный за последние двадцать лет, показал, что не существует одинаковых стратегий, приемлемых для всех стран мира [14; 474; 520]. Если в странах Евросоюза и в США борьба с заболеванием основывается на уничтожении всего инфицированного и восприимчивого в очаге поголовья с запретом на вакцинопрофилактику, то напротив, в КНР, Египте и некоторых других странах применяется стратегия тотальной вакцинации промышленного поголовья птиц, т.к. например, в Китае широкое распространение вируса угрожает продовольственной безопасности страны с учетом высокой плотности населения.

Экологические и эпизоотологические изменения, вызванные вспышками гриппа птиц в последние годы, поставили под сомнение исключительность программ санитарного убоя. Международные организации (ВОЗЖ, ФАО, European Food Safety Authority, European Commission) допускают, что профилактическая вакцинация позволит свести к минимуму количество вспышек и продолжительность эпизоотии. Применение вакцин может снизить риск распространения гриппа птиц на новые виды животных и уменьшить потенциальные убытки [144; 474]. Но вакцинация должна дополнять, а не заменять другие меры профилактики и контроля, такие как мониторинг инфекций среди птиц, раннее выявление и обеспечение биобезопасности, и рекомендуется как часть комплексного подхода в борьбе со вспышками гриппа птиц [25; 126; 519].

Учитывая постоянные угрозы заноса новых вариантов вируса гриппа типа А и вируса ньюкаслской болезни генотипа VII на территорию Российской

Федерации из стран Центральной и Юго-Восточной Азии, Ближнего и Дальнего Востока, Европы, определение эпизоотологической ситуации, изучение эффективности существующих вакцинных препаратов против актуальных, циркулирующих на территории страны, вирусов НБ и ВГП и разработка высокоэффективных вакцин против вышеуказанных заболеваний подчеркивают своевременность и актуальность заявленной темы.

Степень разработанности темы. Разработке вакцинных препаратов против болезни Ньюкасла и гриппа птиц посвящено множество и отечественных, и зарубежных публикаций [35; 37; 105; 115; 123; 135; 148; 250; 272; 284; 299; 317; 318; 339; 458; 466; 473; 474; 477; 511; 512]. Возбудители болезней хорошо изучены, однако непредсказуемость генетических мутаций вирусов, приводящая к новым эпизоотиям, требует дальнейших усилий от ученых во всем мире по совершенствованию средств специфической профилактики. Расширение спектра циркулирующих штаммов вирусов НБ и ВГП с различными антигенными формулами требует разработки средств специфической профилактики и определения их роли в контроле над заболеванием. Учитывая высокий риск эпизоотий для продовольственной безопасности страны, а так же зоонозный потенциал вируса гриппа птиц, разработка средств специфической профилактики НБ и ВГП представляется необходимым условием для принятия мер по сдерживанию распространения инфекций и их искоренения.

Опасность, которую представляют НБ и ВГП, диктует постоянную необходимость совершенствования средств профилактики и методов диагностики, глубокого изучения свойств выделяемых в полевых условиях изолятов возбудителей, определения их эпизоотической опасности и оценки степени соответствия производственным штаммам.

Цель и задачи исследований. Целью настоящих исследований стало изучение протективного действия применяемых вакцин против актуальных

возбудителей ВГП и НБ и разработка новых высокоэффективных специфических иммунобиологических препаратов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- изучить эпизоотическую ситуацию по ньюкаслской болезни и высокопатогенному гриппу птиц в РФ с 2005 по 2024 гг.;
- оценить протективную функцию вакцин против НБ в отношении актуальных высоковирулентных изолятов вируса VII генотипа;
- разработать эффективные средства специфической профилактики болезни Ньюкасла в отношении ВНБ субгенотипа VII L;
- разработать инактивированную вакцину против высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5;
- изучить антигенные и иммуногенные свойства разработанных вакцин против НБ и ВГП в лабораторных и производственных условиях;
- подготовить нормативную документацию на разработанные вакцины;
- осуществить промышленное производство разработанных вакцин и внедрить эти препараты в ветеринарную практику птицеводческих хозяйств РФ.

Научная новизна. Проведен эпизоотологический анализ распространения болезни Ньюкасла и высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации за 2005-2024 гг.

Изучено протективное действие вакцин для профилактики НБ отечественного и импортного производства в отношении актуального для РФ высоковирулентного изолята вируса НБ субгенотипа VII L.

Получены и депонированы штаммы вируса НБ «ВНИИЗЖ G7» и «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и штамм «Ямал» вируса ГП H5, обладающие высокой иммуногенной активностью и пригодные для получения вакцин.

Научно обоснованы и экспериментально подтверждены способы применения вакцин против НБ и ВГП.

Разработана технология изготовления и методы контроля полиштамтной инактивированной эмульсионной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» против НБ, включающей антиген субгенотипа VII L с антигенным компонентом вируса гриппа птиц подтипа H9N2.

Разработана технология изготовления и методы контроля инактивированной эмульсионной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» против НБ, включающей антиген субгенотипа VII L.

Разработана технология изготовления и методы контроля живой вакцины против НБ из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн».

Изучены протективные свойства отечественных серийно выпускаемых вакцин «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» и живой вакцины из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в отношении высоковирулентных полевых изолятов вируса НБ субгенотипа VII L, выделенных в 2019-2023 гг.

Разработана технология изготовления и методы контроля инактивированной эмульсионной вакцины «АвиФлуВак» против ВГП из штамма возбудителя низкопатогенного гриппа H5;

Проведена оценка протективного действия серийно выпускаемой в ФГБУ «ВНИИЗЖ» вакцины «АвиФлуВак» на основе штамма «Ямал» низкопатогенного вируса гриппа H5, полученного в 2021 г., в отношении высоковирулентных полевых вирусов H5N1 и H5N8, выделенных в 2018-2024 гг.

Научная новизна исследований подтверждена получением двух патентов РФ (Приложения 1-2):

– Патент на изобретение RU 2796987 C1, МПК C12N 7/00 (2006.01). Штамм «Ямал» вируса гриппа птиц рода *Alphainfluenzavirus* вида *Influenza A virus* подтипа H5 для изготовления биопрепаратов для специфической профилактики гриппа птиц типа А подтипа H5 / Н.В. Мороз, С.В. Фролов, П.Д. Жестков, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала, О.И. Ручнова; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - №

2022121292; Заявл. 03.08.2022; Оpubл. 30.05.2023, Бюл. № 16. - Введ. с 03.08.2022 по 03.08.2042.

- Патент на изобретение RU 2821028 C1, МПК C12N 7/00 (2006.01). Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц / Н.В. Мороз, С.В. Фролов, И.А. Чвала, М.А. Вершинина, Д.Л. Долгов, О.И. Ручнова, Н.А. Гусева, И.А. Комаров, Д.Б. Андрейчук; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2024103509; Заявл. 13.02.2024; Оpubл. 17.06.2024, Бюл. № 17. - Введ. с 13.02.2024 по 13.02.2044.

Теоретическая и практическая значимость работы. Научно-практическое значение работы вытекает из результатов исследований.

Результаты научных изысканий легли в основу разработки новых вакцин, которые были зарегистрированы и внедрены в ветеринарную практику. Испытания препаратов были проведены комиссионно, а нормативные документы утверждены в установленном порядке (Приложения 3-16):

Справка № 366-деп /21-27 о депонировании штамма «Ямал» подтипа H5N1 вируса гриппа А (производственного) 24.09.2021 г.;

Справка № 437-деп /22-71 о депонировании штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни (производственного) 08.02.2022 г.;

Справка о депонировании № 436-деп/22-70 штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни (производственного) 30.12.2022 г.;

СТО 00495527-0211-2022 Вакцина против гриппа птиц (H5) инактивированная эмульгированная «ВНИИЗЖ АвиФлуВак»;

СТО 00495527-0211-2023 Вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сухая живая;

СТО 00495527-0468-2024 Вакцина против ньюкаслской болезни (G7 и Ла-Сота) и гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) ассоциированная инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»;

СТО 00495527-0483-2024 Вакцина против ньюкаслской болезни инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»;

«Методические рекомендации по оценке титра 50-процентных протективных доз (PD_{50}) для инактивированных вакцин против вирусных болезней птиц»;

«Методические рекомендации по планированию и проведению мониторинговых исследований на грипп птиц и ньюкаслскую болезнь в дикой орнитофауне и в популяции домашних птиц населенных пунктов»;

«Методические рекомендации по активному и пассивному надзору за вакцинированным против высокопатогенного гриппа птиц поголовьем в условиях промышленных предприятий».

Методология и методы исследований. При проведении эпизоотологических исследований использовались классические методы эпизоотологии и вирусологии. В лабораторных условиях использовали вирусологические методы (изоляция и титрование на КЭ), серологические методы (РГА, РТГА), метод контрольного заражения. Достоверность результатов исследований оценивали статистическими методами (программа «MS Office Excel»).

Положения, выносимые на защиту:

- результаты анализа эпизоотологических данных по болезни Ньюкасла и высокопатогенному гриппу птиц подтипа H5 в Российской Федерации;
- результаты по определению протективных свойств отечественных и зарубежных вакцин для профилактики НБ в отношении актуального для России высоковирулентного вируса субгенотипа VII L;
- производственные вакцинные штаммы вируса НБ и гриппа птиц, обладающие высокой иммуногенностью;
- технология изготовления и контроля живой и инактивированных вакцин против НБ и гриппа птиц H5;

- результаты оценки иммунобиологических свойств разработанных вакцин против НБ и ГП Н5 в лабораторных и производственных условиях.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты проведенных исследований получены на большом объеме экспериментального материала. Степень достоверности результатов подтверждена обработкой их статистическими методами и комиссионными испытаниями. Достоверность результатов анализа экспериментальных данных подтверждена проверкой по соответствующими статистическими критериями на заданном уровне p ($p \leq 0,05$), которые были использованы при оценке существенности различий средних значений варьирующих переменных, значимости коэффициентов корреляции и регрессии. Необходимые вычислительные процедуры и графические построения выполняли в приложении «MS Office Excel». Полученные результаты исследований подтверждены актами комиссионных испытаний, утвержденных в установленном порядке. Научные положения, выводы, предложения диссертационной работы аргументированно отражают ее содержание.

Основные положения диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2020-2024 гг.), а также на многочисленных национальных и международных конференциях и семинарах:

- Международный форум «АГРО.PRO Птицеводство» Сфера, г. Санкт-Петербург, март 2021 г.;
- «Тенденции 2021 г. в птицеводстве. Обеспечение эпизоотического благополучия на птицеводческом предприятии. Инновационные и эффективные решения» ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, апрель 2021 г.;
- Выставка «МСV: Зерно-Комбикорма – Ветеринария – 2021», г. Москва;
- Международная научно-практическая конференция «Ветеринария в АПК -2021. Ветеринария в птицеводстве», г. Челябинск, июнь 2021 г.;

- Семинар для птицеводов Республики Узбекистан «Актуальные проблемы инфекционной патологии в промышленном птицеводстве и пути их решения», Узбекистан, г. Самарканд, июль 2021 г.;
- «Актуальные болезни птиц в Республике Армения и в мире. Новые решения», Армения, г. Ереван, сентябрь 2021 г.;
- Круглый стол «Актуальные болезни в животноводстве. Профилактика, диагностика, пути решения» в рамках выставки «Золотая осень», г. Москва, октябрь 2021;
- Межрегиональная Агропромышленная конференция МАК 2022, г. Челябинск, февраль 2022 г.
- Выставка «МСV: Зерно-Комбикорма – Ветеринария –2022», г. Москва, июнь 2022 г.;
- Агропромышленный форум «День сибирского поля 2022», Алтай, июнь 2022 г.;
- Расширенное совещание по теме «Профилактика вирусных болезней птиц» в Управлении Россельхознадзора по Республике Башкортостан, г. Уфа, август 2022 г.;
- Международная специализированная выставка КормВет-2022, г. Москва, октябрь 2022 г.;
- Международная научно-практическая конференция ветврачей птицефабрик РФ и стран СНГ «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных болезней птиц в промышленном птицеводстве», г. Владимир, март 2023 года;
- Научно-практический семинар «Комплексный подход к решению задач в промышленном птицеводстве как основа эффективного развития предприятия», КОРПАС, апрель 2023 г.;
- Международная научно-практическая конференция «Ветеринария в АПК-2023», г. Новосибирск, май 2023 г.;

- Круглый стол «Эпизоотическая ситуация: обеспечение безопасности и векторы импортозамещения» в рамках саммита «Аграрная политика России: безопасность и качество продукции», КРОКУС ЭКСПО, май 2023 г.;

- Круглый стол «Ветеринарное благополучие в промышленном птицеводстве» в рамках выставки «БелАгро-2023», Республика Беларусь, июнь 2023 г.;

- Форум птицеводов России, стран ЕАЭС и СНГ по обмену опытом, передовыми технологиями птицеводства в области генетики, производства, кормления и лечения птиц – «БРОЙЛЕР И ЯЙЦО», г. Москва, июнь 2024 г.;

- Всероссийской отраслевое совещание «Бройлерное птицеводство в России: текущие реалии и перспективы развития» МСХ Тимирязева, г. Москва, июнь 2024 г.;

- Международная научно-практическая конференция «Развитие науки и практики в контексте глобальных вызовов», г. Кострома, январь 2024 г.;

- Международная научно-практическая конференция ветврачей птицефабрик РФ и стран СНГ «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных болезней птиц в промышленном птицеводстве», г. Владимир, февраль 2024 г.;

- Международный форум «АГРО.PRO Птицеводство. Свиноводство. КРС», г. Санкт-Петербург, март 2024 г.;

- Научно-практический семинар группы компаний КОРПАС «Пути решения актуальных вопросов промышленного птицеводства в новой реальности», г. Нальчик, апрель 2024 г.;

- Международная выставка «Мясная промышленность. Куриный король. Индустрия холода для АПК / MAP Russia 2024», г. Москва, май 2024 г.;

- XIII Международная научно-практическая конференция «Ветеринария в АПК 2024», г. Новосибирск, июнь 2024 г.;

-XXIX Международная специализированная торгово-промышленная выставка «MVC: Зерно – Комбикорма – Ветеринария – 2024» г. Москва, июнь 2024 г

- Научно-практический семинар «Вопросы обеспечения здоровья и благополучия цыплят-бройлеров в промышленном птицеводстве» для практических ветврачей ГАП, г. Ставрополь, июль 2024 г.;

- XI-й Казахстанский Международный форум птицеводов и V форум Ассоциации птицеводов стран ЕАЭС, который приурочен к празднованию 60-летия Промышленного птицеводства Республики Казахстан и 25-летию общественной организации Союза птицеводов Казахстана, г. Астана, июнь 2024 г.

- Международный научно-практический «Балтийский форум ветеринарной медицины и продовольственной безопасности», г. Санкт-Петербург, сентябрь 2024 г.;

- Круглый стол «Перспективы развития ветеринарной отрасли» КормВетГрэйнд-2024 Москва, октябрь 2024 г.;

- Международная научно-практическая конференция ветеринарных врачей птицефабрик Российской Федерации и стран СНГ «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных болезней птиц в промышленном птицеводстве», г. Владимир, февраль 2025 г.;

- Международная научно-практическая конференция «Ветеринария в АПК-2025», г. Новосибирск, июнь 2025 г.;

- Международная научно-практическая конференция «Современные тенденции развития ветеринарной науки и практики», Республика Беларусь, г. Минск, октябрь 2025 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, из которых в рецензируемых изданиях, входящих в перечень

рекомендованных ВАК РФ, – 12 статей. Получено два патента РФ на изобретение (в соавторстве).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 416 страницах компьютерного текста содержит введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение. Диссертация иллюстрирована 82 таблицами и 28 рисунками. Список использованной литературы включает 545 источников, из которых 91 – на русском языке. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

Личный вклад автора в выполнение работы. Основной объем научных исследований, изложенных в тексте диссертационной работы, выполнены автором самостоятельно и являются результатом научной работы за период с 2020 по 2025 год. Личный вклад автора был определяющим. Соискатель, как ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ» осуществляла планирование всех экспериментов по теме работы и принимала непосредственное участие в их проведении. В ходе проведения отдельных этапов работы помощь оказывали: сотрудники лаборатории профилактики болезней птиц, референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», информационно-аналитического центра Управления ветеринарии; экспериментально-биологической лаборатории по работе с животными, за что автор выражает свою благодарность. Участие соавторов отражено в совместно изданных научных публикациях. Отдельную благодарность автор выражает научному консультанту доктору ветеринарных наук, доценту Ирзе В.Н. за неоценимую помощь при подготовке настоящей работы.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ньюкаслская болезнь

1.1.1 Общие сведения о болезни Ньюкасла

Ньюкаслская болезнь (НБ, болезнь Ньюкасла, псевдочума птиц) - высококонтагиозная вирусная инфекция птиц, главным образом куриных, характеризующаяся пневмонией, энцефалитом, множественными точечными кровоизлияниями и поражениями внутренних органов, которая наносит ущерб птицеводству всего мира [108; 250]. Гибель птиц, особенно молодых, может достигать 100%. К болезни восприимчивы более 240 видов домашних и диких птиц [264; 413], что способствует ее широкому распространению в мире. Болезнь Ньюкасла является энзоотическим заболеванием в некоторых регионах земного шара, где оно может оказывать серьёзное влияние на промышленное птицеводство и частные хозяйства [109; 160].

В Международном кодексе наземных животных ВОЗЖ болезнь Ньюкасла включена в перечень заболеваний, требующих обязательного декларирования. Однако не все вирусы НБ, наносят катастрофический экономический ущерб птицеводству. ВОЗЖ представляет следующее определение болезни Ньюкасла – это инфекционное заболевание птиц, вызванное вирусом птичьего парамиксовируса серотипа 1 (APMV-1), при этом вирус должен либо обладать индексом интрацеребральной (внутримозговой) патогенности (ICPI) у суточных цыплят равным или превышающем значение 0,7, либо иметь определенную последовательность многоосновных аминокислот (остатков аргинина или лизина) на С-конце белка F2 и фенилаланин в 117 положении, на N-конце белка F1 [524].

Болезнь Ньюкасла – это инфекционное заболевание домашних птиц, история которого насчитывает почти столетие. Считается, что впервые вспышка произошла в 1926 году на острове Ява в Индонезии, затем в городе Ньюкасл-апон-тайн, Англия [108]. Однако, в литературе имеются сообщения о вспышках заболеваний со сходными клиническими проявлениями

происходивших и до 1926 г. Согласно данным доклада Ochi Y. и Hashimoto K. в Правительственный институт ветеринарных исследователей случаи возникновения болезни, схожей с НБ, наблюдались в Корее еще в 1924 году. Имеется также версия, что в Шотландии в 1896 г. причиной массовой гибели птиц являлся вирус ньюкаслской болезни [326]. За всю историю возникновения болезнь Ньюкасла в различных регионах мира называли по-разному: птичьим пневмоэнцефалитом, корейской чумой птиц, азиатской чумой птиц, болезнью Тетело, болезнью Ранихета (из-за места её возникновения в Индии), птичьей чумкой, птичьим мором, псевдочумой домашней птицы, атипичным гефлюгельпестом, псевдо-фогельпестом и ложным птичьим мором [109; 338]. Doyle T.M. дал название болезни в честь места ее обнаружения, чтобы избежать путаницы с другими заболеваниями, и впервые смог идентифицировать возбудителя посредством лабораторного эксперимента, исключив его связь с вирусом птичьего гриппа [326].

Согласно таксономии, вирус болезни Ньюкасла, также известный как птичий парамиксовирус типа 1 (APMV-1), относится к порядку Mononegavirales, поскольку его геном представлен одноцепочечной отрицательной РНК, а сам вирус имеет спиральную симметрию капсида [108; 338]. Ранее причисляемый к роду Rubulavirus, в настоящее время ВНБ отнесен к роду Orthoavulavirus и виду Avian Orthoavulavirus (AOAV-1) подсемейства Avulavirinae семейства Paramyxoviridae [182].

Существует десять серотипов парамиксовирусов птиц, обозначенных с APMV-I по APMV-10. Согласно определению, данному ВОЗЖ, Ньюкаслская болезнь вызывается вирулентными штаммами вируса 1-го серотипа, однако известно, что APMV-2, APMV-3, APMV-6 и APMV7 также могут вызывать заболевание у птицы [184].

Хотя все вирусы, вызывающие НБ, относятся к одному серотипу, птичьему парамиксовирусу типа 1, между различными генотипами наблюдается антигенное и генетическое разнообразие и известно более 20

генотипов [131]. Вирусы делятся на класс I и класс II. Вирусы класса I представляют собой один генотип с тремя подтипами [182]. К первому классу относятся лентогенные, как правило авирулентные для кур штаммы, выявленные у водоплавающих, диких и домашних птиц по всему миру [353]. Вирусы класса II включают в себя остальные 18 генотипов, I–XVIII. Вирусы класса II наиболее разнообразны и оказывают значительное экономическое воздействие на птицеводческую отрасль в случае возникновения вспышки заболевания. К примеру, генотипы V, VI, VII и VIII являются преобладающими среди циркулирующих по всему миру, и содержат только вирулентные вирусы [338; 340]. При этом вирусы VI генотипа вируса НБ как правило вызывают заболевания у голубей и выделяются в отдельную группу птичьих парамиксовирусов, известную как голубиные парамиксовирусы-1 (PPMV-1). Ко второму классу относятся как вакцинные, так и вирулентные вирусы, которые отличаются разнообразием и эволюционным потенциалом [353]. Генотипы III, IV, V и VI обычно считаются патогенными для кур [130]. Последовательность сайта расщепления белка F лежит в основе филогенетического анализа вируса и помогает оценить происхождение и распространение вспышек заболевания [353], поскольку принято считать, что именно эта область является ведущим молекулярным фактором, определяющим вирулентность.

Ньюкаслская болезнь вызвала по меньшей мере четыре панзоотии по всему миру [340] и сейчас уже идет пятая волна. НБ вызывается вирулентными изолятами вируса болезни Ньюкасла. Первая панзоотия, с 1930-х по 1960-е годы, была вызвана вирусами генотипов I, II, III и IV. Вторая панзоотия, с конца 1960-х по 1973 год, была вызвана в основном вирусами генотипа V и VI. В 1975 году у голубей началась третья панзоотия, которая распространилась на различные регионы по всему миру. За эту панзоотию отвечал вирус НБ генотипа VI. С конца 1980-х годов ВНБ генотипа VII появился на Дальнем Востоке и распространился по всему миру, вызвав

четвёртую панзоотию [333]. Недавние обнаружения новых субгенотипов вируса НБ свидетельствуют о том, что новая, пятая, панзоотия болезни Ньюкасла уже возникла в Юго-Восточной Азии, распространилась на Ближний Восток и в настоящее время проникает в Европу [213; 341], где наибольшее количество вспышек регистрируется в Польше. В настоящее время генотип VII ВНБ является эндемичным во многих странах, в основном в Азии и Африке, представляя большую угрозу для птицеводства [93; 97; 98; 117; 181; 192; 230; 261; 265; 342; 348; 350; 355; 383; 412; 415; 425; 448; 488; 491; 498; 505; 538].

Болезнь Ньюкасла регистрируется во многих странах мира на пяти континентах, в том числе и в Российской Федерации [17; 65; 236; 525].

Генетический материал птичьих парамиксовирусов представлен одноцепочечной несегментированной отрицательной молекулой РНК [191] длиной приблизительно 15 кб, которая становится инфицирующей только в ассоциации с нуклеокапсидом. ВНБ состоит из шести генов и соответствующих им шести структурных белков: нуклеопротеина (NP), фосфопротеина (P), матричного (M), слияния (F), гемагглютинин-нейраминидазы (HN) и РНК-полимеразы (L) [216]. Редактирование РНК белка P приводит к образованию двух дополнительных белков, V и W. HN и F - это гликопротеины, которые обеспечивают связывание и слияние вируса с клетками хозяина для начала инфекции NDV. Антитела к HN и F являются нейтрализующими и представляют собой основной защитный компонент, индуцируемый вакцинами против болезни Ньюкасла [422].

К вирусу болезни Ньюкасла восприимчиво большое количество птиц, хотя вирулентность вируса и исход болезни варьируются в зависимости от конкретного вида [413; 505]. Многочисленные виды домашней птицы, включая бройлеров, кур-несушек, голубей, уток, индеек, страусов, павлинов, фазанов, желтоголовых попугаев, водоплавающих птиц и пситтацин,

подвержены заражению различными штаммами вируса ньюкаслской болезни во всем мире [222]. Помимо домашних видов птиц, естественное или экспериментальное заражение ВНБ было продемонстрировано по меньшей мере у 241 вида из 27 из 50 отрядов птиц [264].

Другие виды животных, включая человека, также могут быть инфицированы вирусом болезни Ньюкасла, но о распространении вируса от человека к человеку никогда не сообщалось [109]. У людей и других нептичьих хозяев может наблюдаться легкая системная инфекция ньюкаслской болезни, ограниченная поражением респираторной и неврологической систем. Доказательства заражения вирусом НБ и обнаружения его генома были получены у представителей семейств *Bovidae* (КРС), *Mustelidae* (норка), *Cercetidae* (хомяк), *Muridae* (мышь), *Leporidae* (кролик), *Camelidae* (верблюды), *Suidae* (свинья), *Cercopithecidae* (обезьяны) и *Hominidae* (человек). Из-за частых вспышек НБ среди работников птицеводческих хозяйств был сделан вывод, что люди, занятые в ветеринарии, в том числе в производстве мяса птицы, потрошении и производстве вакцин, постоянно подвергаются гораздо большему риску заражения вирусом ньюкаслской болезни, чем население в целом [494]. У людей с ослабленным иммунитетом и у нептичьих видов, включая норок, свиней и крупный рогатый скот, была описана смертельная форма инфекции, что свидетельствует о способности вируса НБ преодолевать межвидовые барьеры [228; 292; 356; 544]. В основном у людей заболевание НБ характеризуется конъюнктивитом и, как правило, протекает в легкой форме и не вызывает осложнений [106].

Клинические признаки болезни Ньюкасла у птиц разнообразны и зависят от вирулентности вируса, а также от степени восприимчивости организма [104]. У кур, заражённых ВНБ, могут проявляться различные клинические признаки: от лёгких респираторных или кишечных симптомов до тяжёлой системной инфекции, приводящей к высокой смертности и быстрому распространению [103].

Всемирная организация по охране здоровья животных классифицировала вирус НБ на пять патотипов в зависимости от тяжести заболевания у кур: нейротропно-велогенный, висцеротропно-велогенный, мезогенный, лентогенный и бессимптомный [109].

Висцеротропная велогенная форма болезни представляет собой тяжело протекающее заболевание, при котором в желудочно-кишечном тракте и иных внутренних органах характерны геморрагические поражения. Нейротропная велогенная форма характеризуется высокой смертностью от респираторных и нервных симптомов. Мезогенная форма проявляется в виде респираторных и нервных симптомов, но обычно с невысоким уровнем смертности, а лентогенная – легкой или субклинически протекающей инфекции дыхательных путей. Также выделяется пятая, бессимптомная кишечная форма инфекции [330].

Форма течения заболевания НБ для кур также зависит от способа заражения инфекцией. При естественном заражении через нос, глаза или рот заболевание обычно носит респираторный характер, а при внутримышечном, внутривенном или внутримозговом заражении — неврологический [108].

За день или два до появления клинических признаков в заражённом стаде часть птиц становятся вялыми, апатичными, сбиваются в кучу и сидят, нахохлившись. Часто наблюдается диарея, помет жидкий, зеленоватого цвета. После общих признаков, как правило, появляются более специфические, характерные для определённого патотипа: хрипы в трахее, паралич ног и кривошея. Ввиду сильной вариабельности клинической картины, а порой и полного отсутствия симптомов заболевания, болезнь Ньюкасла может быть спутана с высокопатогенным птичьим гриппом, инфекционным бронхитом, инфекционным ларинготрахеитом, птичьей холерой, микоплазмозом и пситтакозом [130]. Данное обстоятельство подчеркивает важность проведения оперативных и точных диагностических мероприятий для своевременного выявления очага болезни Ньюкасла.

1.1.2 Профилактика и меры борьбы с болезнью Ньюкасла

Болезнь Ньюкасла входит в список заболеваний, при установлении диагноза которых сельскохозяйственная птица подлежит убою бескровным методом и уничтожению (стемпинг-аут). Лечение противовирусными препаратами не эффективно, но главное, больных птиц лечить нецелесообразно из-за опасности распространения возбудителя инфекции.

Профилактика ньюкаслской болезни и борьба с ней основаны на принципах соблюдения биобезопасности предприятий и разработке программы вакцинации. Как показывает международный опыт, в настоящее время методы борьбы с болезнью Ньюкасла не отличаются от борьбы с высокопатогенным гриппом птиц. Основу этих методов составляет Директива 92/66/ЕЕС. При этом каждое государство, в зависимости от эпизоотической ситуации, проводит полный или частичный санитарный убой больных и подозреваемых в заражении птиц в 3-километровой (защитной) зоне. А в 10 - километровой (предохранительной) зоне проводят вакцинацию, систематический контроль над поголовьем птиц серологическими методами. Вакцинация является неотъемлемой частью программ борьбы с заболеванием и одним из наиболее эффективных способов минимизации распространения болезни Ньюкасла [23; 24; 110; 524]. Но в тоже время, вакцинация против болезни Ньюкасла не является всемирно признаваемой мерой профилактики данного заболевания, невзирая на ее доказанную эффективность, и каждое государство самостоятельно регламентирует использование вакцин для домашней птицы.

Под биобезопасностью понимаются меры, принимаемые для предотвращения или контроля заноса и распространения инфекционных агентов среди восприимчивого поголовья [59]. Концепция биобезопасности охватывает политику и нормативные акты, защищающие сельское хозяйство, продовольствие и окружающую среду от биологических рисков.

Биозащита охватывает процедуры, которые снижают вероятность вспышек заболеваний, и включает в себя два компонента: биоисключение до вспышки (предотвращение проникновения патогенов) и биоконтроль после вспышки (предотвращение выхода патогенов из зараженного помещения для предотвращения передачи заболевания). Компоненты комплексного плана биозащиты включают концептуальную биозащищенность, структурную биозащищенность и операционную биозащищенность. Концептуальная биозащита относится к выбору местоположения фабрики для обеспечения изоляции помещений. Птицефабрики должны быть географически отдалены от других птицеводческих хозяйств. Необходимо учитывать взаимосвязь территории фермы с озерами, прудами, реками, дорогами общего пользования, инкубаториями и комбикормовыми заводами. Возбудители болезней могут переноситься различными переносчиками и паразитами в соседние помещения. Структурная биозащита требует, чтобы здания в комплексе были разделены на карантинные единицы путем возведения ограждений и строительства дорог в соответствующих местах. Для сотрудников должны быть установлены оборудование для обеззараживания, душевые и раздевалки. Здания, помещения для хранения продуктов питания и резервуары для воды должны быть построены таким образом, чтобы исключить доступ свободно летающих диких птиц, крыс и мышей. Регулярная дезинсекция и дератизация способствует эффективной борьбе с переносчиками заболевания. Саму территорию птицефабрики тщательно огораживают, запасы воды и корма хранят в закрытых резервуарах. Кроме того, минимизируется количество поездок на птицеводческое предприятие и за её пределы, а транспортные средства и оборудование, въезжающие на территорию, подвергаются дезинфекции [121]. Операционная биозащита состоит из управленческих решений и рутинных процедур, предназначенных для предотвращения внедрения возбудителей инфекционных заболеваний.

В 2007 году Permin A. и Detmer A. предложили четыре принципа биобезопасности, которые непосредственно связаны со всеми этапами производства на предприятиях и призваны свести риски заноса инфекционных агентов к минимуму [100; 369; 381]. Эти принципы включают: контроль за поступающими животными, контроль за ввозимым и вывозимым материалом, управление стадом и контроль за другими животными. Поскольку вторичное распространение НБ происходит главным образом в результате деятельности человека, такой как перемещение персонала, транспорта, оборудования или других потенциально зараженных объектов, биозащита включает в себя все меры, направленные на сохранение инфекции в помещениях, где был выявлен очаг заболевания. Общепринятые стратегии биобезопасности могут оказаться неэффективными в ряде случаев, например, в регионах, где птицеводство распространено у сельских жителей [170].

При выявлении болезни Ньюкасла хозяйство объявляется неблагополучным. Вспышки устраняются с помощью карантина, контроля за передвижением, изолирования и уничтожения популяции всех инфицированных и контактировавших с ними птиц, уборки и дезинфекции помещений [32; 62]. Для постоянного контроля за заболеванием необходимо регулярное проведение серологического мониторинга [495; 524].

1.1.3 Вакцины против ньюкаслской болезни

Помимо грамотных подходов к биобезопасности, борьба с болезнью Ньюкасла достигается путем различных программ вакцинации популяций птицы с использованием живых и инактивированных вакцин против НБ [1; 84]. С момента применения первой вакцины против болезни Ньюкасла прошло уже более 90 лет [387], и до настоящего времени использование вакцин остается неизменным условием успешного контроля вышеуказанного заболевания.

Вакцинация против НБ должна преследовать три основные цели: снижение заболеваемости и смертности с сохранением продуктивности; уменьшение распространения вируса и его выделения в популяции птицы; защита от вирусной инфекции [250]. Однако в полевых условиях большинство современных вакцин и режимов вакцинации в первую очередь направлены на смягчение клинических проявлений заболевания. Кроме того, коммерческие вакцины против болезни Ньюкасла, предоставляемые большинством компаний, гарантируют только предотвращение 80-90% случаев заболеваемости. На эффективность вакцинации также влияют дефицит питательных веществ, стресс и иммуносупрессия, вызванная коинфекцией иммуносупрессивными патогенами, такими как вирус инфекционной бурсальной болезни или вирус болезни Марека.

Во всем мире используется широкий спектр вакцин и протоколов вакцинации в зависимости от эндемичных штаммов, методов выращивания домашней птицы, доступа к холодильной цепи и многих других условий [24; 58; 250; 287]. Оптимальным сроком для вакцинации считается период после снижения уровня материнских антител, что позволяет вакцинам вызвать хороший иммунологический ответ, но до того, как птица может подвергнуться воздействию вирулентного штамма ВНБ. Тип программы, выбранной для каждого птичьего стада, будет зависеть от нескольких факторов, таких как возраст, уровень материнских антител, порода и наличие сопутствующих инфекций [58; 343]. Обычно птиц либо вакцинируют после достижения двухнедельного возраста, когда большинство из них становятся восприимчивыми к заболеванию, либо вакцинируют суточных цыплят массовым методом живой вакциной, а затем, через 2-4 недели, проводят ревакцинацию [524]. Для достижения коллективного иммунитета, вызванного любой стратегией вакцинации против ньюкаслской болезни, достаточная доза вакцины должна быть введена не менее чем 85% животных, и у этих животных должен быть титр гемагглютинирующих антител $\geq 3 \log_2$ [499]. Схемы

вакцинации против ньюкаслской болезни должны быть адаптированы к конкретным условиям фермы или птицефабрики. Таким образом, выбор подходящих вакцин имеет решающее значение для эффективности вакцинации и борьбы с заболеванием.

Живые вакцины

К живым вакцинам против ньюкаслской болезни относятся вакцины из лентогенных и мезогенных штаммов. В глобальном масштабе лентогенные живые вакцины используются наиболее широко, а штаммы «Ла-Сота» и «В1» являются репрезентативными. Эти вирусы относятся ко второму генотипу и имеют много общего на генетическом и антигенном уровнях. Лентогенные вакцины могут вызывать защитный иммунный ответ, хотя они различаются по тканевому тропизму и характеру репликации у кур [130]. Штамм «Ла-Сота» обладает высоким тропизмом к дыхательной системе, где реплицируется в больших титрах [382]. Антигенная активность вакцин из штамма «Ла-Сота», как правило, очень высокая, и поэтому эти препараты подходят для использования в эндемичных странах, где циркулирует вирулентный вирус Ньюкасла. Вакцина из штамма «VG/GA» характеризуется двойным тропизмом к респираторным путям и кишечнику, с более высоким тропизмом к последнему, и может вызывать сильный иммунитет слизистой оболочки [50; 385]. Вакцина из штамма «В1» обладает очень низкой вирулентностью и является безопасной для птиц [513], и обычно используется при низком риске заражения НБ или для цыплят. Другой тип лентогенной живой вакцины основан на генотипе I, штаммы «V4» и «I-2» являются представителями этого типа. Эти штаммы обладают низкой вирулентностью и хорошей безопасностью для цыплят всех возрастов [239; 382]. Более того, препараты из штаммов «V4» и «I-2» являются типичными гранулированными термостабильными вакцинами с уникальными преимуществами, позволяющими использовать их в отдалённых сельских районах с

ограниченными возможностями хранения при низких температурах. Их можно вводить с питьевой водой и пищей [132; 224; 240].

Живые вакцины против ньюкаслской болезни из лентогенных вирусов НБ безвредны и безопасны, так как вакцинные штаммы аттенуированы и обладают или низкой вирулентностью и обычно вызывают у цыплят незначительные реакции на вакцинацию, или же не обладают ею вовсе. Кроме того, применение живых вакцин стимулирует образование мукозального, гуморального и клеточного иммунитета. Одним из больших преимуществ живых вакцин против НБ является их пригодность для массового применения с использованием питьевой воды или распыления (аэрозольно или срей-метод), что делает их применение очень дешевым [5; 50; 223]. Кроме того, вакцинный вирус от вакцинированных птиц может распространяться на неоптимально вакцинированных птиц, находящихся поблизости, тем самым способствуя формированию общего коллективного иммунитета [485]. Однако при определённых условиях живые вакцины могут вызывать нежелательные реакции на вакцинацию, такие как замедление роста, лёгкие респираторные симптомы и даже смертность и повышенную восприимчивость к другим патогенам, что в тяжёлых случаях может привести к развитию вторичных бактериальных инфекций [502; 517]. Также отрицательной стороной использования живых вакцин против НБ является то, что для их транспортировки и хранения требуется «холодовая цепь». Кроме того, живые вакцины обычно вводят молодым цыплятам, и наличие материнских антител может снижать их эффективность [21; 318; 502]. Поэтому для повышения эффективности вакцинации важно обеспечить однородность потомства по титру материнских антител, проводить иммунизацию в оптимальный срок, определяемый на основании мониторинга материнских антител, следует исключить проявление феномена интерференции с другими вирусами, возможно циркулирующими в стаде [21]. К недостаткам применения живых вакцин против болезни Ньюкасла можно также отнести неконтролируемость

индивидуальной иммунизирующей дозы при массовых методах применения, необходимость в повторных вакцинациях, увеличение инфекционного давления на организм, возможность реверсии патогенных свойств штамма.

Существует также тип живых вакцин против НБ на мезогенных штаммах, таких как «Mukteswar» (генотип III), «Комаров» (генотип II) и «Роакин» (генотип II) [214]. Эти штаммы вируса обладают высокой вирулентностью и могут даже вызывать гибель молодняка [177]. Мезогенные живые вакцины отличаются высокой иммуногенностью, вызывая быстрый и длительный иммунитет. Данные вакцины можно использовать для взрослых кур в качестве бустерной или экстренной вакцинации в условиях неблагоприятной эпизоотической обстановки. Однако, поскольку ВОЗЖ определяет мезогенные вирусы как вирулентные, а также имеются сообщения о повышенной вирулентности данного типа вакцин [400], во многих странах мезогенные живые вакцины запрещены [214].

В Российской Федерации производство живых вакцин для профилактики НБ по дозам занимает почти 70% от общего объема производства иммунологических биопрепаратов. Так, в 2024 г. отечественными производителями в РФ в гражданский оборот было выпущено всего 32,4 миллиарда доз вакцин, из них 23,2 млрд. доз живых вакцин против ньюкаслской болезни. Благодаря усилиям отечественных ученых [39; 69; 71; 73; 77], биологическая промышленность СССР с 1963 г. выпускает живые вакцины против НБ из лентогенных штаммов «В1» и «Ла-Сота» и мезогенного штамма «Н», позднее был начат выпуск вакцины из лентогенного штамма «Бор-74-ВГНКИ» [44] и из мезогенного штамма «ГАМ-61» [66; 72].

В биотехнологии живые вакцины производятся на эмбрионах из куриных яиц, не содержащих специфических патогенов (СПФ). Матровую расплодку вакцины инокулируют в аллантоисную полость 9-11-дневных КЭ, а после инкубации собирают аллантоисные жидкости. После прохождения серии тестов по контролю качества аллантоисные жидкости, дополненные стабилизаторами, подвергаются лиофилизации [214; 524]. Этот процесс имеет

решающее значение для сохранения содержания антигена и срока годности вакцин. Кроме того, определение 50%-ной эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) является ключевым показателем для оценки уровня антигена и эффективности живых вакцин. Исследования подтвердили взаимосвязь между дозой вируса в живой вакцине (в ЭИД₅₀) и протективной эффективностью [30; 40; 71; 171]. В экспериментальных условиях СПФ цыплята, вакцинированные живой вакциной из штамма «Ла-Сота» в дозе 4-5 lg ЭИД₅₀, были защищены от заболеваемости и смертности, хотя заражение и репликация вируса-возбудителя не снижались [171]. Доза 6 lg ЭИД₅₀ является минимальным требованием для живых вакцин, чтобы обеспечить полную защиту и снизить выделение вируса [171], хотя у многих иностранных производителей живых вакцин против НБ в одной прививной дозе содержится 5,5 lg ЭИД₅₀ [71].

Таким образом, основные цели вакцинации против НБ могут быть достигнуты при использовании достаточно высокой дозы живой вакцины. Однако на практике увеличение дозы вакцины приводит к росту затрат на борьбу с заболеванием [250].

Основная сложность, связанная с применением традиционных живых вакцин против болезни Ньюкасла состоит в их возможном несоответствии циркулирующим вирулентным вирусам. Поскольку вирусные РНК-зависимые РНК-полимеразы имеют высокую частоту мутаций во время синтеза РНК [450], вирус НБ, как и другие РНК-вирусы, быстро эволюционирует [403]. Следовательно, основным фактором, ограничивающим эффективность коммерческих вакцин против НБ, является ограниченная генетическая и антигенная совместимость между вакцинными штаммами и штаммами, возникающими и циркулирующими в природе. Несмотря на то, что ВНБ относится к одному серотипу, между обычными живыми вакцинами и вирусами, присутствующими в природе, существуют значительные генетические и антигенные различия [287; 543]. Многие исследования показали, что гомология аминокислотных последовательностей белков F и HN между штаммом «Ла-Сота» и штаммами генотипа VII составляет 87–89% и

87–88% , соответственно [398; 535]. Например, в Латинской Америке наиболее распространённые генотипы, поражающие птицеводческие фермы, соответствуют генотипам V, VI, VII, XII и XVI [98], а идентичность между вакциной из штамма «Ла-Сота» и преобладающими штаммами составляет 87–89% [339].

По вопросу гомологичности вакцинных штаммов ВНБ циркулирующим вирулентным изолятам существуют две противоречивые точки зрения. В некоторых исследованиях указывается, что антигенная разница между вакцинами и преобладающими штаммами не является основной причиной вспышек заболеваний в полевых условиях. Главным образом, низкий иммунитет поголовья, вызванный ненадлежащей практикой вакцинации, может быть причиной недостаточной защиты, обеспечиваемой живыми вакцинами [189; 245; 313; 484]. Также иммуносупрессия у птиц в полевых условиях, вызванная, например, циркуляцией вирулентного вируса инфекционной бурсальной болезни или стресс-факторами (наличие дексаметазона и афлатоксина в корме, тепловой стресс), может снижать эффективность применяемых протоколов вакцинации [337; 383; 404]. Dortmans Jos в своих исследованиях показал, что живая вакцина против НБ, антигенно адаптированная к штамму «NL/93», не обеспечивает более надёжную защиту по сравнению с классической живой вакциной генотипа II. При заражении штаммом «NL/93» ВНБ цыплята, вакцинированные классической вакциной, были полностью защищены от клинических проявлений заболевания и смертности, а выделение вируса было значительно снижено даже при предположительно неоптимальной дозе вакцины. В экспериментальных условиях штаммы вакцины QV4 и «Ла-Сота» ВНБ успешно защищали кур от заболеваний и смертности, вызванных генотипом VII и одним штаммом генотипа XVII ВНБ, при этом не было выявлено существенных различий в количестве выделяемого вируса при сравнении двух схем вакцинации [461]. Эти результаты позволяют предположить, что вспышки и распространение вирулентных полевых штаммов ВНБ могут быть

вызваны не антигенными вариациями, а слабым иммунитетом стада из-за ненадлежащей практики вакцинации [189]. Первая точка зрения подчёркивает важность достаточной вакцинации для повышения эффективности живых вакцин в полевых условиях.

С другой стороны, доказано опытным путем, что введение живых вакцин против НБ, гомологичных циркулирующим вирусам, приводит к снижению выделения вируса в стаде [115]. В эксперименте применение в схеме одной экспериментальной и двух коммерческих живых рекомбинантных вакцин из генотипа VII обеспечивали лучшую защиту кур от полевых изолятов, чем вакцина из штамма «Ла-Сота» [179; 535]. Также исследования показали, что живая рекомбинантная вакцина против НБ, экспрессирующая гены F и HN генотипа VII, была более эффективна в снижении выделения вируса, чем штамм «Ла-Сота» ВНБ [98]. Более того, убедительные доказательства, подтверждающие этот вывод, были получены в ходе исследований инактивированных вакцин против ньюкаслской болезни, которые подробно рассматриваются ниже. Недавно была предложена механистическая модель ускользания от иммунитета, зависящая от титра антител, и в этой модели вирус вакцины может быть нейтрализован низкими титрами антител, индуцированными гомологичной вакциной, в то время как для нейтрализации полевых штаммов, содержащих вариации основных нейтрализующих эпитопов, требуются более высокие титры антител. Эта модель подтверждает необходимость разработки вакцин, гомологичных полевым вирусам [426]. Таким образом, для обеспечения надёжной защиты в полевых условиях необходимы как вакцины, соответствующие генотипу, так и надлежащие процедуры вакцинации.

Основная задача при создании живых вакцин против вирулентного вируса Ньюкасла, соответствующих генотипу, заключается в том, чтобы обеспечить как антигенность, так и безопасность. Для создания живых вакцин против НБ, соответствующих генотипу, используются две основные стратегии. Некоторые вирулентные штаммы могут быть ослаблены с

помощью обратной генетики и модифицированы для получения модифицированных живых вакцин [262; 416; 508; 535]. Вирулентные штаммы ослабляются путём модификации сайта расщепления F, а дополнительные специфические мутации в L-белке могут дополнительно гарантировать безопасность ослабленного вируса [262]. Другая стратегия заключается в замене защитных антигенов F и HN лентогенного вируса соответствующими белками из распространённых вирулентных штаммов, при этом сайт расщепления F обычно мутирует [130; 164]. Несколько живых рекомбинантных вакцин против NDV этого типа имеются в продаже в Корее (живая вакцина Himmvac Dalguban N (Plus)), Египте (живая ослабленная вакцина RINNOVAC ELI-7) и Мексике (Genovax N5). В Китае Wang с соавторами разработали новую вакцину под названием LX-OAI4S, объединив два штамма с разными генотипами (I и VII), которая обеспечивает надёжную защиту от болезни Ньюкасла генотипа VII и хорошо работает даже при наличии у кур материнских антител [508]. Важно отметить, что данный препарат можно применять с помощью спрея, что делает его перспективным средством для птицеводства, позволяющим предотвращать вспышки заболевания и защищать поголовье. Происхождение лентогенных основ ВНБ может влиять на эффективность рекомбинантных вакцин. Так, в исследованиях ученых из Египта, рекомбинантная вакцина против генотипа VII на основе штамма «VG/GA» обеспечивала лучшую защиту бройлеров и значительно снижала выделение вируса после контрольного заражения [179]. Однако, безопасность вышеуказанных живых вакцин на основе вирулентных вирусов НБ следует тщательно контролировать, даже если исследования в хорошо контролируемых лабораторных условиях подтвердили их безопасность на подопытных животных.

Повсеместное использование живых вакцин является выгодным с коммерческой точки зрения по причине их низкой стоимости, а также возможности проводить иммунизацию птиц массовыми методами (выпойка, спрей или аэрозоль). Живые аттенуированные вакцины против болезни

Ньюкасла обладают высокой безопасностью, поскольку вакцинные штаммы низко- или авирулентны и обычно не вызывают побочных эффектов у птиц [250]. Однако при определенных условиях живые вакцины могут вызывать нежелательные реакции, такие как задержка роста, легкие респираторные симптомы, а в некоторых случаях – смертность и повышенную восприимчивость к другим патогенам, особенно к бактериям [502]. Живые аттенуированные вакцины против НБ могут успешно индуцировать как иммунитет слизистых оболочек, так и системный иммунный ответ, но остается риск обратных вирусных мутаций, которые могут возникать в полевых условиях [478]. Кроме того, изготовление живых вакцин требует специального уровня биологического оснащения в процессе производства, а также постоянной доступности холодильной цепи.

В связи с тем, что во многих странах с ненадёжным электроснабжением поддержание достаточного количества холодильного оборудования может быть сложной задачей, разработка и крупномасштабное производство эффективной термостабильной вакцины против болезни Ньюкасла представляются необходимыми для поддержки птицеводческой отрасли. Такие вакцины должны быть устойчивы к повреждениям, вызванным воздействием очень низких или очень высоких температур, чтобы не возникало опасений по поводу жизнеспособности вакцины при колебаниях температуры, которые могут происходить в экстремальных условиях, когда разница температур в холодное и тёплое время года может быть значительной. Поэтому разработкой термостабильных вакцин против болезни Ньюкасла для использования в регионах, где «холодовая цепь» ненадежна, занималось много ученых [94; 183; 416; 427].

Применение аттенуированных живых вакцин для профилактики болезни Ньюкасла не обеспечивает надёжную защиту птицы от вспышек, вызванных высоковирулентными ВНБ, что является существенным ограничением при использовании данного вида вакцин [155; 408]. Использование живых вакцин

против НБ может защитить птицу только от клинического переболевания вышеназванной инфекцией, но не способны блокировать репликацию и выделение филогенетически отличающихся вирулентных изолятов, особенно VII и XIII генотипов [251]. В результате птицы, иммунизированные живыми вакцинами, могут служить резервуарами вирулентного ВНБ, выделяя значительное количество инфекционного вируса в окружающую среду, что приводит к потенциальным вспышкам среди незащищенных птиц, находящихся с ними в контакте [409]. Так, спустя год после вспышки вирулентного вируса болезни Ньюкасла в Пакистане этот штамм был обнаружен у вакцинированных кур на нескольких фермах, несмотря на наличие высоких титров антител к вирусу болезни Ньюкасла ($>4,75 \log_2$). Данные свидетельствуют о возможной роли вакцинированных птиц в распространении ньюкаслской болезни [409].

Инактивированные вакцины

Иммунизация кур инактивированными вакцинами — это самая ранняя стратегия борьбы с ньюкаслской болезнью. Инактивированная вакцина представляет собой лекарственный препарат, содержащий в себе антиген инактивированного или убитого возбудителя заболевания с добавлением адъюванта, который помогает адаптировать иммунный ответ к иммунодоминантным эпитопам. Адъюванты служат в качестве иммуногенных компонентов, поскольку инактивированный вирус сам по себе обладает низкой иммуногенностью.

Наиболее распространенными адъювантами являются гидроксид алюминия и масляные эмульсии. Минеральные масла обладают более высокой иммуномодулирующей активностью в сравнении с гидроксидом алюминия, однако имеют ряд недостатков, затрудняющих их использование [207]. Например, известно, что некоторые минеральные масла вызывают сильные местные реакции у животных в месте введения, а также могут содержать

канцерогенные вещества, представляющие риск развития рака у потребителей мяса птицы [111].

Стоимость производства инаktivированных вакцин относительно высока. Лентогенные штаммы ВНБ, в том числе «La-Sota», «Ulster» и «B1», обычно используются в качестве основного матрового материала из-за высокого уровня накопления вируса в системе культивирования: на куриных эмбрионах или культуре клеток. Инаktivированные вакцины безопасны, так как вирусы не могут размножаться и распространяться среди иммунизированных птиц [419]. Инаktivированные вакцины вводятся индивидуально парентеральным путём, например, внутримышечно или подкожно, что делает их применение трудоёмким. Эти вакцины вызывают высокий и продолжительный гуморальный иммунитет, но плохо стимулируют клеточный или слизистый иммунный ответ.

Существует линейная зависимость между результатами анализа на гемагглютинацию и титром 50% эмбриональных инфекционных доз вакцинного вируса ньюкаслской болезни. В ходе исследований было установлено, что доза, обеспечивающая 50-% защиту, для эмульсионной вакцины из инаktivированного вируса НБ штамм «B1» составляет от 400 до 600 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). Была выявлена положительная корреляция ($R^2 = 0,97$) между выработкой антител и количеством ГАЕ на дозу вакцины. Титр гемагглютининов свыше $5 \log_2$ у вакцинированных птиц обеспечивал 100% защиту от заболеваемости и смертности и минимальная защитная доза на птицу составляла 1000 ГАЕ [310]. Однако, против высоковирулентных изолятов вируса болезни Ньюкасла защитный титр антител на уровне $5 \log_2$ является недостаточным [83; 318]. Несмотря на закрытый тип производства крупных и средних птицеводческих комплексов и многократную иммунизацию молодняка птиц живыми и инаktivированными вакцинами против НБ, в стадах сохраняется вирусоносительство, сопровождающееся потерей продуктивности и падежом части поголовья.

Одной из причин может быть наличие в стадах особей с низким титром антител против вируса НБ, которые не защищают их от полевого вирулентного возбудителя, присутствующего в помещении [20; 24].

Как и в случае с живыми вакцинами, на эффективность инаktivированных вакцин влияет степень их соответствия циркулирующим вирусам. В большинстве стран, где НБ является эндемическим заболеванием, птицам вводят инаktivированные вакцины на основе штамма «Ла-Сота». Примечательно, что аминокислотное сходство белков F и HN между традиционными вакцинными штаммами и циркулирующими вирусами НБ составляет 87–89% и 87–88%, соответственно [189; 344]. Инаktivированные вакцины на основе штамма «Ла-Сота» вызывают значительно более низкие титры гемагглютинирующих антител против гетерологичного вируса, чем против гомологичного антигена [249; 339; 375; 540]. Так, в исследовании китайских ученых каждая сыворотка нейтрализовала гетерологичный вирус, но титры нейтрализации всегда были в 3–6 раз выше в отношении гомологичного штамма, чем в отношении гетерологичного вируса. Значение коэффициента перекрёстной реактивности R между штаммами «aSG10» и «Ла-Сота» ВНБ составило 0,23, что указывает на слабую связь между ними и значительные антигенные различия в пределах одного серотипа [540]. Несмотря на то, что куры, вакцинированные традиционными вакцинами, могут быть полностью защищены от заболевания и смертности при контрольном заражении, они всё равно могут выделять большое количество вируса [251; 261; 274; 344]. Эти результаты могут объяснить частое возникновение нетипичной формы НБ у поголовья, вакцинированного традиционными вакцинами.

Mei Liu и др. в своем исследовании цыплят с разным уровнем антител в РТГА, вакцинированных наиболее широко используемой вакциной из штамма «Ла-Сота» (генотип II), заражали гетерологичными вирулентными штаммами ВНБ генотипов VII и IX, чтобы оценить, как уровень антител связан с клинической защитой и заражением или выделением вируса. В

экспериментальных условиях вакцина «Ла-Сота» смогла полностью защитить птиц от заболеваний и смертности, но для подавления выделения вируса требовался более высокий уровень антител. Количество птиц, выделяющих вирус, как правило, уменьшалось по мере увеличения титров гемагглютинирующих антител у вакцинированных птиц. Когда титры антител в РТГА достигали уровня $\geq 13 \log_2$ и $\geq 10 \log_2$ выделение вируса штамма «JSC0804» (генотип VII) и штамма «F48E8» (генотип IX) соответственно, было полностью подавлено. Однако, достаточно сложно обеспечить достижение и поддержание такого высокого уровня антител у всех особей в хозяйствах, иммунизированных в соответствии с обычной процедурой вакцинации. Кроме того, выделение вируса у вакцинированных птиц коррелировало с аминокислотным сходством между вакциной и тестируемыми штаммами: чем больше сходство, тем меньше было выделение вируса [318; 375].

Mohamed A. LebDAH с соавторами показали, что использование комбинации живой аттенуированной вакцины с инактивированной вакциной против НБ, генетически соответствующей штамму, а затем ревакцинация одной из доступных живых вакцин могут считаться одной из наиболее эффективных программ против текущей полевой инфекции высоковирулентным вирусом ньюкаслской болезни в Египте [115; 297].

В отличие от ситуации с живыми аттенуированными вакцинами, в инактивированных вакцинах против НБ легче решить проблему подбора генотипа с помощью обратной генетики. Рекомбинантные вакцины, специфичные для генотипа VII NDV, были созданы с помощью различных стратегий [146; 164; 249; 534; 535]. Некоторые из этих вакцин-кандидатов уже поступили в продажу в разных странах [249; 460]. Корейские ученые разработали рекомбинантную вакцину-кандидат генотипа VII (KBNP-C4152R2L), экспрессируя гены F и HN в основе штамма «Ла Сота» [164], и этот кандидат был выпущен на рынок в виде живых и инактивированных вакцин. Исследования показали, что эта вакцина обеспечивает более

надежную защиту, чем из штамма «Ла-Сота», с точки зрения снижения выделения вируса [179; 460]. Кроме того, в Китае была разработана ослабленная вакцина против ВНБ генотипа VII (A-VII), где была изменена аминокислотная последовательность в месте расщепления F [249]. По сравнению с вакциной из штамма «Ла-Сота» инактивированная вакцина A-VII вызывала более быстрый и сильный иммунный ответ, полностью защищая цыплят от заражения вирусом генотипа VII и значительно снижая выделение вируса. Примечательно, что снижение выделения вируса после контрольного заражения впервые было включено в Китайскую ветеринарную фармакопею в качестве ключевого стандарта для проверки эффективности вакцин против ньюкаслской болезни. На 5-й день после заражения у не менее чем 7 из 10 вакцинированных цыплят фекальные мазки должны быть отрицательными на наличие вируса в ПЦР [250]. Вакцина A-VII также может использоваться для борьбы с болезнями у гусей [249]. После коммерциализации A-VII в 2014 году и последующего широкого применения этой вакцины в птицеводстве заболеваемость ньюкаслской болезни резко снизилась, а циркуляция вирулентного генотипа VII вируса НБ в птичьих хозяйствах в Китае была практически сведена к нулю (согласно данным Официального ветеринарного бюллетеня Китая).

В Египте Hesham A. Sultan с соавторами изучали эффективность вакцины против болезни Ньюкасла генотипа VII на промышленных несушках. Ими было установлено, что комбинация живых вакцин против ВНБ генотипа II и рекомбинантных инактивированных вакцин генотипа VII обеспечивала лучшую защиту от выделения вируса, при анализе оценки мазков из трахеи (20% и 0% по сравнению с 60% и 40%) и мазков из клоаки (20% и 0% по сравнению с 20 % и 20 %), взятых на 3-й и 5-й день после контрольного заражения, соответственно. Кроме того, уровень яйценоскости у птиц, получавших инактивированную вакцину против ньюкаслской болезни, соответствующую генотипу VII, и у птиц, получавших инактивированную вакцину против генотипа II, составил 76,6, 79, 82 и 87,4 % и 77,7, 72,5, 69 и

82,5 % на 7, 14, 21 и 28-й день после вакцинации, соответственно. Результаты этого исследования показывают, что рекомбинантная инактивированная вакцина против НБ, соответствующая генотипу, в сочетании с живой аттенуированной вакциной может снизить выделение вируса и повысить яйценоскость кур-несушек, заражённых вирусом велогенного генотипа VII вируса НБ, в полевых условиях [460].

Также в Египте, при изучении эффективности вакцин против НБ на бройлерах было установлено, что использование гомологичного генотипа ВНБ в инактивированной вакцине обеспечивало более высокую клиническую защиту с точки зрения потери массы тела и смертности при заражении вирулентным вирусом генотипа VII. Однако, гетерологичная ассоциированная вакцина с гриппом H5 индуцировала самый высокий клеточно-опосредованный иммунный ответ и титры ингибирования гемагглютинации при самом низком титре выделения вируса [423].

Вакцины, соответствующие генотипу, являются гомологичными преобладающим вирусам и более эффективны для профилактики ньюкаслской болезни и в предотвращении выделения вируса после заражения, что подтверждалось также другими учеными в Малайзии [412], Индонезии [375], Пакистане [504], Иране [429], Иордании [410], Египте [114; 124; 328], Бангладеш [241; 242], Перу [258] и Казахстане [101]. Вакцины против НБ, антигенный состав которых приближен к потенциальным возбудителям заболевания в регионе, могут обеспечить более эффективную защиту, снижая передачу вируса от инфицированных птиц [344].

При изучении реакции кур на две инактивированные вакцины из II и VII генотипов ВНБ на молекулярном уровне было установлено, что вакцина против генотипа VII влияет на иммунный ответ, подавляя нейровоспаление. Она также усиливает процесс синаптогенеза, который обычно происходит в нервной системе, что указывает на механизм нейротрофического действия штамма генотипа VII. Было сделано

предположение, что снижение активности иммунной системы коррелирует с защитой нервной системы от избытка лейкоцитов и активности цитокинов. Напротив, вакцина из II генотипа подавляла апоптоз за счёт снижения уровня PERK/ATF4/CHOP в рамках пути реакции на развёрнутый белок, но не влияла на экспрессию того же пути синаптогенеза. Таким образом, применение инактивированной вакцины из VII генотипа следует рассматривать в странах, где он является основной причиной вспышек НБ [374].

Таким образом, возникает вопрос о том, какие генетические или антигенные вариации чаще встречаются в полевых вирусах под воздействием гомологичных вакцин. Недавнее исследование, проведённое с использованием метода нейтрализации сывороток *in vitro*, показало, что не существует значительных различий в вариациях генов F и HN генотипа VII NDV под давлением отбора, вызванного гомологичными и гетерологичными вакцинами [309]. Это открытие указывает на то, что применение вакцин, соответствующих генотипу, может не изменить вариацию генотипа VII ВНБ.

В то же время некоторые ученые публикуют данные, что существующие вакцинные препараты против НБ с высоким уровнем антигена обеспечивают такой же уровень клинической защиты, как и из современных штаммов, и что антигенная гетерогенность циркулирующих штаммов не влияет на профили выделения вируса у иммунизированных птиц. Так, Sahar Mahmood и др. установили, что после двукратной вакцинации цыплят инактивированными препаратами из штаммов «Ла-Сота» и контрольной вакциной из штамма «AV632-chicken-Cyprus-13» (генотип VII.2) серологические реакции различались, хотя обе группы продемонстрировали схожий уровень клинической защиты при заражении вирулентным штаммом «AV632-chicken-Cyprus-13» по сравнению с непривитой группой, в которой наблюдалась 100%-ная смертность. Выделение вируса было значительно снижено в вакцинированных группах по сравнению с не вакцинированной группой. Был сделан вывод, что способность вирулентного вируса НБ APMV-1 вызывать

заболевание у вакцинированных птиц вряд ли является результатом только антигенного несоответствия, и, вероятно, другие факторы способствуют неэффективности вакцинации и возникновению заболевания [327].

Помимо вакцин для кур и гусей, существует большой спрос на вакцины против ньюкаслской болезни, предназначенные для голубей. В отличие от ньюкаслской болезни, вызываемой вирусами других видов, вирусы, также известные как парамиксовирус голубей PPMV-1 (в основном генотип VIb), проявляют специфичность к голубям. Этот генотип также является поздним генотипом, демонстрирующим высокую генетическую и антигенную изменчивость по сравнению с традиционными вакцинными штаммами [399]. Инактивированные вакцины на основе штаммов «Ла-Сота» или «Ulster» могут обеспечить полную защиту от заражения PPMV-1, в то время как они вызывают более низкие титры HI против PPMV-1 и не снижают выделение вируса у голубей [453]. Более того, PPMV-1 можно модифицировать с помощью обратной генетики, чтобы повысить его безопасность, антигенность и выход вируса, что может стать перспективным направлением для разработки вакцин против НД голубей.

Ревакцинация с использованием инактивированных вакцин вызывает эффективный иммунный ответ, опосредованный антителами, который обеспечивает защиту в течение всего периода яйцекладки с увеличением яйценоскости и эффективным переносом материнских антител [112]. Недостатком инактивированных масляных эмульсионных вакцин является более высокая стоимость их производства, которая, впрочем, может быть компенсирована за счет производства поливалентных вакцин [347; 418].

Абсолютное большинство инактивированных вакцин вводятся индивидуально каждой птице внутримышечно или подкожно и активнее стимулируют гуморальный иммунитет, чем клеточный, однако существуют экспериментальные препараты, вводимые интраназально и стимулирующие, как следствие, слизистый иммунитет – мукозальные вакцины. Такие вакцины

имеют в своем составе липосомы, в которые заключен антиген. В таком виде антигены могут избежать разложения или нейтрализации в тканях, а также высвободиться в течение длительного периода *in vivo*. Основная проблема, связанная с использованием инактивированных вакцин, вводимых через слизистую оболочку, заключается в том, что они, как правило, обладают низкой иммуногенностью и могут вызвать заболевание [489].

Векторные вакцины

Создание мультивалентных вакцин может расширить спектр вакцин и повысить эффективность вакцинации в птицеводческой отрасли. Традиционно для производства мультивалентных вакцин для птиц требуется определённая концентрация антигена для поддержания достаточной дозы каждого антигена, что, несомненно, усложняет весь процесс и увеличивает стоимость. В качестве альтернативы перспективными системами для разработки бивалентных или мультивалентных вакцин для птиц стали вирусные векторные платформы [411]. Гены защитных антигенов патогенов-мишеней встраиваются в геном вируса-носителя с помощью молекулярно-биологических технологий, и рекомбинантные вирусы экспрессируют чужеродные антигены в процессе репликации. По сравнению с традиционными многокомпонентными вакцинами у вакцин на основе вирусных векторов есть несколько преимуществ, в том числе одновременная экспрессия нескольких защитных антигенов в одном вирусном векторе, отсутствие необходимости в концентрировании антигена, индукция гуморального, клеточного или слизистого иммунитета, высокая генетическая стабильность и безопасность.

Вакцины на основе вируса оспы кур

С 1990-х годов учёные экспрессировали гены F или HN вируса Ньюкасла в геноме вируса оспы птиц (ОП), и полученные в результате рекомбинантные вакцины могут защищать кур от заражения вирулентными вирусами Ньюкасла [139; 482]. На рынке доступны как минимум две коммерческие вакцины против вируса Ньюкасла на основе вируса ОП, в том числе TROVAC-NDV от

Boehringer Ingelheim и VECTORMUNE FP-N от Ceva. Вирус оспы птиц - самый крупный вирус животных, и его геном обладает высокой способностью включать чужеродные гены. Кроме того, вирус ОП имеет ограниченный круг хозяев и поэтому безопасен для других видов животных. Иммунизация вакцинами против НБ, основанными на вирусе ОП, проводится путём подкожной инъекции или прокола перепончатого крыла, поэтому их массовое применение затруднено. Кроме того, наличие высоких титров материнских антител против вируса оспы птиц у коммерческих цыплят сильно снижает эффективность вакцин на основе возбудителя ОП [464]. Эти недостатки вектора вируса ОП означают, что его использование для доставки вакцин против НБ крайне ограничено.

Векторные вакцины против НБ на основе вируса герпеса индейки

Вакцины против ньюкаслской болезни на основе герпесвируса индеек (HVT) являются успешным примером коммерческих векторных вирусных вакцин для домашней птицы. HVT, также известный как вирус болезни Марека 3-го серотипа (ВБМ), является одним из наиболее широко используемых вирусов для создания новых векторных вакцин. В начале 1990-х годов в геном HVT был встроен ген F вируса ньюкаслской болезни, и полученный в результате рекомбинантный вирус может обеспечивать двойную защиту от вируса ньюкаслской болезни и вируса болезни Марека [352]. На рынке доступны коммерческие вакцины против НБ с вектором HVT, в том числе Vectormune ND от Ceva, Innovax-ND от MSD, Poulvac Procerta HVT-ND от Zoetis и NEWXXITEK™ HVT + ND от Boehringer Ingelheim (данные PoultryMed). Вакцина Vectormune ND вызывает отсроченный, но стойкий иммунитет и обеспечивает хорошую защиту от заражения вирусом NDV [371; 430]. Ген F штамма NDV D26-76 генотипа I экспрессируется в штамме HVT «FC-126». Несмотря на то, что вирус-донор гена F отличается от циркулирующих вирусов, вакцина «Vectormune ND» все равно может обеспечить защиту от гетерологичных генотипов (IV, V и VII) и снизить выделение вируса [197; 370]. В частности, вакцина против НБ на основе HVT-

вектора снижает выделение вируса более эффективно при внутримышечном введении по сравнению с интраназальным введением, что позволяет предположить, что вакцина вызывает сильный системный иммунитет [370]. В регионах с низким риском НБ введение вакцины Vectormune против НБ путем инъекции *in ovo* 18-дневным эмбрионам или подкожной инъекции суточным цыплятам может обеспечить достаточную защиту. В регионах со средним и высоким уровнем риска заражения НБ рекомендуется проводить первичную иммунизацию с использованием вакцины «Vectormune ND» и ревакцинацию живыми вакцинами через 2–3 недели для создания надёжной защиты.

К достоинствам вектора герпес вируса индеек HVT относятся следующие: 1) геном HVT большой, с высокой способностью включать в себя несколько чужеродных генов; 2) взаимодействие материнских антител с HVT незначительно, что позволяет проводить раннюю вакцинацию цыплят; 3) массовое введение вакцин на основе HVT можно проводить в инкубаториях путём интраокулярной инъекции или подкожной инъекции суточным цыплятам; 4) вакцины на основе HVT могут обеспечивать пожизненную защиту благодаря постоянной инфекции ВБМ; 5) вакцины на основе HVT могут вызывать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Эти преимущества обеспечивают успех вакцин на основе HVT во всём мире, в том числе в борьбе с вирусом болезни Ньюкасла субгенотипа VII L [185; 209; 225; 401; 436]. Кроме того, инструмент редактирования генома CRISPR/Cas9 можно использовать в качестве простого и быстрого подхода к разработке рекомбинантных вакцин на основе HVT [152; 480]. Разработаны вакцины, где ген F вируса ньюкаслской болезни генотипа VII был встроен в вакцинный вирус герпесвируса индейки: rHVT-005/006-F и rHVT-US2-F [430]. У однодневных СПФ цыплят, иммунизированных вышеуказанными вакцинами в дозе 2000 ед., выработался устойчивый гуморальный иммунитет и полная защита при заражении вирулентным штаммом ВНБ F48E8 через четыре недели после вакцинации. В ходе другого исследования была создана вакцина

под названием rHVT-NDV-opti F путем вставки оптимизированного по кодам гена слияния F вируса болезни Ньюкасла генотипа VII в ген US2 вакцинного штамма HVT Fc126 с использованием технологии редактирования генов CRISPR/Cas9 в сочетании с двумя одноцепочечными направляющими РНК (sgRNA). Иммунизация однодневных цыплят, свободных от специфических патогенов, 4000 бляшкообразующими единицами рекомбинантного вируса НД-оптимизированного штамма F индуцировала выработку антител к вирусу НД и обеспечила 70% защиту от гомологичного вируса НД, эффективно снижая выделение вируса, клинические проявления, вирусную нагрузку в тканях и смертность [263].

Однако вектор HVT имеет некоторые ограничения, такие как отсроченное появление иммунитета и невозможность введения второй вакцины на основе HVT в той же группе [340; 411]. Кроме того, поскольку векторные вакцины на основе 3-го серотипа вируса болезни Марека представлены в виде замороженных суспензий клеток, для хранения вакцин требуется жидкий азот, что может ограничивать их применение в регионах, где нет необходимых условий.

Векторные вакцины против НБ на основе аденовируса

Рекомбинантные аденовирусы человека были предложены в качестве потенциальных мультицистронных векторов для поверхностных гликопротеинов вируса Ньюкасла, которые могут служить альтернативой ранее упомянутым вакцинным векторам. Аденовирусные векторы обладают значительными преимуществами, включая высокий уровень безопасности, генетическую стабильность и отсутствие у птиц естественного иммунитета к аденовирусам человека [208]. Исследователи из Китая, Великобритании, ОАЭ и Судана создали вакцину-кандидат на основе рекомбинантного аденовируса серотипа 5 (rAd5), в который в качестве антигена встроен ген HN вирулентного штамма GVII C22, а в качестве адъюванта используется гранулоцитарно-моноцитарный колоние-стимулирующий фактор (ChGM-CSF) [99]. Внутримышечное введение вектора rAd5-ChGM-CSF-HN цыплятам

приводило к более высоким титрам антител HI по сравнению с иммунизацией rAd5-HN (без адьювантного гена) и коммерческой живой вакциной «Ласота». Ting Xu и др. создали рекомбинантный аденовирус rAd5, который экспрессирует белок F вирулентного штамма GVII DHN3. После внутримышечной инъекции у кур наблюдалась 100-процентная выживаемость после контрольного заражения гомологичным вирусом DHN3, при этом у 86% не наблюдалось выделения вируса НВ [537].

Важной проблемой, связанной с аденовирусными вакцинами и другими векторными вакцинами, является необходимость строгого соблюдения холодовой цепи при транспортировке и хранении. Эта проблема была решена в ходе недавних исследований аденовирусного вектора, содержащего ген F вируса НВ, циркулирующего в Эфиопии [204; 205]. Авторы разработали экономичный метод производства рекомбинантного аденовируса в суспензии клеток НЕК293 и создали оптимизированные жидкие и лиофилизированные составы, которые сохраняли стабильность после шести месяцев хранения при температуре +4 °С. Двойная интраназальная иммунизация цыплят в возрасте 1–2 недель жидкой аденовирусной вакциной обеспечила полную защиту от гомологичного заражения вирусом Ньюкасла на 56-й день после первой вакцинации [205].

Векторные вакцины, на основе ВНБ

ВНБ является хорошим вектором для создания бивалентных или мультивалентных вакцин против болезни Ньюкасла и других инфекционных заболеваний домашней птицы [198; 253; 283]. У ВНБ есть несколько преимуществ при использовании в качестве вектора для вакцины: геном вируса НВ составляет ~15 килобаз, что позволяет легко манипулировать молекулами; вирус НВ обеспечивает высокую вирусную нагрузку в клеточных культурах, может стабильно встраивать и экспрессировать чужеродный ген, демонстрирует низкий риск обмена генами и рекомбинации, может вызывать слизистый, гуморальный и клеточный иммунитет и вакцины на основе ВНБ

можно вводить методом массовой вакцинации. Были созданы многочисленные вакцины-кандидаты на основе векторов ВНБ, включая препараты с вирусами гриппа птиц, ИББ и инфекционного бронхита (ИБК) [162; 198; 253; 283; 420].

Несмотря на то, что вакцины на основе вируса ньюкаслской болезни являются многообещающими, основной проблемой, связанной с их клиническим применением, является интерференция со стороны материнских антител [253]. При использовании общей стратегии создания вакцин чужеродные антигены встраиваются в оболочку вирусных частиц [255]. Таким образом, антитела против ВНБ, а также чужеродные антигены могут влиять на вакцины на основе векторов. Подтверждающие доказательства были получены Lardinois А. С соавторами в ходе исследования, продемонстрировавшего более сильную интерференцию антител против Н5 с вакцинами Н5 на основе ВНБ, чем с антителами против НБ у кур [295]. Для решения проблемы интерференции материнских антител (МАТ) ученые использовали две основные стратегии: «маскировку антигена» и «антиген-приманку». На основе слабой перекрёстной реактивности между ВНБ и другими серотипами парамиксовирусов птиц АРМВ была разработана стратегия «маскировки антигена» [358]. Гены F и HN NDV заменяются соответствующими генами АРМВ-2 или -8, и полученный химерный вектор не подвержен влиянию уже имеющихся у кур антител к ВНБ. Рекомбинантные вакцины на основе химерных векторов обладают высокой иммуногенностью и эффективностью у МАТ-положительных кур [281; 314; 449]. Недавно была представлена стратегия «антиген-приманка» для устранения помех, создаваемых чужеродными антигенами. Используя в качестве модели подтип Н5 АIV, гемагглютинин был экспрессирован в полноразмерной и секретируемой версиях в векторе ВНБ [357]. Секретируемая форма действует как приманка, которая может поглощать часть уже существующих антител к ГА. Таким образом, заякоренный в мембране белок ГА защищён от связывания с антителами ГА, что позволяет этим антигенам вызывать

специфический иммунитет. Поэтому недавно ученые предположили, что сочетание стратегий «маскировки антигена» и «антигена-приманки» может стать эффективным способом разработки новых вакцин на основе ВНБ, устойчивых к материнским антителам [252].

Экспериментальные разработки

Помимо вакцин, активно применяемых на рынке, существует ряд лекарственных препаратов, находящихся на стадии разработки. К ним относятся рекомбинантные субъединичные вакцины и вакцины на основе вирусоподобных частиц [210; 250; 402]. Благодаря наличию основных защитных антигенов белков F или HN иммуногенность и эффективность субъединичных вакцин против НБ сопоставимы с эффективностью цельновирусных инактивированных вакцин [301]. Системы экспрессии на основе растений являются привлекательной платформой для производства субъединичных вакцин для домашней птицы. Защитные антигены F и/или HN экспрессируются в различных растениях, таких как *N. benthamiana*, *Zea mays*, *Solanum tuberosum* и *Oryza sativa* [367]. Эти антигены могут вызывать выработку специфических антител или клеточный иммунитет у кур или мышей. Когда Shahid N. и др. вырастили белок HN вируса НБ в кукурузе и скормили курам листья и семена кукурузы, у них выработался специфический для ВНБ иммунный ответ в виде антител [428].

Другим типом экспериментальной вакцины против НБ является вакцина на основе вирусоподобных частиц (ВПЧ). ВПЧ по своей морфологии и размеру напоминают естественные вирусные частицы, но не содержат нуклеиновых кислот. В ВПЧ включены защитные антигены, которые могут стимулировать клеточный иммунитет и выработку антител. Ху Х. С исследователями создали вакцину-кандидат ВПЧ против вируса ньюкаслской болезни генотипа VII путем коэкспрессии генов М, F и HN в клетках sf9, вызывающую более длительный период защиты и более короткий период

выделения вируса при заражении штаммом ВНБ генотипа VII, чем инактивированная вакцина из штамма «Ла-Сота» [538].

Charlie Amoia с соавторами в своих исследованиях показали эффективность разработанной ДНК-вакцины против НБ из генотипа VII в Танзании по сравнению с традиционной вакциной из штамма «Ла-Сота» [116].

Массовое использование таких экспериментальных вакцин в настоящее время ограничено многими факторами, начиная от сложности производства и заканчивая высокой себестоимостью продукта, однако это не отменяет необходимости разработки альтернативных мер специфической профилактики болезни Ньюкасла.

В идеале целью программы вакцинации является выработка пожизненного иммунитета с помощью одной вакцины в как можно более раннем возрасте без побочных эффектов, связанных со смертностью, респираторными заболеваниями или замедлением роста [343]. Кроме того, вакцина должна вводиться массовыми методами, быть простой в хранении и содержать маркеры, позволяющие отличать инфицированных животных от вакцинированных (DIVA), что поможет вовремя определить очаг заболевания и принять своевременные меры.

1.2 Высокпатогенный грипп птиц

1.2.1 Общие сведения о гриппе птиц

В настоящее время в Кодексе ВОЗЖ по наземным животным «Грипп птиц» определяется как инфекция домашних птиц, вызываемая вирусом гриппа типа А высокой патогенности. При этом из определения «домашние птицы» (poultry) исключены домашние птицы подворий граждан, если они содержатся в отдельном домохозяйстве и продукты от них используются исключительно для внутреннего потребления. В предыдущих редакциях Кодекса и Руководства по диагностическим тестам и вакцинам вирусы ВГП и

H5/H7 НГП определялись как вирусы «гриппа птиц, подлежащего уведомлению в МЭБ».

Первое описание птичьего гриппа относится к 1878 году и было сделано в Северной Италии, где Edoardo Perroncito описал заразное заболевание кур на фермах в окрестностях Турина, сопровождающееся высокой смертностью. Заболевание, получившее название «птичья чума», поначалу путали с острой септической формой птичьей холеры [322]. Однако в 1880 году, вскоре после его первого описания, Rivolta и Delprato на основании клинических и патологических свойств показали, что это заболевание отличается от куриной холеры, и назвали его «Typhus exudatious gallinarum». Имеются сообщения о последующих вспышках высокопатогенного гриппа птиц в 1894 и 1901 годах в Италии, которые распространились вместе с поголовьем птицы, перевозимым с торговцами в Восточную Австрию, Германию, Бельгию и Францию [516]. В 1901 году Centanni E. и Savonuzzi E. определили, что чума птиц вызывается фильтруемым вирусом; однако только в 1955 году было показано, что классический вирус птичьей чумы относится к вирусу гриппа типа А на основании присутствия в вирусе гриппа типа А типоспецифичного рибонуклеопротеина. На Первом международном симпозиуме по птичьему гриппу термин «чума птиц» был заменён на более подходящий термин «высокопатогенный птичий грипп» [322].

С учетом патогенности вируса заболевание разделяют на две категории - высокопатогенный и низкопатогенный грипп птиц. К вирусам высокопатогенного гриппа птиц относят вирусы любого подтипа, у которых индекс внутривенной патогенности $\geq 1,2$, или вирусы, вызывающие при заражении птиц гибель $\geq 75\%$ с наличием базовых аминокислот в сайте разрезания гемагглютинина, а к вирусам низкопатогенного гриппа птиц – вирусы, в том числе подтипов H5 и H7, не отвечающие критериям, характерным для высокопатогенного гриппа птиц [527].

Таким образом в ВОЗЖ нотифицируются случаи высокопатогенного гриппа птиц, вызванного любым вирулентным вирусом или низкопатогенный грипп, обусловленный подтипом гемагглютинина H5 или H7.

Семейство *Orthomyxoviridae* (греч. *orthos* – правильный, *мухо* – слизь) представляет собой семейство РНК-содержащих вирусов [286]. Согласно таксономии вирусов 2022 года, семейство состоит из девяти родов: Alphainfluenzavirus (вид Alphainfluenzavirus influenzae), Betainfluenzavirus (вид Betainfluenzavirus influenzae), Deltainfluenzavirus (вид Deltainfluenzavirus influenzae), Gammainfluenzavirus (вид Gammainfluenzavirus influenzae) (соответствуют прежним родам А, В, С, D), а также родов Isavirus, Mykissvirus, Quaranjavirus, Sardinovirus и Thogotovirus [254]. Вирусы гриппа типа А подразделяются на подтипы. На сегодняшний день известно 18 подтипов гемагглютинина и 11 субтипов нейраминидазы, при этом большинство известных комбинаций сохраняется в популяциях диких птиц [52; 254; 462; 487; 511].

Вирионы вируса гриппа имеют наружную липопротеиновую оболочку, чаще сферической формы. Диаметр сферических форм варьирует от 80 до 120 нм. Тип симметрии нуклеокапсида – спиральный [365]. Внешняя оболочка вириона образована липидным слоем, содержащим три вирусных белка, два из которых являются поверхностными гликопротеидами: тример гемагглютинин (НА) и тетрамер нейраминидаза (NA) и третий – белок ионного канала – тетрамер М2. Функция НА состоит в прикреплении вируса к поверхности клетки и слиянии вирусной оболочки с клеточной мембраной. NA - это фермент, который отщепляет сиаловую (нейраминовую) кислоту, концевой сахарный остаток олигосахаридов, присутствующих в гликопротеинах и гликолипидах клеток млекопитающих и птиц. Это ведущий механизм для высвобождения вируса из клеток и распространения вируса по организму. Белок NA является мишенью для противовирусных препаратов с действующими веществами – осельтамивир и занамивир, которые широко применяются в протоколах лечения «птичьего» гриппа у человека [38].

Распространение высокопатогенного гриппа птиц в мире

Во многих странах мира Всемирной организацией по охране здоровья животных ежегодно регистрируют очаги гриппа птиц как среди домашних, так и дикой популяции. На данный момент выделено четыре волны межконтинентального распространения гриппа птиц (2005-2006, 2009-2010, 2014-2015, 2016-2025 гг.), которые характеризовались распространением вируса гриппа H5 линии A/goose/Guangdong/1/96 [54].

После появления вирусов H5 ВГП на обширных территориях в Юго-Восточной Азии в начале 2000-х годов произошло их беспрецедентное распространение по всему миру. Они достигли Европейского региона в 2005 г., в первое время вызывая эпизоотические волны (главным образом, в зимние месяцы) и приводя к последствиям разного масштаба. Эпизоотии проявлялись время от времени в форме волн с первичным заносом через перелётных птиц [14; 29; 36; 52; 82; 174]. Сначала эти волны приходили с перерывами вследствие изменения штамма вируса, однако с 2016 г. эпизоотия стала практически ежегодной на всей территории европейского региона, вплоть до перехода в эндемическую форму в ряде стран [174; 235]. В основе фундаментальных сдвигов в эпизоотологии гриппа птиц лежат антигенные изменения вируса, способствующие его непрерывной эволюции. Вирусы заражают орнитофауну, легко циркулируя в популяции диких птиц, что способствует их выживанию с одновременным заносом в окружающую среду, а это, в свою очередь, создаёт множественные угрозы заноса инфекции домашней птице, что опять же в свою очередь может быть источником инфекции для орнитофауны [206; 226]. Вирусы гриппа птиц перешли на годичный цикл: ныне во многих районах инфекция сохраняется в течение всего лета – это по сути новое явление, которое становится причиной непрерывной угрозы птицеводству [144; 174].

В соответствии с информацией, размещенной на сайте Всемирной продовольственной организации ООН (ФАО), в мире сохраняется

масштабное распространение вирусов гриппа птиц, вызывающих падеж как промышленной птицы (куры, индейки, утки и другие), так и дикой, а также млекопитающих. По данным Всемирной организации по охране здоровья животных за последние три года случаи птичьего гриппа были зарегистрированы в 108 странах и территориях на пяти континентах. К лету 2025 года инфекция была обнаружена у 83 видов домашних и диких млекопитающих, включая продолжающиеся случаи выделения вируса H5N1 у молочного скота в США.

Согласно ежегодному сводному отчёту Информационной системы по болезням животных (Animal Disease Information System, ADIS) Европейской комиссии за 2025 год отмечалась тревожная тенденция распространения высокопатогенного птичьего гриппа по всему континенту. Сводные данные, собранные в период с 1 января по 31 декабря 2025 года, свидетельствуют о 727 зарегистрированных вспышках штаммов H5N1 и H5 в коммерческом секторе птицеводства. Это больше, чем за весь 2024 г. (521) и 2023 г. (451). Наибольшее количество случаев выявлено в следующих странах: Германия - 174 вспышки; Польша - 127 вспышек; Венгрия - 107 вспышек; Франция - 106 вспышек; Италия - 68 вспышек [194; 312; 391]. Также наблюдается широкое распространение ВГП у диких птиц. Так, по состоянию на 26 ноября 2025 г. в базе данных Европейской комиссии было зарегистрировано 2884 вспышки гриппа и диких птиц в 34 странах (в 2024 г. 926 случаев в 32 странах).

Отмечен беспрецедентно высокий уровень заболеваемости ВГП среди диких птиц в Европе во время осенней миграции 2025 г. [195]. В период с 6 сентября по 14 ноября 2025 года в 26 странах Европы у диких птиц было обнаружено 1443 случая заражения вирусом высокопатогенного птичьего гриппа А (H5). Это в четыре раза больше, чем за аналогичный период 2024 года, и является самым высоким показателем за указанный период как минимум с 2016 года.

WOAH опубликовала критическое заявление о катастрофических последствиях высокопатогенного птичьего гриппа для популяций диких животных во всем мире [531]. Организация сообщила, что нынешняя пандемия гриппа птиц приводит к беспрецедентным экологическим нарушениям и высокой смертности среди быстро расширяющегося круга видов, что может подорвать стабильность экосистемы на несколько поколений вперед. В докладе приводятся ужасающие статистические данные, например, потеря почти 50 % самок южных морских слонов на острове Южная Джорджия и повторяющиеся вспышки ВГП, уничтожающие целые колонии чернобровых альбатросов на Фолклендских островах. Во время осенней миграции 2025 года в Европе была зафиксирована исключительно высокая активность ВГП у диких птиц, что в четыре раза больше, чем в 2024 году.

Во время продолжающейся в мире вспышки гриппа птиц, вызванной вирусом ВГП H5N1, были выявлены случаи заражения как птиц, так и многих видов млекопитающих. С 2022 по 2024 г. заметно изменился спектр и процентное соотношение нетипичных хозяев, зараженных возбудителем ВГП естественным путем. В процесс были вовлечены виды млекопитающих, у которых ранее болезнь не регистрировали, в том числе крупный и мелкий рогатый скот. Значительное увеличение выявленных случаев инфицирования млекопитающих с 139 в 2022 г. до 275 в 2023 г. связано с распространением инфекции и применением расширенных программ мониторинга гриппа птиц [149; 431]. Не исключено, что некоторые нетипичные хозяева могут быть значимыми резервуарами инфекции. Вирус ВГП H5N1 в последнее время легко преодолевает межвидовые барьеры, проникая в дикую природу, сельское хозяйство, и потенциально способен спровоцировать глобальную пандемию [290].

В настоящее время вирус поразил большое количество видов млекопитающих во всем мире [127; 149; 296; 393], в том числе тех, которые классифицируются как находящиеся под угрозой исчезновения, что

потенциально усугубляет их природоохранный статус [237]. Наиболее вероятным путем инфицирования млекопитающих является тесный контакт с больными птицами, причем некоторые данные свидетельствуют о возможной передаче инфекции от млекопитающего к млекопитающим [266; 296; 379].

Отмечена высокая способность вируса передаваться от птиц таким млекопитающим, как куньи (норки, выдры, хорьки, барсуки), кошачьи (домашние кошки, пумы, леопарды, рыси), ластоногие (обыкновенные тюлени, длинномордые тюлени), медведи (бурые, гризли, американские черные), афалины, скунсы, лисы, опоссумы, еноты. Проявления ВГП у млекопитающих варьируются от бессимптомных до тяжелых форм [137; 166; 186; 194; 231; 303; 393; 394]. На данный момент продолжается циркуляция штаммов вируса ВГП, которые уже адаптировались к различным видам млекопитающих.

Расширение спектра видов и увеличение числа зарегистрированных случаев связаны не только с распространением заболевания, но и с применением разными странами программ мониторинга ВГП [431].

В 2024 г. стали регистрировать случаи заражения коров вирусом гриппа А/Н5N1. Сообщения из США о положительных тестах на ВГП у молочного скота и коз, а также о вероятной передаче вируса подтипа Н5N1 между КРС в молочных стадах вызывают опасения из-за возможности быстрой адаптации и дальнейшей межвидовой передачи [136; 156; 354; 379]. У всех животных регистрировали сходные клинические признаки [140; 323]. Вероятным источником заражения явились корм или вода для коров, к которым имели доступ дикие птицы. Зарегистрированы случаи передачи ВГП от КРС к человеку [169; 219; 259; 510]. Вероятно, рекомбинация североамериканских вирусов произошла незадолго до начала вспышки заболевания среди КРС. Первоначально все изоляты, выделенные от КРС, относили к реассортанту Н5N1 клада 2.3.4.4b генотип В 3.13 [156]. Вспышка ВГП Н5N1 среди КРС, вероятно, оставалась незамеченной в течение

длительного периода. [390]. Исследователи оценили медианное время появления последнего общего предка (tMRCA) у крупного рогатого скота и птиц с вирусом H5N1 как 13 ноября 2023 года [533]. Основной причиной широкого распространения вируса H5N1 генотипа V3.13 среди поголовья крупного рогатого скота стала неспособность определить полный масштаб вспышки и ввести карантин и ограничения на перемещение животных на ранних этапах, до того как вирус распространился на другие стада [113]. В конце января 2025 года Служба инспекции здоровья животных и растений Министерства сельского хозяйства США (APHIS) подтвердила с помощью полногеномного секвенирования первое обнаружение высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 клады 2.3.4.4b генотипа D1.1 у молочного скота [118]. Генотип D1.1 получил широкое распространение среди диких птиц Северной Америки и является основным источником вспышек заболеваний среди домашней птицы, а также причиной тяжелых зоонозных инфекций в Луизиане и Британской Колумбии. Необходимы Национальная стратегия тестирования молока и постоянное тестирование (а также наблюдение за дикими и домашними птицами) для борьбы с текущей эпизоотией крупного рогатого скота. Линия D1.1 может привести к масштабной вспышке, как и V3.13 [380]. Продолжающаяся циркуляция высокопатогенного птичьего гриппа H5N1 среди крупного рогатого скота, диких птиц, а также полудомашних и диких млекопитающих вызывает серьёзные опасения по поводу адаптации вируса к нептичьим видам, включая свиней, о чём свидетельствует недавнее обнаружение генотипа D1.2 штамма HPAI H5N1 клады 2.3.4.4b у двух свиней, содержавшихся на открытом воздухе в штате Орегон, США [335].

Эпизоотическая ситуация, связанная с ВГП, сложившаяся в последнее время на территории США, вынудила American Association of Bovine Practitioners (AABP) принять решение о введении нового обозначения модификации вируса гриппа птиц, вызывающей заболевание у КРС: Bovine

influenza A virus (BIAV, вирус бычьего гриппа А) [142; 354]. Специалисты Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC) считают, что в настоящее время риск заражения населения вирусом ВГП незначителен, что не относится к тем людям, которые контактируют с инфицированными вирусом ВГП А/Н5N1 птицами или животными [158].

ВОЗЖ и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) продолжают наблюдение за ситуацией с целью определения рисков для здоровья животных и людей. Своевременная отчетность имеет решающее значение для объективной оценки обстановки по заболеванию и для предотвращения любого типа дезинформации. ВОЗЖ напоминает, что на основании имеющейся в настоящее время информации введение ограничений на перемещение здорового КРС и продуктов от них не рекомендуется, если это не оправдано анализом риска импорта, проведенным в соответствии с главой 2.1 Кодекса здоровья наземных животных ВОЗЖ [521; 523].

Клинические и патологоанатомические признаки гриппа птиц

Клиническая форма проявления заболевания и степень патологических изменений находятся в зависимости от вирулентности возбудителя. Инкубационный период заболевания обычно составляет от нескольких часов до нескольких суток в зависимости от вирулентных свойств возбудителя, заражающей дозы, вида, возраста птицы и условий содержания [123; 153; 154]. Однако, выделение вируса происходит раньше, чем проявляются клинические признаки, и продолжается после переболевания. Таким образом, инфекционный процесс продолжается от начала выделения вируса до прекращения выявления вируса в ротоглоточных и клоакальных мазках [442; 462; 466]. Грипп может протекать в молниеносной, сверхострой, острой, подострой, хронической и субклинической формах. Смертность при молниеносной, сверхострой формах часто приближается к 100%. Установлено, что при напольном содержании вирус распространяется быстрее, чем при клеточном. Считается, что взрослые птицы более

чувствительны, чем молодняк [123]. Высокочувствительными к заражению ВГП видами птиц являются, куры, индейки, куропатки, фазаны, перепела; из диких птиц – лебеди и поганки. Менее чувствительны гуси, утки и эму [3; 8; 86; 88; 107; 440].

Клинические признаки заболевания и патологоанатомические изменения при гриппе птиц весьма разнообразны и зависят от множества факторов [123; 247].

Острая форма ВГП у кур и индеек характеризуется внезапным появлением симптомов заболевания, при этом смертность может достигать 70-100% в течение 48 ч. В промышленном птицеводстве пик заболевания следует за постепенным снижением потребления воды и корма, что служит признаком системного заболевания в стаде [433]. У кур характерными клиническими признаками являются: угнетенное состояние, отказ от корма и воды, отсутствие реакции на внешние раздражители, взъерошенное оперение, дискоординация движений, парезы и параличи конечностей, синуситы, конъюнктивиты, истечения из носовых ходов, затрудненное дыхание, диарея зелено-черного цвета. На бесперьевых участках тела (гребень, борода, конечности) выражены отек подкожной клетчатки и цианоз, который переходит в некроз тканей. В продромальном периоде у несушек наблюдается снижение яйценоскости, депигментация скорлупы и деформация яиц, а вскоре полное прекращение яйцекладки. У менее восприимчивых птиц, таких как утки и гуси, преобладают нервные явления, включая тремор, нарушение координации движений, а так же помутнение роговицы глаза.

При сверхостром и остром течении болезни гибель наступает в течение 24-36 часов после инфицирования, что характерно для индеек и кур, при этом возможно отсутствие каких-либо характерных патологических изменений. В отдельных случаях отмечают гидроперикардиты, петехиальные кровоизлияния на брыжейке и перикарде.

При остром и подостром течении болезни у кур-несушек при вскрытии отмечают воспалительные процессы в яичниках и яйцеводах и желточные

перитониты. В 80% случаев выявляют множественные кровоизлияния (петехии, экхимозы) под серозными покровами, на слизистых оболочках респираторного и желудочно-кишечного тракта, эпикарде, в мозговой оболочке, кровоизлияния в тканях мышц голени. В селезенке, легких, печени, поджелудочной железе и почках обнаруживают очаги некрозов [2; 87; 91]. Также наблюдают нефромегалию, застойные изменения в легких, спленомегалию с неравномерно окрашенной паренхимой и увеличенный тимус [135].

При длительном течении болезни когда отмечаются нервные явления при вскрытии регистрируют негнойные поражения головного мозга. Такое течение болезни отчетливо выражено у гусей, уток, страусов и некоторых других видов птиц [294].

Таким образом, клиническая картина при гриппе птиц и патологоанатомические изменения зависят от вирулентности возбудителя вируса, которую принято измерять индексом внутривенной патогенности (IVPI). Чем выше индекс патогенности, тем тяжелее протекает заболевание. Индекс может принимать значение от 0 до 3. При IVPI равном трем летальность составляет 100%.

1.2.2 Профилактика и меры борьбы с гриппом птиц

В выборе стратегии борьбы с ВГП в странах мира традиционно применяются комплексные меры, включая быструю диагностику и надзор (непрерывный и систематический сбор, анализ и интерпретацию ветеринарных и медико-санитарных данных), уничтожение инфицированных стад (выбраковка, вынужденный убой, стемпинг-аут), биобезопасность и обучение работников птицеводства. Наиболее часто в планах стратегии борьбы указываются:

- карантин и дополнительные ограничения или меры контроля;
- наблюдение за домашней птицей в очаге;
- усиленные меры биобезопасности;
- просвещение и осведомленность фермеров и общественности о болезни;

- активное и пассивное наблюдение за домашней и дикой птицами в угрожаемой зоне;
- быстрая и точная диагностика;
- депопуляция и уничтожение (стемпинг-аут);
- убой инфицированной вирусом гриппа птицы;
- дезинфекция помещений и оборудования;
- обеззараживание и утилизация инфицированного материала;
- компенсация за вынужденный убой птицы частному сектору.

Большинство стран при возникновении очага ВГП обычно обращались к вынужденному убою птицы (стемпинг-аут). Однако, массовый вынужденный убой домашней птицы (инфицированной и/или здоровой) для сдерживания гриппа птиц вызывает колоссальные экономические потери для птицеводства и становится причиной резкого снижения доходов сельхозпроизводителей из-за потери продукции, что влечёт и социальные, и экологические, и экономические проблемы. Кроме того, грипп птиц из-за способности некоторых его штаммов с высоким и низким уровнем патогенности приобретать зоонозный потенциал стал проблемой здравоохранения населения.

В 2021-2025 гг. вспышки ВГП в мире оказали мощнейшее социально-экономическое воздействие на всю подотрасль птицеводства. Масштабы и размеры ущерба от данного заболевания создают значительные трудности и наносят урон, несмотря на усиление мер биобезопасности в птицеводческих хозяйствах. Традиционные способы контроля гриппа птиц, которые позволяли добиваться успешной ликвидации инфекции в какой-либо стране с восстановлением статуса благополучия, в настоящее время уже нельзя признать достаточными, ощущается потребность в дополнительных инструментах и опциях для предупреждения заноса инфекции и снижения урона [144].

Роль вакцинации в борьбе и профилактике ВГП является предметом дискуссии ветеринарных служб различных стран. Во многих развитых странах вакцинация в промышленном птицеводстве против ВГП – запрещена, за редким исключением в особых случаях. Под исключительными случаями понимается сохранение редких видов птиц, включая племенную когорту и экстренные случаи, когда есть угроза пищевой безопасности страны.

Вакцины против нотифицируемого гриппа птиц редко использовались в ЕС, главным образом из-за последствий для торговли продуктами, полученными от вакцинированной домашней птицы, а также из-за затрат, связанных с применением вакцин и дополнительного эпиднадзора. Вакцина может применяться для иммунизации зоопарковых, коллекционных видов птиц и в исключительных случаях для экстренной иммунизации.

У стратегии вакцинации есть несколько недостатков. Массовая вакцинация может привести к бессимптомному течению ВГП, может увеличить продолжительность инфекции и способствовать её передаче большему количеству птиц, даже несмотря на то, что репликация вируса в организме каждой заражённой птицы снижается [324]. Некоторые ученые являются противниками вакцинации, т.к. широкое использование вакцины против ВГП в популяции домашних птиц может усилить иммунное давление на вирус и стимулировать мутации, приводящие к быстрому антигенному дрейфу в антигенных участках [157; 466; 509]. Вакцинация против ВГП также является непрактичной для диких водоплавающих птиц из-за низкого охвата поголовья и относительно низкого иммунного ответа на вакцины [377].

В некоторых странах Азии и Южной Америки, вакцинация стала единственным способом защиты птицы, поскольку государства не в состоянии компенсировать экономические потери хозяйствам в случае проведения радикальных мер. Средства специфической профилактики против гриппа в основном были разработаны для кур, однако, в некоторых странах созданы вакцины против гриппа и для других видов – индеек, уток, гусей, а также для экзотических и зоопарковых видов птиц [14; 35; 56; 451]. В настоящее время

применяются коммерческие инактивированные вакцины на основе вирусов гриппа H5, H7 и H9.

Вакцинация против ВГП в промышленном птицеводстве впервые была применена в Мексике в 1995 г., тогда была использована инактивированная эмульсионная вакцина на основе вируса НГП с антигенной формулой H5N2 [298]. С этого же года началось применение вакцины из штамма вируса гриппа H7N3 в Пакистане, в основном в бройлерных хозяйствах. Наиболее масштабная компания вакцинации против гриппа H5N1 развернулась после 1996 г. в Китае, а затем в Египте, Индонезии и Вьетнаме [161; 476]. Кроме инактивированной вакцины в КНР применялись рекомбинантные препараты на основе вируса оспы птиц или вируса ньюкаслской болезни со вставками генов, кодирующих H5 и N1 [470]. В связи с нерациональностью проведения радикальных мер в Китае из-за угрозы продовольственной безопасности, там была утверждена стратегия массовой вакцинации, которая продемонстрировала удовлетворительные результаты. При этом вспышки ВГП H5 значительно снизились. В Китае в 2017 г. так же была введена массовая вакцинация против зоонозного гриппа H7N9, что позволило резко сократить число случаев заражения людей от инфицированных птиц (на 99,6%). Принятая в КНР стратегия обусловила огромную финансовую экономию и спасла сотни человеческих жизней, что сократило риск пандемии и негативные социальные последствия [161; 319]. Вакцинные штаммы, используемые для борьбы с ВГП H5 и H7 в Китае, обновляются каждые несколько лет с целью профилактики появления мутантных форм вируса.

Вакцинация домашней птицы от H5N1 в Китае, Индонезии и Египте привела к значительному снижению масштабов вспышек и исчезновению некоторых штаммов вируса (например, генотипа 2.1 в Индонезии и генотипа 7.2 в Китае), но полностью искоренить вирус оказалось непросто [199]. Полевые вспышки ВГП происходили и в странах, применяющих вакцины, главным образом из-за недостаточного охвата целевых видов, а так

же по причине антигенного дрейфа полевых вирусов, что наблюдалось в Китае, Египте, Индонезии, Гонконге и Вьетнаме.

Основным элементом успешного применения инактивированных вакцин является антигенное соответствие между поверхностным белком - гемагглютинином вакцинного и полевого вирусов. Существование большого количества подтипов вирусов вместе с известной вариацией различных штаммов внутри подтипа представляет серьезную проблему при отборе штаммов для производства инактивированных вакцин против гриппа типа А. В некоторых странах стратегии вакцинации предусматривают использование аутогенных вакцин, то есть вакцин, произведенных на основе эпизоотических изолятов, в других используются вакцины, изготовленные на основе вирусов, обладающих тем же подтипом гемагглютинина, но отличной нейраминидазой, что позволяет осуществлять DIVA-стратегию [155; 457].

Вакцинация домашней птицы может быть рекомендована при определенных условиях. Используемые вакцины должны соответствовать стандартам, описанным в руководстве ВОЗЖ [520]. Опасения по поводу ограничений международной торговли препятствуют использованию вакцинации, хотя включение ее в качестве инструмента контроля было одобрено международными стандартами, принятыми Всемирной ассамблеей делегатов ВОЗЖ. Неоправданные ограничения на торговлю домашней птицей и птицепродуктами от вакцинированных стад оказывают огромное влияние на сектор, который вносит значительный вклад в глобальную продовольственную безопасность и экономику [519]. На сегодняшний день вакцинация использовалась лишь в ограниченном числе стран в качестве профилактической, экстренной меры для защиты птиц от ВГП [102; 151]. По данным различных источников (включая ВОЗЖ), с 2005 г. более 30 стран прибегло к иммунизации против гриппа птиц [141; 173; 298; 473]. Странами, объявлявшими официальную вакцинацию, являются: Армения, Беларусь, Бангладеш, Доминиканская Республика, Китай (включая Гонконг), Египет, Сальвадор, Германия, Индонезия, Иордания, Казахстан, Корейская Народно-

Демократическая Республика, Кувейт, Лаос, Монголия, Мексика, Нигер, Пакистан, Перу, Сингапур, Судан, Туркменистан, Вьетнам, Эквадор, Уругвай и др. В некоторых европейских странах (Ирландия, Великобритания) иммунизация разрешена только в зоопарках [529; 530].

В США в мае 2023 г. служба Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) объявила, что одобрила экстренное использование вакцины против гриппа для предотвращения дополнительных смертей среди калифорнийских кондоров. До этой вспышки власти США заявляли, что строгих протоколов биобезопасности, включающих усиленные процедуры дезинфекции, а также уничтожение инфицированных птиц, достаточно, чтобы смягчить последствия ВГП [25]. В настоящий момент проводятся работы по созданию препарата для вакцинации КРС против ВГП, поскольку считается, что иммунизация поможет снизить риск распространения болезни на новые виды животных и уменьшить потенциальные убытки предприятий по выпуску молочной продукции. Вакцинация сельскохозяйственных птиц, а теперь уже и КРС, давно спорный вопрос у исследователей и фермеров в США. Производители обеспокоены стоимостью и сложностью иммунизации миллионов особей, а также торговыми ограничениями [169; 289]. В мае 2023 г. 27 стран – членов Евросоюза договорились реализовать стратегию вакцинации против гриппа птиц. Они разделили исследования между государствами: Франция работала над вакциной для уток, Нидерланды – для кур-несушек, Италия – для индеек, Венгрия – для пекинских уток. Предварительные результаты были многообещающими: в Венгрии смертность иммунизированных гусей (вакцина HVT-H5 производства Ceva Sante Animale) после заражения составила 2,93% против 76,23% в контрольной группе, наблюдалось также снижение выделения вируса в окружающую среду. В Италии клиническая защита индеек на высоком уровне была достигнута с помощью вакцины HVT-H5 и введения в качестве бустера субъединичной вакцины или ДНК-вакцины [522]. Результаты работы голландских исследователей показали, что обе протестированные векторные вакцины HVT-H5 производства Ceva Animal

Health и Boehringer Ingelheim эффективно защищают домашнюю птицу через восемь недель после иммунизации [221]. Франция стала первой страной в Европе, которая с октября 2023 г. ввела обязательную вакцинацию поголовья уток, несмотря на риск введения торговых ограничений со стороны третьих стран (США, Япония) [125; 234; 528]. После этого вспышки ВГП в хозяйствах среди вакцинированной птицы значительно сократились. В период с 2 декабря 2023 г. по 15 марта 2024 г. инфицирование вирусом гриппа птиц наблюдали преимущественно среди не вакцинированного поголовья домашней птицы. Количество случаев выявления ВГП у диких птиц и птиц на птицефабриках было меньше, чем за тот же период прошлого года [193]. Профилактическая вакцинация птицы в 2023–2024 гг. во Франции (вакцинировано более 60 млн. уток) помогла ограничить количество вспышек ВГП (десять в 2023–2024 гг. против приблизительно 400 в 2022–2023 гг.). За первый год кампании вакцинации уток во Франции общие затраты достигли 105 миллионов евро. Это, как отмечает ассоциация EASVO, значительно меньше, чем убытки в размере 1,4 миллиарда евро, понесенные во время кризиса высокопатогенного птичьего гриппа 2021-2022 годов. Тот факт, что Франция продолжает вакцинацию уже три года, можно рассматривать как доказательство эффективности программы [167]. В некоторых вакцинированных стадах уток наблюдались вспышки заболевания в местах с особенно высоким уровнем заражения гриппом, однако в вакцинированном стаде, где произошла вспышка, выделение возбудителя было крайне низким по сравнению с невакцинированным стадом.

Положительный эффект вакцинации против ВГП также отмечается в Бангладеш, где домашнюю птицу иммунизируют с 2012 г. Число вспышек гриппа птиц до вакцинации было в 18 раз больше, чем после. Результаты исследований, проведенных в Бангладеш, свидетельствуют, что вакцинация домашней птицы может быть частью целостной стратегии смягчения последствий ВГП, если она сопровождается мониторингом, предупреждающим скрытое распространение [256; 257].

Профилактическая вакцинация также успешно используется в Гонконге с 2003 г., где вспышки ВГП среди домашнего поголовья не регистрируют с 2018 г. [175]. В Чехии с помощью экстренной иммунизации (вакцина Nobilis Influenza H5N2) в 2021 г. удалось сохранить национальную породу – чешский гусь [522].

Признавая важную роль, которую вакцинация может выполнять в будущем для снижения инфекционного бремени и смягчения последствий ВГП, в 2021 г. ВОЗЖ внёс изменения в главы Наземного кодекса. Кодекс чётко предусматривает, что в тех случаях, когда программа вакцинации проводится надлежащим образом с необходимыми гарантиями и контролем, она не должна быть препятствием для безопасной торговли. Более того, благодаря технологическим инновациям и разработке новых вакцин открываются широкие возможности для повышения эффективности стратегий вакцинации[144].

Вакцины против ВГП могут снизить заболеваемость, повысить устойчивость к инфекции, ограничить выделение вируса и уменьшить его трансмиссию [138; 325]. При этом эффективность вакцин варьирует в зависимости от ряда факторов. Вакцинация далеко не всегда способна вызывать полный «стерильный» иммунитет [329], допускается, что привитые птицы могут быть заражены дикими вирусами, однако последствия от заражения будут не столь значительны, поскольку болезнь будет в субклинической форме. Поэтому любую программу вакцинации должна сопровождать дополнительная программа надзора или программа мониторинга для раннего выявления заноса диких вирусов и их скрытого распространения в ранее вакцинированной популяции.

Вакцинацию следует рассматривать как одну из составляющих общей программы профилактики и контроля, а не как замену общей среды с низким уровнем биобезопасности в условиях значительной угрозы. Положительных результатов можно достичь только при применении вакцинации в рамках комплексной программы контроля и профилактики. Обращение же к одной

только вакцинации ожидаемых результатов не даст [28; 144; 159; 298; 336]. В наихудшем случае, если вакцинация была проведена ненадлежаще, она может вызвать значительное распространение инфекции в популяциях и привести к её переходу в эндемическую форму. Часто причиной «неудачных» прививочных кампаний были нарушения в процедуре вакцинации, то есть неумение правильно прописывать вакцину домашней птице, попавшей в группу риска, в результате чего популяционный иммунитет не возникал; при этом меньшее число «неудач» было вызвано антигенным дрейфом полевых вирусов от вакцинных вирусов.

Любая долгосрочная стратегия профилактической вакцинации требует официальной оценки результатов в вакцинированных популяциях. Это включает мониторинг данных о заболеваемости и эффективности вакцин. Также важно учитывать возможные изменения вируса, которые могут привести к необходимости замены вакцины. В этом вопросе самый ценный опыт на сегодняшний день наработала Китайская Народная Республика, обладающая системой, благодаря которой вот уже 20 лет систематически в стране проводится оценка иммунитета птичьих стад и популяций в контексте циркулирующих в это время вирусов [22; 162]. Занос новых штаммов и повторное появление предыдущих штаммов тщательно контролируется с помощью систем пассивного надзора в вакцинированных и не вакцинированных популяциях. Эта система позволила осуществить 14 обновлений вакцины, используемой в обязательном порядке в товарном птицеводстве Китая [176]. Кроме того, из-за разнообразия вирусов, циркулирующих одновременно, для достижения максимального защитного эффекта в последние по времени вакцины систематически включается более одного штамма вируса.

Китайские ученые [319] проанализировали причины, по которым ВГП сохраняется в Китае, исходя из социально-экономических особенностей, включая биобезопасность домашней птицы, рынки живой птицы, транспортировку живой птицы, диких птиц, водоплавающих птиц, плотность

домашней птицы, поголовье домашней птицы и инфицированных птиц. Опираясь на наблюдения, собранные за 12-летний период с 2007 по 2018 год, они оценили эффективность применяемых в настоящее время в Китае стратегий (таких как выбраковка, массовая вакцинация и повышение уровня биобезопасности) для борьбы с этим заболеванием и пришли к выводу, что стемпинг-аут малоэффективен в борьбе с заболеванием, более действенным методом борьбы с вирусом ВГП в долгосрочной перспективе является повышение уровня биобезопасности. Будучи крупнейшим производителем мяса птицы в мире, Китай потерял относительно небольшое количество птицы во время трёх волн глобальных вспышек птичьего гриппа H5 и практически избавился от распространённых вирусов H7N9, появившихся в 2013 году [431]. Также китайские исследователи [306] проанализировали распространение линий ВГП подтипа H5 среди вакцинированной и не вакцинированной домашней птицы и диких птиц по всему миру в период с 1996 по 2023 год и установили, что передача вируса между различными популяциями хозяев происходит с задержкой во времени и что передача вируса от диких птиц к непривитой домашней птице происходит чаще, чем от диких птиц к привитой домашней птице.

Для достижения оптимальных результатов программы вакцинации должны сопровождаться другими инструментами контроля очагов болезни и снижения рисков. К ним относятся: поддержание высокого уровня биобезопасности, оперативная ликвидация вакцинированных инфицированных стад, установление карантинных зон, оперативное отслеживание источника инфекции и возможных направлений её распространения, строгий контроль перемещений птиц посредством выдачи разрешений, тестирование птицы перед отправкой и систематическая оценка эффективности программ вакцинации.

Из-за персистенции дикого вируса в иммунной популяции, привитой плохо подобранными вакцинами, может произойти «иммунный побег» от вариантов вакцины. Поэтому следует стремиться к тому, чтобы любая

зарегистрированная вакцина строго соответствовала предписанным стандартам иммунной индукции и перекрёстных иммунных реакций на целевые вирусы. Кроме того, выявленные в иммунных популяциях вирусы должны проходить тщательную и быструю оценку для определения: а) возможности вариантов вируса, способных на «иммунный побег»; б) наличия угрозы изменения профиля риска в генетически мутировавших вариантах с учётом зоонозного потенциала.

В вакцинированных против ВГП стадах следует проводить усиленный пассивный надзор, включающий клинический осмотр, проверку журналов для определения клинической истории, мониторинг суточного падежа. Данные недавних исследований подтверждают возможность раннего выявления инфекции H5 ВГП у птицы без клинических признаков с помощью системы рутинного исследования «нормальных» показателей смертности. Так, во время чрезвычайной ситуации по ВГП в Италии в 2021-2022 годах в секторе бройлеров был внедрен подход в соответствии с научным заключением EFSA ANAW Panel 2021, обычно применяемый на фермах по разведению уток и гусей для улучшения ранней диагностики инфекции, основанный на еженедельном отборе проб из пула или «ведерный отбор проб» мертвой птицы [363]. Принятая мера позволила подтвердить, что 15 бройлерных ферм были инфицированы вирусом ВГП, когда были готовы к отправке на бойню [227].

Стратегии DIVA может строиться на обнаружение антител или на выявлении патогена - «серологическая DIVA» (выявление антител к инфекции полевого вируса гриппа А) и «вирусная DIVA» (выявление вируса гриппа А) [455]. На уровне птичьего стада самый простой подход заключается в регулярном мониторинге контрольных особей - сентинел, оставшихся непривитыми в каждой из вакцинированных популяций. Однако данный подход оказался не эффективным из-за трудностей в идентификации контрольных особей, потерянных в больших стадах, по причине чего был практически отложен. Альтернативный этому подход предполагает тестирование на выявление полевого вируса гриппа А, которое может

проводиться на вакцинированных птицах путём выявления полевого вируса или антител к нему. Для выявления полевого вируса в вакцинированных стадах исследуют ротоглоточные или клоакальные мазки (индивидуально или в виде пулов), отобранные либо в суточной выборке павшей птицы или больных особей, либо в статистически случайной выборке стада до предписанных пределов (т.е. 95% уверенность в обнаружении 5% превалентности), для чего используются молекулярные методы, такие как ОТ-ПЦР или ИФА захвата антигена [144]. Такое тестирование должно проводиться с предопределённой регулярностью. Схемы, действующие в ЕС, предлагают тестирование (с некоторыми оговорками) не реже одного раза в 30 дней для профилактической вакцинации, и в 14 дней – для срочной вакцинации независимо от используемой системы [144].

При применении схемы серологической DIVA, используют несколько систем вакцинации, которые позволяют выявлять экспозицию полевым вирусом в вакцинированных популяциях. Первым вариантом было использование вакцины, содержащей вирус того же подтипа гемагглютинина, но с нейраминидазой (NA), отличающейся от полевого вируса. Антитела к NA полевого вируса действуют как естественные маркеры инфекции [155]. Применение этой системы в случае с H5 ВГП становится проблематичным, из-за того, что в последние годы полевые вирусы содержат различные типы NA. Улучшенным вторым вариантом серологической DIVA является использование вакцин, которые содержат только HA, например, рекомбинантных вакцин, что позволяет проводить валидные лабораторные анализы (ИФА) на присутствие антител к сохранным основным белкам вирусов гриппа птиц, а это, в свою очередь, указывает на инфекцию у привитых птиц. В случае с инактивированными вакцинами – тест может выявлять антитела к вирусным компонентам, которые возникают только при активной инфекции [122], однако этим системам предстоит пройти валидацию в полевых условиях. Вообще, мысль о использовании серологической DIVA сомнительна, так как инкубационный период высокопатогенного гриппа очень

короткий и антитела просто не успевают выработаться в организме птицы. Главным образом, все выявленные серологическими методами антитела носят поствакцинальный характер или могут быть вызваны низковирулентными вирусами гриппа.

Вирусы H5 ВГП циркулируют на планете уже более 30 лет, в результате чего диверсифицировались в популяциях птицы и животных и в скрытых нишах во многих регионах мира. Это привело к интенсивной генетической эволюции, вызвавшей появление нескольких подсемейств вируса гриппа. Перекрёстный защитный иммунитет между подсемействами вирусов H5 определён недостаточно ясно, добиться его с помощью некоторых вакцин довольно трудно, поэтому необходимо внимательно изучать эпизоотическую обстановку, оценивать вирусы, которые могут быть занесены и тщательно подходить к выбору вакцин, которые способны обеспечить максимально широкий защитный ответ. Не выяснено, связана ли эмерджентность антигенных вариантов с применением вакцин или вызвана неправильным их применением, но возникновение резистентности вызвало необходимость изменения вакцинных штаммов, чтобы привести их в антигенное соответствие с циркулирующими полевыми штаммами [157]. Все вспышки, регистрируемые с 2016 г. в Европейском регионе, были вызваны одной генетической группой или подсемейством, при этом по всему миру циркулируют вирусы других групп, которые с большой долей вероятности способны инфицировать птиц. Поэтому крайне важно, чтобы международные лабораторные сети не прекращали выявлять новые угрозы, отслеживать изменения в вирусах и официально разрабатывать системы обновления вакцинных штаммов с высокой эффективностью. Следует вести оценку вирусов, полученных в ходе вспышек, на предмет генетических и антигенных вариантов в рамках программы оценки эффективности вакцин, используемых на местах. Подобные системы уже действуют в случае с болезнями людей, и в том, что относится к животным, также имеются глобальные сети по гриппу,

как например OFFLU (Сеть ВОЗЖ и ФАО по гриппу животных), которая позволяет отслеживать изменения в вирусе и актуализировать применяемые вакцины с целью недопущения снижения защитного эффекта на уровне популяции [144]. Применение вакцин, не гарантирующих защиту, должны быть прекращено, их должны заменить вакцины, содержащие либо обновленные инактивированные штаммы, либо вставки НА в других вакцинных платформах. Кроме того, имеется много недавно валидированных наборов *in vitro* для прогнозирования соответствия штаммов [212], что сокращает потребность в дорогостоящих и ограниченных по времени исследованиях для оценки эффективности *in vivo*, при этом необходимо учитывать специфические факторы в зависимости от вида животных.

В некоторых случаях требуется более одного штамма или мозаичного антигена, чтобы защититься от всех вирусов, угрожающих какой-либо определенной стране. Для использования в контрольных программах допускается использование исключительно высококачественных вакцин, которые получили предварительное одобрение [522]. Надлежащее применение высококачественных вакцин имеет решающее значение для создания защитного иммунитета в популяциях домашней птицы.

В Российской Федерации с 2006 г. действовала стратегия ограниченной целевой вакцинации домашних птиц против ВГП, которая проводилась во всех субъектах. Вакцинация охватывала поголовье личных подсобных хозяйств и птицеферм открытого типа, расположенных вблизи водоемов – стоянок диких водоплавающих перелетных птиц. Для иммунизации применялись отечественные инактивированные эмульсионные вакцины на основе эпизоотического штамма A/duck/Novosibirsk/02/05/H5N1 генетической клады 2.2 2005 г. На территории России было зарегистрировано два препарата против ВГП/Н5 – вакцина ФКП «Ставропольская биофабрика» под торговым названием «Флу Протект Н5» и вакцина АО «Покровский завод биопрепаратов» с коммерческим наименованием «POKROV BIO Грипп птиц». Применение данной стратегии было направлено на предотвращение передачи

вируса восприимчивому поголовью, когда риск контакта между домашними и дикими перелетными птицами был максимальным.

С вступлением в законную силу «Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов высокопатогенного гриппа птиц от 24.03.2021 г. N 158», вакцинация в промышленных предприятиях закрытого типа против ВГП официально запрещена [61]. Однако разрешено вакцинировать птицу, содержащуюся в хозяйствах открытого типа (ЛПХ, КФХ).

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано три вакцины против высокопатогенного гриппа птиц: «Флу Протект Н5» из высоковирулентного вируса Н5N1 штамм «Новосибирский» ФКП «Ставропольская биофабрика» [34], «АвиФлуВак» из низковирулентного вируса гриппа Н5 штамм «Ямал» ФГБУ «ВНИИЗЖ» и «АВИВАК-ГП-Н5N1R» из реассортантного штамма PR8-Н5N1R вируса гриппа А/Н5N1 производства НПО «Авивак» [33]. Осенью 2025 г. поданы на регистрацию ассоциированные инактивированные вакцины «НьюФлюГард Тетра» и «НьюФлюГард Трио», включающие в свой состав антиген вируса гриппа Н5N1, разработанные в ООО «ЦБО Микроэкология» для производства на площадке ФКП «Армавирская биологическая фабрика».

Роль вакцинопрофилактики в предупреждении распространения низкопатогенного гриппа птиц Н9 абсолютно другая. Во многих странах мира вакцинация промышленного поголовья против НГП Н9 стала обычной практикой. С сентября 2021 г. и на территории России такая стратегия стала широко применяться на птицефабриках. Вакцинация родительского стада, а иногда и птиц финального гибрида, предотвратила экономические издержки многих предприятий, которые были связаны с ассоциированной формой течения НГП. На конец 2025 года в РФ зарегистрировано шесть вакцин отечественного производства, включающих антиген вируса НГП подтипа

H9N2. Китай внедрил долгосрочную программу вакцинации против низковирулентного гриппа птиц H9 в промышленном птицеводстве еще в 1998 году [233]. Италия, Израиль, Южная Корея, Марокко, Пакистан, Египет, Иран, Российская Федерация, Беларусь, Казахстан, Узбекистан и Объединенные Арабские Эмираты также пришли к иммунизации поголовья птиц против НГП H9. Вакцинация против НГП показала свою эффективность в снижении клинических заболеваний и производственных потерь, но не смогла сдержать распространение вируса H9N2 [14]. Для борьбы со вспышками низкопатогенного гриппа птиц в Корею с 2007 г. была разрешена к использованию инактивированная вакцина на основе вируса H9N2. Исследователи сообщили, что корейский вирус H9N2 подвергся антигенному дрейфу и эволюционировал в отдельные антигенные группы и стал избегать вакцинной защиты, это явление известно, как «иммунный побег» [232; 300; 302].

Вакцинация против ВГП была эффективной для стран с низким уровнем биозащиты и гигиены производства, когда сдерживание распространения инфекции радикальными мерами привело бы к катастрофическим последствиям, связанных с дефицитом животного белка и продовольственной безопасностью. Если ранее вакцинация против высокопатогенного гриппа птиц применялась в основном в странах с развитым внутренним рынком птицы и регионах с эндемичными штаммами, то в настоящее время, несмотря на угрозу торговых ограничений, всё больше стран начинают вакцинацию. Основные причины этого: интенсивное, зачастую неподдающееся контролю распространение ВГП и постоянное появление новых штаммов вследствие дрейфа генов и мутационных процессов, расширение круга восприимчивых животных с передачей инфекции домашним животным и человеку, а также миллиардные потери в случае вспышек ВГП на производстве.

Таким образом, в мире не существует единой стратегии в отношении вакцинопрофилактики высокопатогенного гриппа птиц. Положительные и отрицательные стороны стратегий борьбы с ВГП приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Положительные и отрицательные стороны стратегий борьбы против высокопатогенного гриппа птиц

Стратегии	Преимущества	Недостатки
Депопуляция	Возможность устранения заболевания при раннем выявлении и надежной биозащите	Слишком дорого, особенно если вирусы получили широкое распространение
		Ограниченное или неустойчивое последствие при слабом уровне биобезопасности в птицеводстве
	Способность свести к минимуму распространение вируса из подтвержденных инфицированных стад при правильном внедрении	Неприменим для диких птиц, которые свободно перемещаются и значительно превосходят по численности домашнюю птицу
		Как правило, требует, чтобы правительство и птицефабрики жертвовали своими прямыми интересами ради общественного блага
Биозащита	Способность значительно снизить риск заражения гриппом птиц и многими другими заболеваниями одновременно	Требуются различные строгие меры и дорогостоящее оборудование
		Как правило ограничивается свобода работников птицефабрики и животных
		Как правило, невозможно быстро устранить серьезные ситуации
Вакцинация	Отсутствие клинических признаков заболевания и массового падежа поголовья	Борьба с многочисленными типами вируса гриппа птиц обходится очень дорого
	Минимизация экономических и социальных последствий	Снижение экспортного потенциала
	Возможность сохранения реликтовых и ценных видов птиц в условиях эпизоотии	Изменение зоосанитарного статуса региона внутри страны, приводящего к соответствующим ограничениям
	Возможность сохранения племенного поголовья для последующего воспроизводства в условиях эпизоотии	Иногда приводит к бессимптомному заражению кур высокопатогенными вирусами
	Отсутствие риска для продовольственной безопасности и независимости стран	Иногда ускоряет мутацию вируса и его диверсификацию, что в долгосрочной перспективе усложняет заболевание
	Иногда позволяет быстро разрешить сложную ситуацию	Привлечение дополнительных материальных и человеческих ресурсов для выполнения мониторинговых исследований

Вирусы высокопатогенного птичьего гриппа H5Nx A/Goose/Guangdong/1/96 евразийской линии являются основными штаммами ВГП, выявляемыми по всему миру с 2005 года. Они распространились по всему миру, вызвав панзоотию, охватившую шесть континентов и представляющую постоянную угрозу не только для диких и содержащихся в неволе птиц и домашней птицы, но и для диких, содержащихся в неволе и домашних млекопитающих, а также для людей. Экология и эпидемиология вирусов гриппа, особенно клада 2.3.4.4b, изменились: более 489 видов птиц заразились и распространили вирус по миграционным маршрутам [474]. Это приводит к гибели многих птиц, в том числе исчезающих видов, и служит источником заражения домашней птицы и млекопитающих. Для изучения динамики распространения инфекций, что крайне важно для решения этой сложной проблемы в рамках концепции «Единое здоровье», необходимы более эффективный мониторинг и обмен данными о последовательностях вируса высокопатогенного птичьего гриппа, метаданными и вирусами между ветеринарными службами, органами здравоохранения, природоохранными организациями и секторами дикой природы и окружающей среды. Разработка соответствующих стратегий по смягчению последствий или внесение изменений в методы содержания, производства и продажи могут снизить риск проникновения вирусов на фермы, а также их распространения и эволюции, а также вероятность их попадания в популяции диких птиц. Подходы к профилактике высокопатогенного птичьего гриппа и борьбе с ним в странах, где эти вирусы клада 2.3.4.4b по-прежнему распространены среди домашней птицы, или в местах, подверженных риску проникновения вирусов через популяции диких птиц, включают меры по снижению последствий заболевания для домашней птицы (в том числе усиление биологической безопасности на фермах, вакцинацию, зонирование и разделение). Их внедрение отражает трудности, с которыми приходится сталкиваться при использовании только мер биобезопасности для профилактики заболеваний и только искоренения для борьбы с вирусами и их ликвидации [435; 536]. Кодекс

здоровья наземных животных Всемирной организации по охране здоровья животных разрешает вакцинацию домашней птицы при определенных условиях и без негативного влияния на статус страны, свободной от высокопатогенного птичьего гриппа, при условии проведения соответствующего надзора, что способствует безопасной торговле домашней птицей и продуктами птицеводства. Тем не менее опасения по поводу потери ценных экспортных рынков по-прежнему препятствуют более широкому использованию вакцинации [474].

1.2.3 Вакцины против гриппа птиц

В Наземном кодексе ВОЖЖ подробно изложен стратегический подход к безопасному и эффективному использованию вакцинации в рамках программы снижения угрозы и контроля ВГП [518]. Вакцинация должна использоваться как часть комплексной стратегии в сочетании с другими инструментами для предупреждения и контроля очагов и снижения последствий от болезни, которые рекомендуются в Наземном кодексе и Наземном руководстве (далее Кодексы).

Использование вакцинации против птичьего гриппа может быть рекомендовано при определённых условиях. Используемая вакцина должна соответствовать стандартам Наземного руководства. Вакцинация не сказывается на статусе благополучия страны или зоны по гриппу птиц высокой патогенности, при условии что результаты надзора свидетельствуют об отсутствии инфекции. Вакцинация может применяться как эффективный дополнительный инструмент контроля, когда обращения исключительно к политике стемпинг-аута оказывается недостаточно. Решение о проведении вакцинации должен принимать Ветеринарный орган на основе сложившегося с птичьим гриппом положения, а также готовности Ветеринарной службы осуществить стратегию вакцинации, включая поствакцинальный надзор и мониторинг. В Наземном кодексе также установлены требования к надзору в

иммунных популяциях и описаны примеры, которые признаются свидетельством результативности программы вакцинации.

Swayne D.E. и Sims L. в 2020 г. [472] предложили восемь критериев пригодности вакцины:

- невысокая стоимость;
- возможность применения у птиц разных видов;
- способность развить иммунитет после получения одной дозы;
- проведение низкзатратными способами массовым порядком; возможно легко идентифицировать инфицированных птиц в вакцинированной популяции;
- выработка защитного гуморального ответа в присутствии материнских антител;
- возможность применения у суточных птенцов в инкубатории или *in ovo*;
- антигенно родственна полевым вирусам.

К сожалению, сегодня ни одна из существующих вакцин или вакцинных технологий не отвечает всем восьми критериям, поэтому каждый раз необходимо выбирать одну из лицензированных вакцин, которая наилучшим образом соответствует ситуации [144].

Вакцины против гриппа птиц А могут быть подразделены на четыре основные категории [176; 276]:

- инактивированные цельновирионные вакцины;
- вакцины на основе белка НА (либо потенциально других белков вируса гриппа), полученного в системе экспрессии *in vivo* (живые векторные вакцины);
- вакцины на основе белка НА (либо потенциально других белков вируса гриппа), полученного в системе экспрессии *in vitro*;
- вакцины на основе нуклеиновых кислот (преимущественно ДНК-вакцины).

Все вакцинные препараты против высокопатогенного гриппа птиц имеют свои достоинства и недостатки.

Инактивированные вакцины

Вакцины против птичьего гриппа у домашней птицы основаны на гене гемагглютинина, однако защита специфична для каждого серотипа вируса. Универсальных вакцин пока не существует, ведётся их интенсивная разработка, в том числе и для применения у людей. Большинство используемых сегодня вакцин было основано на инаktivации цельного вириона с использованием масляной адъювантной системы для подкожного или внутримышечного введения. Но инактивированные вирусные вакцины часто имеют низкую иммуногенность и для формирования более длительного иммунитета требуются бустерные дозы и использование высококачественных адъювантов [41]. Иммунные реакции, вызываемые инактивированными вакцинами, обычно выражаются в гуморальном иммунитете с медленным периодом начала и, как правило, не подходят для стратегии DIVA. Более того, у цыплят эффективность вакцинации снижена из-за уже имеющихся материнских антител. Для практики введение инактивированной вакцины путём внутримышечной инъекции – трудоёмкая процедура, практическая реализация которой не удобна в промышленном птицеводстве с высокой плотностью стад, из-за чего нередко прививка оказывается неэффективной. Тем не менее, такие вакцины относительно дешевы в производстве, могут применяться у птиц разных видов, могут быть адаптированы к полемому вирусу, наряду с чем накоплен значительный опыт их лицензирования [144].

Большинство вакцин против гриппа птиц, применяемых в птицеводстве, являются инактивированными, изготовленными с использованием вирусов с подтипами HA H5, H7 и H9 [4; 10; 43; 144; 514]. Более трех десятков лет данный вид вакцин был единственным и производился на основе низкопатогенных вариантов вируса гриппа, изолированных во время вспышек среди поголовья домашних либо от диких птиц. В зависимости от типа используемого вирусного штамма инактивированные вакцины могут быть

гомологичными и гетерологичными. Гомологичная противогриппозная вакцина изготавливается из эпизоотических изолятов или стандартных штаммов, у которых подтипы НА и NA совпадают с циркулирующим полевым вирусом. Гетерологичная вакцина производится на основе вируса с одинаковым с эпизоотическим вирусом подтипом НА, но отличающимся подтипом NA и к ней может быть применен подход DIVA, когда можно дифференцировать вакцинированную и зараженную птицу [455]. Инактивированные вакцины производятся с использованием куриных эмбрионов, инфицированная аллантоисная жидкость от которых инактивируется физическими или химическими методами [4]. Также есть технология изготовления вакцин против гриппа птиц на культуре клеток MDCK [10]. Инактивированные цельновирионные вакцины вводятся птице парентерально (подкожно или внутримышечно) и особенно подходят для защиты взрослых кур, индеек и других птиц в эмерджентной ситуации, в частности при проведении круговой вакцинации в очаге инфекции. Применение вакцины такого типа у цыплят наиболее эффективно начиная с возраста 2–3-х недель [148]. Основным недостатком инактивированных вакцин является то, что у вакцинированной птицы образуются антитела не только к протективным эпитопам белков НА и NA, но и к внутренним белкам М1 и NP, поэтому при использовании традиционных иммунологических методов анализа, невозможно отличить вакцинированную птицу от инфицированной [454].

Исследования эффективности инактивированных вакцин на основе как высоко-, так и низкопатогенных вирусов гриппа птиц показывают, что их протективная способность зависит от двух (возможно, взаимодополняющих) факторов: антигенного соответствия между заражающим и вакцинным вирусами [279; 299; 388] и величины прививной дозы антигена в вакцине [305; 388; 432; 469]. При этом использование для производства инактивированных вакцин штаммов вируса ВГП не рекомендуется ВОЗЖ по причине их

эпизоотической опасности [518] и в связи с низким накоплением вирусного антигена в системе культивирования [37].

Большинство ученых доказывают, что для эффективной иммунизации против гриппа птиц требуется использовать антигенно родственные вирусы в составе вакцин [145; 275; 388]. Данные научных публикаций по эффективности вакцин в отношении гетерологичных (принадлежащих к разным генетическим линиям в пределах одного подтипа) вирусов носят противоречивый характер. Так, учеными из США с использованием разнообразных методов было установлено, что инаktivированные вакцины на основе цельного вируса подтипа H5 на 100% защищали цыплят от гибели при заражении гетерологичными вирулентными вирусами подтипов H5N8 и H5N2 класы 2.3.4.4 [275]. Основываясь на результатах перекрестной реакции гемагглютинации, другие исследователи установили, что вакцины на основе высоковирулентных вирусов H5N1 обладают разной протективной активностью в отношении вирулентного вируса [388]. Российские ученые указывали, что решающую роль в обеспечении эффективности вакцины играет концентрация антигена вируса гомологичного подтипа, и высоковирулентные вирусы H5 не всегда эффективны в качестве вакцинных штаммов из-за их низкого накопления в системе культивирования [37].

Стремительное развитие технологий обратной генетики вируса гриппа революционно изменило возможности создания прототипных вирусных штаммов для инаktivированных и живых аттенуированных вакцин. В 1999 г. двумя независимыми группами ученых впервые были получены рекомбинантные вирусы гриппа [43; 211; 362]. Метод обратной генетики, примененный для вируса гриппа, позволяет создавать инаktivированные вакцины с любым необходимым подтипом HA или NA. При этом существует возможность получения новых вакцинных штаммов с требуемыми антигенными характеристиками, со сниженной вирулентностью и повышенной пролиферативной активностью. Для аттенуации вируса метод обратной генетики является более эффективным и универсальным по

сравнению с традиционным способом, при котором для снижения вирулентности необходимо провести множество пассажей вируса гриппа на куриных эмбрионах. Атенуация может быть проведена путем либо введения мутаций во внутренние гены вируса, либо удаления факторов вирулентности высокопатогенных штаммов вируса гриппа. Так, мутации в двух генах, кодирующих полимеразные белки PB1 и PB2 вируса гриппа птиц A/guinea fowl/Hong Kong/WF10199 (H9N2), приводят к утрате патогенности вируса для кур [211]. При делеции неструктурного белка NS1 либо при внесении мутаций в белок M2, необходимый для формирования ионного канала, также происходит аттенуация вируса гриппа А [443]. Изменение последовательности аминокислот в сайте нарезания HA или полное удаление этого сайта у ВГП при помощи направленного мутагенеза приводит к приобретению им характеристик низкопатогенных вирусов [492]. Вакцины, изготовленные с помощью метода обратной генетики, относятся к традиционным, но полученным альтернативным методом.

В Российской Федерации в первую волну эпизоотии применялись инактивированные гомологичные гриппозные вакцины [4; 8; 35; 37; 70]. Параллельно шла работа над получением прототипных вакцинных штаммов-кандидатов с помощью метода обратной генетики вируса гриппа. Так, в лаборатории прикладной вирусологии и биотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» был создан прототипный штамм recPR8-H5N1, имеющий ген HA от высокопатогенного вируса гриппа птиц A/Курган/05/2005 H5N1, выделенного на территории России, а остальные гены – от высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/8/34 H1N1. Установлено, что новый штамм recPR8-H5N1 не вызывал болезнь у птицы, имел требуемую антигенную специфичность и накапливался с высокой эффективностью при культивировании. Кроме того, опытная инактивированная эмульгированная вакцина, изготовленная в лаборатории на основе штамма recPR8-H5N1, защищала 45-суточных цыплят при проведении контрольного заражения высокопатогенным вирусом A/Курган/05/2005 H5N1 [26]. В 2014 г. получен

мутантный вариант НА вируса A/ chicken/Kurgan/5/05 H5N1 с заменой 58Lys→Ile в малой НА2-субъединице, порог рН-активации которого снижен, а стабильность увеличена как в кислой среде, так и при повышенной температуре. Показано, что вирионы, содержащие мутантный НА, устойчивы к расщеплению трипсином. Повышенная стабильность вирионов мутантного НА коррелирует с увеличением его продукции как антигена в вакцинном препарате. Предложена гипотеза, в соответствии с которой низкая конформационная стабильность НА высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц определяет низкий выход иммунокомпетентного НА в вакцинных препаратах этих вирусов и, возможно, их низкую иммуногенность [424]. В дальнейшем данный штамм реассортант PR8-H5N1R (H5N1) был использован для производства вакцины «АВИВАК-ГП-H5N1R» [33].

С использованием метода обратной генетики в 2024 г. в лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» в рамках проекта Российского научного фонда № 24-76-10044 был получен рекомбинантный штамм A/Sytyktar/PR8/6:2/HA20 H5N1, который был депонирован в Государственной Коллекции Вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИИЦЭМ» им. Н.Ф. Гамалеи [45]. Исследования показали, что рекомбинантный вакцинный штамм A/Sytyktar/PR8/6:2/HA20 H5N1 обладает низковирулентным фенотипом, а вакцина изготовленная на его основе является безвредной, антигенно активной и вызывает формирование высоких титров антител у иммунизированных птиц [11; 75; 76].

Проведенный глобальный анализ научного и промышленного производства вакцин против птичьего гриппа типа А для сельскохозяйственных животных и домашних питомцев в период с 2019 по 2023 год показывал ключевую роль классических инактивированных вакцин в снижении выделения вируса среди поголовья животных, несмотря на сомнения в их эффективности (кратковременный иммунитет), неспособность

вызывать стерильный иммунитет и осложнения, связанные с их использованием в эпидемиологическом надзоре [187]. Популярность этого типа производственной технологии обусловлена тем, что она применяется уже несколько десятилетий и даёт отличные результаты, каждая страна может производить собственные вакцины из национальных изолятов [329]. В этом контексте классические аутовакцины имеют такие преимущества, как адаптация к местным потребностям здравоохранения и ветеринарии, ускорение реагирования на появление новых подтипов гриппа в полевых условиях, отказ от вакцинации устаревшими штаммами, достижение национальной самодостаточности и низких цен за дозу, а также отсутствие чрезмерных затрат, связанных с длительной транспортировкой.

Векторные вакцины

В последнее время для профилактики ВГП всё большее распространение получают векторные вакцины, которые имеют ряд преимуществ перед традиционными инактивированными препаратами [458].

Вакцины на основе белка НА (либо потенциально других белков вируса гриппа), полученного в системе экспрессии *in vivo*

Преимуществом вакцин, полученных в системе экспрессии *in vivo*, являются стимуляция как гуморального, так и клеточного иммунного ответа при парентеральном использовании, а также небольшие производственные затраты при получении протективного антигена.

Живые вирусные векторные вакцины

В последнее время для профилактики ВГП всё большее распространение получают векторные вакцины, которые имеют ряд преимуществ перед традиционными инактивированными препаратами. Живые векторные гриппозные вакцины способны индуцировать более сбалансированный Th1- и Th2-иммунный ответ в сравнении с инактивированными вакцинами и, как правило, имеют в своем составе, кроме гена НА, антиген другого вируса и обеспечивают защиту сразу от двух вирусных заболеваний. Протективные антигены вируса гриппа могут синтезироваться *in vivo* в составе

бактериальных и вирусных векторов [307]. Вирусные векторы представляют собой рекомбинантные вирусы, в геном которых встроен целевой ген с набором регуляторных элементов. Имеются сообщения о разработке векторных вакцин против ВГП H5N1 с использованием таких вирусных векторов, как вирус оспы кур (rFPV), герпесвирус индеек (rHVT), вирус болезни Ньюкасла (rNDV), вирус инфекционного ларинготрахеита (rILTV), вирус лейкоза птиц (rALV) и др. В качестве бактериальных векторов для создания гриппозных вакцин могут использоваться аттенуированные штаммы таких бактерий, как *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* и прочие [43; 307; 441; 467; 500]. В настоящее время в продаже имеются пять вакцин против ВГП на основе вирусных векторов: рекомбинантная вакцина HVT-AIV, рекомбинантная вакцина NDV-AIV и рекомбинантная вакцина FPV-AIV [246]. Данные вакцины фенотипически стабильны, не допускают возврата вирулентности, относительно недороги в производстве, просты в стандартизации и позволяют быстро адаптироваться к меняющемуся полевому вирусу путём изменения вставки, как то было отмечено в случае с H5 ВГП [246]. Кроме того, они могут применяться *in-ovo* в инкубатории, вводиться суточным птенцам путём подкожной инъекции и существует возможность DIVA по серологии, поскольку в них входит только один компонент вируса. С помощью новых методов при использовании компьютерного моделирования широкореактивным антигеном (COBRA) удалось оптимизировать антиген для вставки H5 HA против генетически разных вирусов H5 ВГП с многообещающими результатами [134].

Недостаток векторных вакцин заключается в необходимости предварительного определения вида хозяина, так как векторы имеют специфичность к определённым видам и не реплицируются у других. Если вектор естественным образом присутствует в популяции, подлежащей вакцинации, её естественный иммунитет к векторному вирусу может привести к его поглощению из-за интерференции с материнскими антителами.

Прививка одной векторной вакциной в производственных системах или регионах с разными типами популяций может быть проблематичной из-за необходимости учёта специфичности хозяина. Решение этой проблемы может быть найдено в использовании таргетированных подходов. Из-за менее широкого использования пока не накоплено достаточного опыта вакцинации векторными вакцинами в полевых условиях, и в странах, где эти вакцины использовались, это лишь в отдельных случаях сопровождалось официальной программой DIVA.

Вакцина на основе рекомбинантного вируса оспы птиц (rFPV)

Одна из первых векторных вакцин против гриппа птиц была разработана в 1988 г. на основе вирусного вектора оспы птиц rFPV [483]. Имеется большое количество экспериментальных данных, подтверждающих эффективность использования вакцин данного типа против вирусов гриппа птиц с подтипом H5 и H7 на курах [128; 148; 396; 471]. Показана эффективность использования вакцины rFPV-AIV-H5 при первичной вакцинации однодневных утят с последующей ревакцинацией инактивированной гриппозной вакциной («prime-boost»-вакцинация) [444]. Установлено, что векторная вакцина против гриппа птиц на основе rFPV обеспечивает защиту довольно быстро – в течение одной недели, а продолжительность иммунного ответа при этом составляет 20-40 недель [395; 465]. Тем не менее использование векторной вакцины на основе rFPV-H5 имеет ряд недостатков: – предшествующий активный иммунитет у птицы, вызванный инфицированием вирусом оспы птиц или вакцинацией традиционной вакциной против данного заболевания, а также наличие материнских антител значительно снижают эффективность вакцины rFPV-AIV-H5; – требуются большие трудозатраты при использовании вакцины в птицеводческих хозяйствах из-за необходимости ее индивидуального введения каждой птице подкожно или в подкрыльцовую вену; – векторная вакцина rFPV-AIV-H5 лицензирована для применения только у кур; – нет преимущества использования такой вакцины у бройлеров, поскольку в их вакцинации против оспы кур нет необходимости [307].

Вакцина на основе рекомбинантного вируса болезни Ньюкасла (rNDV)

Первые результаты исследования возможности использования ВНБ в качестве вектора для создания вакцин против гриппа птиц были неудовлетворительны. Образец вакцины на основе штамма rNDV-AIV-H7 (аттенуированный штамм ВНБ «В1» с экспрессирующим геном НА Н7 вируса гриппа A/chicken/ NY/13142-5/94 H7N2) обеспечивал неполную защиту привитой птицы (40%) при контрольном заражении высокопатогенными вирусами болезни Ньюкасла и гриппа птиц [475]. При этом у птицы после однократной вакцинации наблюдался лишь слабый гуморальный ответ против НА Н7 [307; 475]. Дальнейшие исследования, выполненные на модели вируса гриппа с подтипом НА Н5 позволили получить коммерческие вакцины, лицензированные для использования в Китае и Мексике. При этом рекомбинантные rNDV-AIV-H5- вакцины, сконструированные на основе штамма «Ла-Сота» или его производных («Clone 30»), обеспечивали полную защиту привитой птицы от контрольного заражения как вирусом NDV, так и гомологичными/гетерологичными вирусами гриппа подтипа H5N1 [172; 220; 282; 359]. Преимуществом вакцин на основе rNDV является возможность их массового использования (аэрозольно, добавлением в питьевую воду) с применением уже существующих технологий вакцинации против НБ как у кур, так и у индеек [467]. Необходима оптимизация схемы вакцинации в соответствии с уровнем материнских антител, которые снижают эффективность вакцинации [307].

Вакцина на основе рекомбинантного вируса герпеса индеек (rHVT)

Среди живых реплицирующихся вирусных векторов герпесвирус индеек является наиболее часто используемым вирусным вектором для введения *in ovo* и подкожно цыплятам в инкубаторах из-за его адаптивности и безопасности. HVT оказался отличным кандидатом на роль вектора, поскольку он обеспечивает длительный иммунитет благодаря своей устойчивости в организме хозяина, обладает превосходными

характеристиками безопасности, обеспечивает хорошую защиту при введении в инкубаторе или в яйцах, преодолевает МАТ, может использоваться в проверенных комбинациях с некоторыми другими вакцинами против болезни Марека других серотипов, и может обеспечить возможность применения стратегии DIVA. Попытки использовать вирус герпеса индеек в качестве векторной вакцины начались в начале 1990-х годов [351; 437], однако только в последнее время вирус HVT стал широко использоваться в качестве вектора для разработки рекомбинантных вакцин против ряда вирусных заболеваний домашней птицы, в том числе вакцин, экспрессирующих белки вируса ВГП для защиты от гриппа птиц [217; 308; 405; 407]. Было создано несколько рекомбинантных вакцин с HVT-вектором, экспрессирующих НА AIV H5N1, H7N1 или H9N2 и показана их эффективность [273; 308]. Одна из этих вакцин-кандидатов rHVT-AI уже стала коммерческой («Vectormune AI», CEVA Animal Health) и продемонстрировала многообещающие результаты при применении домашней птице [218], в том числе в отношении изолятов H5Nx клады 2.3.4.4. [133; 275; 445]. Было доказано, что вакцина эффективна в предотвращении развития клинических проявлений заболевания и подавлении выделения вируса у вакцинированных кур при заражении гетерологичным высокопатогенным вирусом птичьего гриппа H5 [372]. Кроме того, вакцина «Vectormune AI» также может обеспечить защиту индеек и домашних уток от высокопатогенного вируса птичьего гриппа H5 [272; 376]. Так же было показано, что рекомбинантный HVT–H7NA может защитить кур от смертельного заражения высокопатогенным вирусом H7N1 и вирулентным вирусом болезни Марека, несмотря на низкий уровень антител, специфичных к H7NA [308]. Исследования Liu L. и др. показали, что рекомбинантный HVT, экспрессирующий H9, может вызывать напряженный гуморальный и клеточный иммунный ответ и полностью предотвращать выделение и передачу вируса птичьего гриппа H9N2 у вакцинированных кур [316].

Технология CRISPR/Cas9 использованная для создания вакцин против определённых подтипов вируса гриппа птиц произвела революцию в конструкции вакцины HVT и раскрыла потенциал HVT как переносчика для поливалентных вакцин [503]. Tang N. С соавторами успешно создали трехвалентную вакцину на основе HVT путем встраивания гликопротеина D-гликопротеина I вируса ILT, гемагглютиниона вируса птичьего гриппа H9N2 и гликопротеина VP2 вируса IBD, получив рекомбинантный HVT-VP2-gDgI-HA с тройными вставками [481]. В одном исследовании CRISPR/Cas9 применялся для направленной генной инженерии трёхвалентной вакцины с использованием вектора, включающего H5 от H5N1, премембранный белок (PrM) вирусного энтерита уток (DEV) и гликопротеин оболочки E вируса тембусу уток (DTMUV) для защиты уток от H5N1, DEV и DTMUV [545].

Karczynski D.R. с соавторами при изучении трех рекомбинантных вакцин против гриппа H5 для защиты цыплят-бройлеров установили, что все вакцины были эффективны, но одна из них rHVT-H5 на основе вируса герпеса индеек HVT превосходила другие (RP-H5 на основе частиц РНК альфавируса и RG-H5 инактивированную вакцину на основе обратной генетики) при введении *in ovo* в развивающийся эмбрион. Этот способ вакцинации считается оптимальным, поскольку его можно применять массово для поголовья домашней птицы [271]. Вакцинация в инкубаториях имеет много преимуществ по сравнению с вакцинацией на птицефабриках, а именно: – более высокий уровень биобезопасности; – возможность использования автоматических и полуавтоматических методов введения вакцины; – птица вакцинирована и защищена от гриппа в более раннем возрасте, чем птица в птицеводческих хозяйствах [500].

Однако, в производственной практике установлена хорошая эффективность при одновременном использовании векторных вакцин rHVT-H5 и инактивированных вакцин rgH5N1 в графике вакцинации на птицефабриках. Данная схема prime-boost вакцинации является наиболее

эффективным средством профилактики заболевания (смертности и выделения вируса), вызванного даже генетически отличным вирусом клада 2.3.3.4b HPAI H5N8 [200].

Вакцины на основе белка НА, полученные в системе *in vitro*

Для создания защитного иммунитета нет необходимости использовать полный патоген, достаточно отдельных белков вируса. Для производства экспериментальных вакцин в разные годы был осуществлен синтез рекомбинантного белка НА с использованием культур клеток растений и животных, дрожжей, бактерий (*E. coli*) и вирусов (вируса осповакцины, некоторых нереплицирующихся аденовирусов, вируса Венесуэльского энцефаломиелита лошадей, ретровируса, бакуловируса) [42; 307; 467].

Несмотря на ограниченность накопленных знаний, применяют рекомбинантные вакцины гриппа птиц на основе бакуловируса, экспрессирующего рекомбинантный белок, или дефектных реплицирующих частиц РНК альфа-вируса, экспрессирующих белок НА [346], или ДНК-вакцин со вставкой гена НА. Хотя рекомбинантные субъединичные белковые вакцины совместимы с DIVA [490], они имеют серьёзные недостатки, в числе которых относительно низкий выход и сложный процесс очистки, значительно увеличивающий затратность производства. Как и рекомбинантный белок, субъединичная вакцина обладает низкой иммуногенностью, требуя высоких доз, нескольких ревакцинаций и качественных адъювантов для усиления защитного ответа [406].

Системы экспрессии на основе растений являются привлекательной платформой для производства субъединичных вакцин для домашней птицы. Защитные антигены вируса гриппа экспрессируются в различных растениях, таких как *N. benthamiana*, *Zea mays*, *Solanum tuberosum* и *Oryza sativa* [367]. Эти антигены могут вызывать выработку специфических антител или клеточный иммунитет у кур или мышей.

Вакцины на основе вирусоподобных частиц

Одним из альтернативных способов создания противогриппозных вакцин является получение вакцин на основе гриппозных вирусоподобных частиц, которые могут продуцироваться в различных экспрессионных системах (клетках насекомых, млекопитающих и растений). Вирусоподобные частицы представляют собой структурные белки (НА, NA) с морфологическими особенностями, которые сходны с вирусными структурами. В отличие от вируса дикого типа ВПЧ не содержат вирусную нуклеиновую кислоту и поэтому являются неинфекционными [299]. Из-за сходства в структуре ВПЧ успешно используются в качестве новых вакцин против нескольких вирусных патогенов. В эксперименте было показано, что ВПЧ обеспечивают высокий уровень защиты от птичьего гриппа у цыплят [364]. Тем не менее, высокая стоимость экспрессии и очистки, обязательность холодовой цепи и поддержание стабильности в полевых условиях пока ограничивают их коммерческое применение. Производство ВПЧ в системах экспрессии на растительной основе имеет определённые преимущества в том, что касается повышения безопасности и масштабируемости при низких затратах.

В последние несколько лет разработано некоторое количество кандидатных гриппозных вакцин на основе ВПЧ для применения в ветеринарии, включая ВПЧ для вирусов гриппа птиц подтипов H5N2, H5N3, H5N6, H9N2 и ВГП H5N1 [291; 299; 397; 541]. Сокращение временных затрат для производства ВПЧ-вакцин (в пределах одного месяца), отсутствие необходимости использования куриных эмбрионов и работы с высокопатогенными штаммами вируса гриппа в технологическом процессе, а также возможность быстрого его масштабирования являются основными достоинствами ВПЧ-вакцин по сравнению с традиционными современными гриппозными вакцинами [60].

Вакцины на основе нуклеиновых кислот (ДНК-вакцины)

В отличие от вирусных и бактериальных векторов ДНК-векторы не являются иммуногенными. Обычно гриппозные ДНК-вакцины – это бактериальные плазмиды, содержащие в своем составе кДНК вируса гриппа под контролем промотора гена млекопитающих. Выполнено множество исследований с использованием плазмидной ДНК в качестве вектора для доставки генов вируса гриппа на мышах, хорьках, курах, утках [43; 49; 163; 215; 392]. При исследовании эффективности экспериментальных ДНК-вакцин были достигнуты различные уровни защиты от вируса гриппа в зависимости от используемого промотора, гена, встроенного в состав вектора, присутствия адъюванта, совместного использования плазмиды, экспрессирующей иммуномодулятор, метода и пути введения вакцины, а также модели контрольного заражения [493; 497]. Экспериментальные ДНК-вакцины со встроенным геном НА вызывают у кур протективный иммунный ответ против различных высокопатогенных вирусов гриппа с подтипами НА Н5 и Н7. Такие вакцины продуцируют антиген *in situ*, стимулируя тем самым адаптивный гуморальный и клеточный иммунный ответ, сходный с формируемым при естественном заражении или вакцинации. Эксперименты на млекопитающих показали, что ДНК-вакцины, экспрессирующие гены НА, дают более эффективную защиту от различных антигенных вариантов вируса гриппа, чем инаktivированные вакцины. Однако на птичьей модели (в том числе на курах) защита, вызываемая ДНК-вакцинами, оказалась менее стойкой, чем при использовании инаktivированных и субъединичных вакцин, в которых ген НА экспрессируется *in vitro* и *in vivo* [493].

Для обеспечения протективного иммунного ответа у птицы необходимы большое количество плазмидной ДНК на одну дозу вакцины и многократная вакцинация (три и более раз). Эти факторы ограничивают использование ДНК-вакцин в птицеводстве в настоящее время. Однако, в 2017 году Компания AgriLabs объявила об условном одобрении Министерством сельского

хозяйства США первой в истории лицензированной ДНК-вакцины для кур. Это одобрение также является первым для технологии AgriLabs ExactVac на основе ДНК с адъювантом ENABL, первой ДНК-вакциной, одобренной для ветеринарного применения против гриппа, и одной из первых ДНК-вакцин, одобренных в США для сельскохозяйственных животных [260].

В последние годы был достигнут значительный прогресс в разработке безопасных и эффективных мукозальных вакцин, которые имитируют естественное инфицирование и блокируют путь заражения вирусами. Слизистая оболочка дыхательных путей является первой мишенью для вируса гриппа и представляет собой первую линию защиты от инфекции, которая может эффективно препятствовать проникновению вируса [414]. Мукозальные вакцины имитируют естественный процесс заражения вирусом и вызывают более сильный иммунный ответ слизистой оболочки, чем парентеральные вакцины. С одной стороны, вакцины для слизистых оболочек усиливают врождённый иммунитет, повышая экспрессию таких цитокинов, как IL-4, IL-6, IL-10 и IL-21; хемокинов; ко-стимулирующих молекул, включая CD40, CD80, CD86, IFN α и фактор активации В-клеток. Они вызывают дифференцировку CD4⁺ Т-клеток в Th1, Th2, Treg, Th17 и Tfh-клетки. С другой стороны, иммунизация через слизистые оболочки может вызвать выработку большего количества антител S-IgA, чем парентеральные вакцины [479]. Антитела S-IgA на поверхности слизистых оболочек способны эффективно предотвращать заражение вирусом, поскольку эти антитела остаются активными на поверхности до прикрепления патогенов к эпителию слизистых оболочек — основному месту заражения вирусом. Кроме того, антитела S-IgA обеспечивают более эффективную защиту от вариантов вируса гриппа, чем сывороточные антитела IgG, поскольку антитела S-IgA действуют шире [244]. Более того, было показано, что вакцины против слизистых оболочек индуцируют перекрестную реакцию Ab в дыхательных путях, обеспечивая перекрестную защиту от гетерологичной вирусной

инфекции. Кроме того, вакцинация через слизистую оболочку позволяет избежать использования игл, что снижает риск несчастных случаев, связанных со шприцами, и уменьшает болевые ощущения [507].

Okamoto и др. было обнаружено, что интраназальная инъекция цельновирионной вакцины H5N1, инаktivированной формалином, защищает мышей от заражения смертельными вирусами гриппа гомологичных и гетерологичных подтипов, вызывая перекрёстно-реактивные реакции нейтрализующих антител и перекрёстно-реактивные клеточно-опосредованные иммунные реакции [243], что указывает на важную роль иммунитета слизистых оболочек в перекрёстной защите. Кроме того, было продемонстрировано, что перекрёстная защита, обеспечиваемая цельновирионной вакциной и расщеплённой вирионной вакциной в сочетании с адъювантами для слизистых оболочек, одинакова [368].

Вызывают интерес мРНК-вакцины, которые привлекательны за счёт недорогого и быстрого производства, присущей им адаптивностью к меняющемуся вирусу и возможностью обращения к стратегии DIVA. Такие вакцины вводят короткоживущий синтетически созданный фрагмент последовательности РНК вируса гриппа птиц в вакцинируемую птицу. Эти фрагменты мРНК поглощаются дендритными клетками в процессе фагоцитоза. Дендритные клетки используют свой внутренний механизм для считывания мРНК и производства вирусных антигенов, которые кодирует мРНК. Препятствием более широкому применению этих инновационных вакцин является то, что пока отсутствуют данные об их реагировании в сложной среде, когда соседствуют несколько типов домашней птицы, поэтому доставка и выработка защитного иммунитета у птицы в некоторых системах производства могут оказаться проблематичными [144].

В США разработали новые вакцины на основе ДНК и мРНК-LNP, кодирующие белки гемагглютинаина и нейраминидазы высокопатогенного штамма птичьего гриппа H5N1, выделенного у человека, A/Texas/37/2024,

активно циркулирующего среди молочного скота. Такой подход к экспрессии двух антигенов вызвал сильный защитный иммунный ответ, направленный как на белки гемагглютинаина, так и на белки нейраминидазы, и обеспечил полную защиту от смертельных вирусных инфекций на мышинной модели. Полученные вакцины представляют собой эффективные средства для ограничения текущей циркуляции вирусов H5N1 среди животных и могут стать практическим решением для вакцинации людей в случае устойчивой передачи вирусов ВГП H5N1 от человека к человеку [304].

В России разработали экспериментальную мРНК-вакцину mRNA-H5, кодирующую модифицированный тример гемагглютинаина вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8). Мышей BALB/c иммунизировали вакциной mRNA-H5 с использованием липидных наночастиц (LNPs) и струйной инъекции без иглы. Было показано, что мРНК-H5 эффективно стимулирует специфические гуморальные и Т-клеточные иммунные реакции. Более того, мРНК-H5, доставляемая с помощью ЛНЧ и Л, обеспечила 100-процентную защиту иммунизированных мышей от летального заражения гомологичными и гетерологичными штаммами вируса птичьего гриппа A/Astrakhan/3212/2020 (H5N8) и A/chicken/Magadan/14-7V/2022 (H5N1) соответственно [539]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что струйную инъекцию без иглы можно рассматривать как альтернативу LNP для доставки мРНК [90].

ВОЗЖ, ФАО, ЕС не рекомендуют применять живые аттенуированные вакцины против гриппа птиц, созданные на основе диких штаммов, среди домашней птицы из-за риска перехода ослабленного штамма – в ВГП вследствие рекомбинации или мутации.

К иммуногенности вакцин против гриппа птиц ВОЗЖ также предъявляет соответствующие требования, главными из которых являются концентрация антигена в прививной дозе и титры поствакцинальных антител. Так, рекомендуемая концентрация антигена вируса гриппа в прививной дозе

вакцины должна составлять 50 PD₅₀ (50%-я протективная доза) или 3 мкг гемагглютинина [473]. У цыплят в полевых условиях минимальный титр антигемагглютинирующих антител должен быть 1:32 для защиты птицы от гибели и не ниже 1:128 для обеспечения снижения размножения вирулентного вируса и его выделения во внешнюю среду [345; 518].

На эффективность вакцин против высокопатогенного гриппа птиц влияют многочисленные факторы, в том числе следующие:

1. Контрольная доза вируса - высококачественные вакцины защищают от высокой степени заражения вирусом, в то время как вакцины низкого качества могут защитить только от низких контрольных доз [187; 465].

2. Содержание НА в инаktivированной вакцине или в титре живой вакцины - вакцины с высоким содержанием НА (инаktivированные) или с высоким титром (живые) обеспечивают наилучшую защиту от репликации вируса ВГП в дыхательных путях и пищеварительном тракте, в то время как вакцины с низким содержанием могут защитить от заболеваемости и смертности, но не снизить риск развития гриппа, размножение и выделение вируса из дыхательных путей и пищеварительного тракта [360; 462; 463].

3. Адъюванты - использование масляных адъювантов широко распространено в инаktivированных вакцинах для домашней птицы, включая вакцины против ВГП, и такое использование вызывает устойчивый, широкий и длительный защитный иммунный ответ, но для обеспечения достаточной долгосрочной защиты может потребоваться две или более доз [188; 452].

4. Соответствие НА - чем больше генетическое сходство между НА вакцинных и полевых вирусов, тем в большей степени снижается количество реплик вируса-возбудителя и его выделение из дыхательных путей [1-3]. Для защиты с помощью векторных вакцин против ВГП требуется более низкая степень сходства с вирусом-возбудителем [345].

5. Продолжительность защиты - лучшие вакцины обеспечивают защиту,

начинающуюся через 7-10 дней после вакцинации, с пиком защиты через 3-4 недели, и защита может длиться до 6-12 месяцев, но продолжительность защиты напрямую связана с количеством вырабатываемых защитных антител (т.е., титры) после иммунизации, но у некоторых видов для обеспечения длительной защиты могут потребоваться многократные вакцинации [462].

6. Способ введения - основная часть вакцин (инактивированные против ВГП и рекомбинантные на основе вируса оспы птиц (rFPV) со вставкой гена вируса H5 (rFP-AIV-H5) требуют парентерального введения, в то время как некоторые живые векторные вакцины, такие как рекомбинантный вирус Ньюкаслской болезни с вставкой гена вируса H5 AI, требуют парентерального введения. Вакцина rND-AIV-H5 может вводиться массовыми местными способами, такими как аэрозоль, спрей или введение с питьевой водой, в то время как другие вакцины потенциально могут применяться внутривенно [128; 378; 465; 471].

7. Вид птицы и количество прививок - после однократной вакцинации мясные куры-долгожители могут быть защищены на весь срок их выращивания, но для некоторых видов мясной домашней птицы (например, индеек, уток и гусей) и птиц-долгожителей (например, несушек и племенных производителей) может потребоваться многократная вакцинация, чтобы обеспечить защиту, которая сохранится на более длительный срок (производственный цикл) [277; 288; 325; 465].

8. Сроки вакцинации - оптимальный иммунный ответ при использовании инактивированных вакцин против гриппа птиц достигается у большинства особей после 2-недельного возраста и до наступления половой зрелости; то есть у птиц, вакцинированных до 2-недельного возраста, и у взрослых во время стресса цикла откладки яиц может наблюдаться неоптимальная защита, но такие неоптимальные сроки вакцинации могут привести к необходимости или усиленной многодозовой вакцинации в качестве первичной или многократной вакцинации в рамках некоторых

производственных систем.

9. Защита в полевых условиях по сравнению с лабораторной – 100% защита в полевых условиях практически недостижима из-за вирусов, подавляющих иммунитет, проблем с хранением и транспортировкой вакцин, неполной или пропущенной вакцинации домашней птицы на ферме или в регионе, а также несоблюдения качества вакцин выпускаемых производителями, включая применение сниженных доз вакцины [187; 477].

Tseng I. с коллегами провели метаанализ всех существующих данных экспериментальных контрольных испытаний для оценки эффективности вакцин против ВГП в отношении смертности цыплят (СПФ или с нулевым титром до вакцинации) с оценкой достоверности доказательств с использованием подхода оценки, разработки и оценивания рекомендаций GRADE. Было установлено, что вакцины против ВГП снижают смертность на 78–97 % в зависимости от платформы препарата и соответствия (или несоответствия) вакцинных и патогенных штаммов. Этот защитный эффект был особенно заметен, когда вакцинный и патогенный штаммы принадлежали к одной кладе. Инактивированные вакцины показали эффективность 95 % против гомологичных штаммов и эффективность 78 % против гетерологичных штаммов. Живые рекомбинантные вакцины продемонстрировали самую высокую эффективность - 97 %. Общая эффективность инактивированных рекомбинантных вакцин против ВГП составила 90 %. Коммерческие вакцины показали общую эффективность 91%, с эффективностью 96% против гомологичных штаммов и 90% эффективность против гетерологичных штаммов. Эффективность вакцины не может быть гарантирована на 100 %, независимо от платформы, интервала, дозировки или используемых штаммов. Исследования показали, что вакцинированные куры, зараженные вирусом высокопатогенного птичьего гриппа, все равно могут передавать его как вакцинированной, так и не вакцинированной птице и бройлеров (менее 1% [421] даже при наилучшем сценарии с 3% уровнем

смертности при использовании живых рекомбинантных вакцин или с бустерными дозами в коммерческих вакцинах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что массовая вакцинация может не препятствовать выявлению высокопатогенного птичьего гриппа, и подчёркивают важность соблюдения мер биобезопасности.

1.3 Заключение по обзору литературы

Наиболее опасными из вирусных инфекционных заболеваний для птицеводческой отрасли в мире являются высокопатогенный грипп птиц и болезнь Ньюкасла. Эти болезни включены в перечень заболеваний, подлежащих обязательному декларированию в Международном кодексе наземных животных.

ВОЗЖ дает следующее определение болезни Ньюкасла – это инфекционное заболевание птиц, вызванное вирусом птичьего парамиксовируса серотипа 1 (APMV-1), при этом вирус должен либо обладать индексом интрацеребральной патогенности у суточных цыплят равным или превышающим значение 0,7, либо иметь определенную последовательность многоосновных аминокислот (остатков аргинина или лизина) на С-конце белка F2 и фенилаланин в 117 положении, на N-конце белка F1 [524].

Болезнь Ньюкасла остается постоянной угрозой для производителей мяса птицы во всем мире, несмотря на доступность и повсеместное применение вакцин против НБ с 1950-х годов [270]. В последние десятилетия в результате непрерывной эволюции вируса ньюкаслской болезни появилось в общей сложности двадцать генотипов, и генетические вариации могут быть связаны со вспышками заболеваний у вакцинированных кур [250; 287; 332].

Основная проблема, связанная с современными вакцинами против болезни Ньюкасла заключается в их несоответствии циркулирующим вирусам. Несмотря на то, что ВНБ относится к одному серотипу, между обычными живыми вакцинами и вирусами, присутствующими в природе,

существуют значительные генетические и антигенные различия. Исследования многих ученых продемонстрировали, что гомология аминокислотных последовательностей белков F и HN между штаммом «Ла-Сота» и штаммами генотипа VII составляет 87–89% и 87–88% соответственно [339; 398; 535].

По вопросу эффективности и гомологичности вакцин против болезни Ньюкасла существуют противоречивые точки зрения. В некоторых исследованиях указывается, что антигенная разница между вакцинами против НБ и преобладающими штаммами не является основной причиной вспышек заболеваний в полевых условиях [171; 461]. Причиной недостаточной защиты, обеспечиваемой живыми вакцинами может быть низкий иммунитет поголовья, вызванный ненадлежащей практикой вакцинации [189; 190; 313]. С другой стороны, экспериментально было показано, что применение живых рекомбинантных вакцин против НБ, гомологичных циркулирующим вирусам, снижает уровень выделения вируса в стаде [98; 179; 535]. Также убедительные доказательства, подтверждающие этот вывод, были получены в ходе исследований инаktivированных вакцин против ньюкаслской болезни. Инаktivированные вакцины на основе штамма «Ла-Сота» вызывают значительно более низкие титры гемагглютинирующих антител против гетерологичного вируса, чем против гомологичного антигена [249; 339]. Однако, куры, вакцинированные традиционными вакцинами, даже если полностью защищены от заболевания и смертности, но могут всё равно выделять большое количество вируса НБ после заражения [251; 274; 344]. Эти результаты могут объяснить частое возникновение нетипичной формы болезни Ньюкасла у поголовья, вакцинированного традиционными вакцинами.

Для создания живых вакцин против НБ, соответствующих генотипу, главное обеспечить как антигенность, так и безопасность препарата. Вирулентные штаммы могут быть ослаблены с помощью обратной генетики и модифицированы для получения модифицированных живых

вакцин [262; 416; 535]. Несколько живых рекомбинантных вакцин против НБ уже применяются в ветеринарной практике в Корее, Египте и Мексике. Применение рекомбинантных вакцин против генотипа VII обеспечивает лучшую защиту промышленной птицы и значительно снижает выделение вируса в экспериментах после контрольного заражения [179]. Однако, безопасность живых вакцин на основе вирулентных вирусов следует тщательно контролировать, даже если исследования в хорошо контролируемых лабораторных условиях подтвердили их безвредность на подопытных животных.

В некоторых странах применение новых вакцин для домашней птицы, соответствующих генотипу, успешно подавляет циркуляцию вирулентных штаммов ВНБ в полевых условиях [249]. Многие исследователи показали, что вакцины против ВНБ, созданные на основе вирусов, филогенетически близких к потенциальным вирусам-возбудителям, могут обеспечить более эффективный контроль ньюкаслской болезни за счёт снижения выделения вируса инфицированными птицами [179; 251; 344; 375; 412; 456; 459; 460].

Однако вирулентный вирус ньюкаслской болезни по-прежнему является эндемичным во многих регионах мира, особенно в странах с низким и средним уровнем дохода, что влияет на экосистему, экономику, международную торговлю. В странах, эндемичных по НБ, несмотря на вакцинацию для борьбы с заболеванием, отсутствие вакцин, соответствующих генотипу, которые могли бы снизить вирусную инфекцию и передачу вируса, а также ненадлежащее введение вакцин на местах снижают эффективность вакцинации [250].

Механистическая модель ускользания от иммунитета, зависящая от титра антител, подтверждает необходимость разработки вакцин, гомологичных полевым вирусам в то числе и против ньюкаслской болезни [426]. В этой модели вирус вакцины может быть нейтрализован низкими титрами антител, индуцированными гомологичной вакциной, в то время как

для нейтрализации полевых штаммов, содержащих вариации основных нейтрализующих эпитопов, требуются более высокие титры антител.

Контроль ньюкаслской болезни, вызываемой вирусами генотипа VII, требует пересмотра классических подходов. Гомологичные вакцины на основе антигена VII генотипа (векторные и инаktivированные) демонстрируют клинически более высокую эффективность в полевых условиях по сравнению с традиционными гетерологичными штаммами в плане снижения выделения вируса и достижения более стойкого иммунитета. Однако их применение должно сопровождаться усиленным диагностическим мониторингом и строгим соблюдением правил биобезопасности. Идеальной универсальной вакцины не существует, и успех контроля зависит от правильно выстроенной программы с учетом эпизоотической ситуации, типа птицы и экономических факторов. Таким образом, для обеспечения надёжной защиты при НБ в полевых условиях необходимы как вакцины, соответствующие генотипу, так и надлежащие процедуры вакцинации.

Вирусы птичьего гриппа А, особенно подтипа H5N1, представляют постоянную угрозу и обладают пандемическим потенциалом из-за своей способности к генетической рекомбинации, межвидовой адаптации и высокой летальности [434]. Грипп птиц имеет многовековую историю, а истории человечества известны пандемии гриппа, которые нанесли непоправимый ущерб в планетарном масштабе.

Грипп птиц, как нозологическую форму, принято разделять на две категории: высокопатогенный и низкопатогенный, при этом вирус с одной и той же антигенной формулой может обладать как высокой, так и низкой вирулентностью. Классическим методом измерения этой вирулентности является определение индекса внутривенной патогенности (IVPI), при $IVPI \geq 1,2$ вирус относится к высоковирулентному.

Не существует общемировой стратегии в контроле за распространением и сдерживанием гриппа птиц. Однако, в большинстве развитых стран, особенно с высоким экспортным потенциалом, основным методом борьбы со вспышками ВГП являлась стратегия стемпинг-аут и жесткие карантинные мероприятия. При этом некоторые страны имели резерв инактивированной вакцины из актуальных штаммов на случай непредсказуемого развития эпизоотического процесса. Однако, глобальное распространение высокопатогенного гриппа птиц в последние годы достигло беспрецедентных масштабов, что продемонстрировало недостаточность стратегии стемпинг-аут и поставило перед птицеводческой отраслью сложный вопрос о целесообразности массовой вакцинации. Поэтому вопросы разработки вакцин и опыт стран в вакцинопрофилактике ВГП приобрели особую актуальность.

Новая волна эпидемии высокопатогенного гриппа птиц, начавшаяся в 2020 году, охватила множество стран на всех континентах мира. За последние годы Европа лидирует как по общему числу вспышек ВГП (65%), так и по количеству вспышек среди диких птиц. В Северной Америке, Океании, Азии и некоторых частях Африки преобладают вспышки ГП среди домашней птицы. По данным ФАО за относительно короткий срок (2021–2024 гг.) с момента широкого распространения вируса гриппа птиц H5Nx HPAI произошло удвоение количества восприимчивых видов млекопитающих и диких птиц [6]. В результате разрушительных эпидемий ВГП потери живой птицы (по данным ВОЗЖ) с 2005 г. по настоящее время составили порядка 600 млн голов. Основные потери птицы понесли Американский континент, Азиатский и Европейский регионы. Азиатский регион зачастую применяет программы вакцинации от ВГП, что связано с высокой плотностью птицеводческих предприятий вкупе с преобладанием внутреннего рынка птицы и эндемичностью инфекции. Тогда как Американский континент и Европа характеризуются преобладанием экспорта и, как следствие, отказ от стратегии вакцинации для них связан, в первую очередь, с желанием избежать последующих торговых ограничений.

В соответствии с международными рекомендациям ВОЗЖ использование вакцинации против гриппа птиц может быть рекомендовано при определенных условиях, при этом любая используемая вакцина против гриппа птиц должна соответствовать стандартам, описанным в Наземном руководстве. Вакцинация не повлияет на зоосанитарный статус в благополучной стране или зоне только в том случае, если ветеринарный эпиднадзор на достоверном уровне сможет продемонстрировать отсутствие инфекции.

На территории России с 2006 г. действовала стратегия ограниченной целевой вакцинации домашних птиц, которая проводилась во всех субъектах. Вакцинация охватывала поголовье личных подсобных хозяйств и птицеферм открытого типа, расположенных вблизи водоемов – стоянок диких водоплавающих перелетных птиц. Применение данной стратегии было направлено на предотвращение передачи вируса восприимчивому поголовью, когда риск контакта между домашними и дикими перелетными птицами был максимальным. При этом поголовье в промышленном секторе птицеводства не прививалось. Однако многолетняя практика вакцинации птиц ЛПХ не позволяет сделать вывод о сдерживании распространения инфекции и, возможно, требует пересмотра. Многие ученые считают, что вакцинация несет в себе большую опасность для реассортации вирусов и может стать причиной последующих непредсказуемых эпизоотий, обусловленных новыми штаммами-мутантами, и, кроме того, она способствует «тихому» распространению вируса.

Распространение вируса гриппа типа А среди птиц сельскохозяйственного назначения и дикой орнитофауны в планетарном масштабе представляет серьезную экологическую и социально-экономическую проблему, что может сказаться на значительном сокращении популяции некоторых видов диких птиц и на продовольственной безопасности стран, ввиду резкого сокращения производства мяса птицы и яиц, потерь родительских стад для последующего воспроизводства.

Потенциальная возможность появления новых вариантов вируса гриппа, способных преодолевать межвидовые барьеры и стать причиной новой пандемии предопределяет необходимость своевременного изучения меняющейся эпидемиологической и эпизоотической обстановки. Формирование природных очагов гриппа птиц в естественных природных биотопах будет способствовать сохранению вируса, как биологического вида и его непредсказуемой эволюции. Естественно, невозможно предусмотреть единообразной стратегии в борьбе с гриппом птиц из-за особенностей ведения птицеводства в разных странах. Выбор зависит от конкретных обстоятельств, и, действительно, когда экспортный потенциал является вторичным, а на первое место встает сохранение внутреннего производства высокоценного белка с целью превенции голода, то стратегия с вакцинацией кажется единственным правильным выходом. Напротив, в тех странах мира, где нет угрозы продовольственной безопасности, а система ведения промышленного птицеводства построена на принципах биозащиты, стратегия «стемпинг-аут» без вакцинации оправдывает себя.

Экологические и эпизоотологические изменения, вызванные вспышками гриппа птиц в последние годы, поставили под сомнение исключительность программ санитарного убоя. Международные организации (ВОЗЖ, European Food Safety Authority, European Commission) допускают, что профилактическая вакцинация позволит свести к минимуму количество вспышек и продолжительность эпизоотии. Применение вакцин может снизить риск распространения гриппа птиц на новые виды животных и уменьшить потенциальные убытки. Но вакцинация должна дополнять, а не заменять другие меры профилактики и контроля, такие как мониторинг инфекций среди птиц, раннее выявление и обеспечение биобезопасности, и рекомендуется как часть комплексного подхода в борьбе со вспышками гриппа птиц.

До середины 90-х годов прошлого века гриппозные вакцины в птицеводстве использовались редко, а экспериментальных данных об их

качестве и эффективности было немного. В первой декаде XXI века ситуация изменилась и производство противогриппозных вакцин существенно выросло. В 2002 г. в списке ВОЗЖ было только два производителя противогриппозных вакцин с подтипом НА Н5 и Н7, к 2006–2007 гг. в нем насчитывалось уже 38 производителей из Китая, Франции, Германии, Италии, Мексики, Нидерландов, Пакистана и США. При этом в ФАО была зарегистрирована 41 гриппозная вакцина против ВГП с подтипом НА Н5 и Н7, и этот список расширяется [467].

Стратегии вакцинации, используемые в разных странах, и подходы к применению вакцин против ВГП Н5N1 варьируют от полного неприятия вакцин до попыток вакцинировать 100% поголовья [470]. Вакцинация против гриппа птиц позволяет защитить их от проявлений клинических признаков и смерти, а также повысить уровень общей резистентности поголовья к инфекции и уменьшить экскрецию вируса в окружающую среду. Однако при возникновении эпизоотии ВГП для ее элиминации одной вакцинации недостаточно, необходимо соблюдать строгие меры биобезопасности [519]. Кроме классических инактивированных вакцин против гриппа птиц, которые используются в птицеводстве наиболее широко, живые векторные вакцины (rFPV-AIVH5, rNDV-AIV-H5) также разрешены к применению в некоторых странах [386; 514]. Среди современных технологий получения вакцин против гриппа птиц метод обратной генетики занимает особое место. Спустя почти 25 лет после получения первого рекомбинантного вируса этот метод стал необычайно эффективным и универсальным инструментом, используемым для изучения вируса гриппа. Кроме того, с его помощью можно не только создавать вакцины против гриппа (в том числе вируса гриппа А птиц) с требуемой антигенной специфичностью, но и модифицировать их в случае изменения антигенных свойств циркулирующих полевых штаммов [361].

Продолжающаяся глобальная циркуляция вирусов ВГП Н5 существенно изменила представления о птичьих вирусах, их эпидемиологии, экологии,

патогенезе и межвидовой передаче, а также о возможностях реагировать на вспышки, в том числе о способах предотвращения пандемий и обеспечения готовности к ним. Межконтинентальное распространение этих вирусов, которое в последние годы усилилось как в географическом плане, так и в отношении видов-хозяев, а также их способность адаптироваться к птицам и млекопитающим представляют серьёзную угрозу для здоровья и благополучия людей и животных, сохранения биоразнообразия и мировой экономики. Несмотря на то, что недавние оценки рисков показали низкий уровень пандемического риска, связанного с вирусами линии Gs/Gd, инструменты оценки рисков сосредоточены в основном на текущих рисках и не учитывают эволюционный потенциал вирусов и глобальные изменения. Это подчеркивает острую необходимость в едином подходе «Единое здоровье», объединяющем стратегии наблюдения, смягчения последствий и профилактики. При наблюдении особое внимание следует уделять эпидемиологическим и генетическим данным о вирусах, свидетельствующим об адаптации млекопитающих к возбудителям и потенциальном преодолении иммунитета, вызванного вакциной, с последующим принятием соответствующих мер. Меры по смягчению последствий должны включать в себя обеспечение биобезопасности и биологической безопасности, целевые кампании по вакцинации, меры по обеспечению готовности к вспышкам заболеваний и просветительскую работу. Хотя стемпинг-аут традиционно является основной мерой реагирования на вспышки гриппа у домашней птицы, для предотвращения экономических потерь и обеспечения благополучия животных необходима стратегическая вакцинация в сочетании с мерами биологической безопасности на фермах. Крайне важно разработать и внедрить программы вакцинации животных, которые обеспечивают стойкий и длительный иммунитет [129].

Согласно глобальным эпидемиологическим отчётам, мир, возможно, вступает в новую эру птичьего гриппа, когда штамм H5N1 будет быстрее

распространяться среди млекопитающих. Вирусы высокопатогенного птичьего гриппа, в частности H5N1 и H7N9, долгое время считались потенциальными возбудителями пандемии, несмотря на отсутствие устойчивой передачи вируса от человека к человеку. Однако недавние вспышки в регионах, ранее не затронутых вирусом, таких как Антарктида, позволяют предположить, что можно перейти от теоретического риска к более реальной угрозе. Если сценарий пандемии гриппа птиц у людей реализуется, мир может столкнуться с кризисом, характеризующимся высокой заразностью и смертоносностью, при этом эффективных вакцин не будет.

Учитывая постоянные угрозы заноса новых вариантов вируса гриппа типа А и вируса ньюкаслской болезни генотипа VII на территорию Российской Федерации из стран Центральной и Юго-Восточной Азии, Ближнего и Дальнего Востока, Европы разработка высокоэффективных вакцин против вышеуказанных заболеваний является актуальной.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в период с 2020 по 2025 гг. в соответствии с тематическим планом НИР «Разработка комплексной системы контроля инфекционных болезней животных и совершенствование методов исследования остатков запрещенных и вредных веществ в организме животных, кормах и продуктах животного происхождения», шифр - «Ветеринарное благополучие».

2.1 МАТЕРИАЛЫ

2.1.1 Штаммы и изоляты

Изоляты вируса болезни Ньюкасла генотипа VII: NDV/chicken/Rus/Crimea/54/17 («Крым»), NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9/19 («Краснодар»), NDV/chicken/Rus/Kaliningrad/184/13 «Калининград» субгенотип VII.1.1 (VII L), NDV/chicken/Rus/Khanty-Mansy/1240-1/21 (VII L).

Вирусы НБ. Вирус НБ генотипа VII субгенотипа VII.1.1 NDV/by/chicken/612/2021 в дальнейшем депонированный как штамм «ВНИИЗЖ G7»; - вирус НБ генотипа II штамма «Ла-Сота»; - вирус НБ генотипа I штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Вирусными материалами являлись образцы экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ), полученные после инфицирования СПФ-эмбрионов кур (VALO BioMedia GmbH, Германия).

Высоковирulentные штаммы вируса гриппа птиц: подтип H5N1 A/chicken/Primorsky/85/08, клада 2.3.2 (в тексте – ВГП H5N1 штамм «Приморский»); подтип H5N8 A/duck/KChR/1590-20/20, клада 2.3.4.4 в (в тексте – ВГП H5N8 штамм «КЧР»); подтип H5N1 штамм A/chicken/Stavropol/2077-6/21 вируса ВГП А; подтип H5N1 штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1.

Низковирулентный штамм вируса гриппа птиц: производственный штамм «Ямал» вируса гриппа подтипа H5N1.

Вирусные антигены. Вирусные материалы инактивировали аминоэтилэтиленимином (0,25%) в течение 24 ч. при температуре 37 °С. Титр антигена определяли в реакции гемагглютинации (РГА) и выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ).

2.1.2 Экспериментальные животные. В лабораторных испытаниях использовали коммерческих кур яичного направления продуктивности кроссов «Хайсекс коричневый», «Хайсекс белый», «Ross-308», «Декалб уайт», утят пекинской породы и индеек от 0 до 120 суточного возраста, полученных из благополучных по инфекционным болезням птицеводств, а именно гриппу птиц, ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни, инфекционному бронхиту кур, хламидиозу, инфекционному ларинготрахеиту птиц, сальмонеллёзу, микоплазмозу птицы, метапневмовирусной инфекции птиц, согласно статье 1.3 Diseases, infections and infestations listed by the OIE кодекса МЭБ Terrestrial Animal Health Code. Формирование опытных и контрольных групп осуществляли псевдослучайным образом, не менее чем 10 голов в группе. Количество подопытных групп в каждом из опытов рассчитывали индивидуально, исходя из потребности изучения различных вариантов вакцин или исследуемых показателей. Адаптация цыплят проводилась в течение не менее двух суток от момента поступления в ЭБЛРЖ (ВК).

Цыплят содержали в отдельных клетках (600×400×300). Условия содержания цыплят в ЭБЛРЖ (ВК), секторе №2 соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и ГОСТ 34088-2017 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за сельскохозяйственными животными». В помещениях для содержания цыплят контролировали температуру (22-25°С) и

влажность воздуха (40-80%). Освещенность поддерживали автоматически в режиме свет/темнота (12/12 ч). Кратность воздухообмена составляла не менее $\times 11$, без рециркуляции. Раздача корма и воды проводилась в фиксированное время.

В производственных испытаниях вакцины применяли на промышленном поголовье кур в возрасте 0-135 дней на птицефабриках Липецкой, Ленинградской, Тульской областей и Ставропольского края, индеек в возрасте 1 и 28 суток на птицефабрике Ставропольского края и в поголовье родительского стада гусей в возрасте 30 и 60 суток в Республике Башкортостан.

Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33215-2014, принятым Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

2.1.3 Куриные эмбрионы. Использовали 9-10-суточные СПФ-куриные эмбрионы категории СПФ (Specific Pathogen Free соответственно статье 1 Регламента ЕС No 2001/393/EG) фирм «Valo Biomedica» (Германия) и «ВЕНКЕС» (Индия), а также эмбрионы товарных кур кроссов «Хайсекс белый», «Ross-308», «Декалб уайт», полученные из благополучных по инфекционным болезням хозяйств. Инкубацию проводили при температуре $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ и относительной влажности 50-70%.

2.1.4 Вакцины. Вакцина против болезни Ньюкасла из штамма «Ласота» сухая живая II генотипа вируса НБ (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); «Вектомун ND» рекомбинантная вакцина, представляющая собой вирус герпеса индеек в который встроен ген F вируса НБ «тHVT/ND» (производитель Сева, Венгрия); «Севак Витапест L» (производитель Сева, Венгрия); «Севак NEW L» (производитель Сева, Франция); «Хиправиар S», «Хиправиар B1»

«Хиправиар-Клон» (производитель Хипра, Испания); «Авинью Хатчпак» живая на основе штамма «VG-GA» (производитель «Берингер Ингельхайм»); «Gallimune ND» инактивированная (производитель «Берингер Ингельхайм»); ассоциированная вакцина против НБ, ИБК и ССЯ-76 инактивированная эмульгированная (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); вакцина против НБ «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); ассоциированная вакцина против НБ и низкопатогенного гриппа птиц H9N2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная «Флу Протект H5» (ФГУП «Ставропольская биофабрика»); вакцина против гриппа птиц H5 инактивированная эмульгированная из штамма «Приморский» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); вакцина против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

2.1.5 Адьюванты. Для изготовления эмульсионных инактивированных вакцин использовали масляные адьюванты Montanide ISA 70 VG (Seppic, Франция) или Coralvac RZ 528 (Coral, Турция).

2.1.6 Оборудование. В лабораторных исследованиях использовались: боксы биологической безопасности (БАВп-01-«Ламинар-С», БОВ-001-АМС), бокс ламинарный с уровнем биологической безопасности не ниже II класса, весы электронные лабораторные DL-300WP, водяная баня (Bio-Optica), центрифуги (Eppendorf centrifuge 5418, Mistral 6L, J2-21 Beckman), гомогенизатор лабораторный (Silverson Sealed Unit), вискозиметр капиллярный (ВПЖ-2), изолирующие боксы для содержания птиц (Импеданс), инкубаторы (Стимул и Резерв), дозаторы переменного объема (Socorex, Sartorius, Biohit), морозильник горизонтальный (LGT 4725), Морозильник (Stinol 106 Q), низкотемпературный морозильник (Sanyo), термостат воздушный (ТВ-20-ПЗК), шкаф сухожаровой с принудительной вентиляцией (Binder FED720), секундомер (СОПрр-2а-3-000), логгер (Testo 174T), стерилизатор паровой (БК-75), РН-метр (206-pH1), посуда лабораторная мерная от 20 до 1000 см³, планшеты полистироловые для

иммунологический реакцией с V-образным дном; пробирки полипропиленовые стерильные объемом от 0,5 см³ до 20 см³; шприцы одноразовые объемом от 2 до 20 см³; наконечники полипропиленовые для дозаторов переменного объема.

2.1.7 Реактивы и диагностические наборы. При изготовлении растворов использовали реактивы квалификации «ч.д.а.», или «х.ч.» Для приготовления растворов использовали следующие химические субстанции: натрий фосфорно-кислый двузамещенный (ГОСТ 4172-76), калий фосфорно-кислый однозамещенный (ГОСТ 4198-75), бензилпенициллина натриевая соль, амфотерицин В, гентамицин. В исследованиях использовали диагностические наборы: набор для выявления антител к вирусу ньюкаслской болезни в реакции торможения гемагглютинации (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), набор для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Для выделения суммарной РНК использовали набор «РИБО-сорб». Обратнотранскриптазную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) и систем праймеров на гены М, Н, N.

2.1.8 Растворы и питательные среды. Для приготовления растворов в качестве разбавителя использовали деминерализованную дистиллированную воду (H₂O). Все разбавления вирусных материалов, использованных для иммунизации и заражения, производили на физиологическом растворе. Физиологический раствор – ФС.2.2.0014.15 Натрия хлорид 0,9%. Из растворов использовали фосфатно-буферный раствор (ФБР) - 0,01 М фосфатный буфер 0,14 М натрия хлористого, рН 7,2-7,4; физиологический раствор (0,15 М); 15% раствор аминокислот (АЭЭИ); спирт этиловый 70%, 80% и 96%; 3% цитрат натрия, рН 7,2- 7,4. Из питательных сред применяли тиогликолевую среду, среды Сабуро, Каган, МПА, МПБ и МППБ.

2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Культивирование вируса. Перед заражением эмбрионы кур овоскопировали и отбирали пригодные для вирусологических работ, подвижные, с хорошо развитой сосудистой системой. Отмечали место введения вирусной суспензии, которое выбирали в бессосудистых участках на 3-5 мм ниже границы пуги (воздушного пространства). Отобранные КЭ размещали в пластмассовых прокладках или металлических лотках с ячейками воздушной камерой вверх. Скорлупу дезинфицировали 70%-ным этиловым спиртом и фламбировали. Инокуляцию эмбрионов проводили с использованием стерильных пробойников, шприцев, игл и соблюдением правил безопасности при работе с вирусным материалом. Пробойником в скорлупе делали два отверстия: одно в центре, другое – сбоку, на 3-5 мм ниже границы пуги в межсосудистом пространстве. В боковое отверстие вводили иглу на 3-4 мм и посредством шприца инокулировали суспензию исследуемого материала в объеме 0,1 см³ в аллантоисную полость. Отверстие в скорлупе заливали расплавленным парафином или восковым карандашом (первоначально боковое, затем верхнее). Инокулированные КЭ помещали в инкубатор и инкубировали при температуре 37⁰С и относительной влажности 60-70% в течение 120 ч. Ежедневно эмбрионы овоскопировали и регистрировали состояние. Все КЭ, погибшие в течение 24 ч. после инокуляции, браковали и утилизировали. Эмбрионы, погибшие через 48-120 ч. с момента инокуляции использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ) для чего их предварительно выдерживали 12-24 ч. при температуре 2-6 ⁰С. В дальнейшем скорлупу охлажденных эмбрионов обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом и фламбировали. Верхнюю часть скорлупы (над пугой) срезали по окружности стерильными ножницами, после чего ЭЭЖ из полости эмбриона отсасывали с помощью сифона, подключенного к вакуумному насосу, или пипеткой с резиновой грушей в стерильные флаконы.

2.2.2 Определение инфекционной активности (титра) вируса. Для оценки инфекционной активности вируса применяли метод последовательных (предельных) разведений с постоянным коэффициентом кратности (h) равным 10. Величины разведений (d) обозначали положительными логарифмами ($\lg d$). В качестве чувствительных тест-объектов использовали развивающиеся СПФ-эмбрионы кур в возрасте 9 – 10 суток, которых инфицировали в аллантоисную полость разведениями вирусосодержащего материала в заданном объеме (v). Для испытания каждого разведения формировали группу из n-числа эмбрионов. В каждой группе определяли количество инфицированных эмбрионов (ef - число положительных эффектов) и вычисляли пропорцию вида $C = ef/n$. В зависимости от характера проявления инфекционного процесса в эмбрионе, положительным эффектом считали или гибель эмбриона, или наличие гемагглютинации ЭЭЖ. Величину инфекционного титра (Т, ЭИД₅₀) рассчитывали по Спирмену – Керберу [47]. Использовали формулу:

$$\lg T/v = \lg D + \lg h \times (\Sigma C + 0,5),$$

где: D - наибольшее испытанное разведение вирусного материала, при котором наблюдали абсолютный эффект, т. е. $C=1$; h- шаг разведения; ΣC - сумма всех значений $C < 1$.

Для случаев, когда в неразведенном материале ($\lg D = 0$) инфекционный эффект был не абсолютен, т.е. значения C находились в диапазоне $0 < C < 1$, использовали экспертную оценку титра. Принимали, наличие условного «концентрированного» материала ($\lg D = -1$), при котором $C = 1$. Дальнейший расчет выполняли по формуле:

$$\lg T/v = (-1) + \lg h \times (\Sigma C + 0,5),$$

Величину титра, установленную для инъекционного объема 0,2 см³, пересчитывали для объема 1 см³, используя формулу:

$$(\lg T/0,2 \text{ см}^3) + 0,7 = (\lg T/\text{см}^3).$$

2.2.3 Инактивация вируса. Для инактивации инфекционного вируса использовали аминоэтилэтиленимин (АЭЭИ) - 15%-й водный раствор 1-(2-

аминоэтил)-азиридина (ООО НПП «БИОХИМСЕРВИС», г. Владимир). Перед применением раствор АЭЭИ корректировали по показателю водородных ионов до величины $pH=8,3$. В вирусосодержащую экстраэмбриональную жидкость (ЭЖ) добавляли раствор АЭЭИ до конечной концентрации 0,25% (по сухому веществу). Процесс инаktivации вируса проводили в термостате при $(37\pm 0,5)^{\circ}C$. Через каждые 1,5 часа материал перемешивали. После окончания процесса пробу вирусного антигена исследовали на полноту инаktivации вируса и стерильность.

2.2.4 Определение полноты инаktivации вируса. Полноту инаktivации вируса определяли методом трехкратных последовательных пассажей средней пробы вакцины на 9-11-суточных СПФ-эмбрионах кур с последующей постановкой РГА.

С этой целью десяти СПФ-эмбрионам кур вводили в аллантоисную полость по 0,2 см³ вакцины из средней пробы, пять эмбрионов оставляли интактными для контроля. Эмбрионы инкубировали в течение 72 ч при температуре $(37,0\pm 1,0)^{\circ}C$ с проведением ежедневной овоскопии. Гибель эмбрионов в течение 24 ч считали неспецифической. По окончании срока инкубации оставшиеся живыми и павшие позднее 24 ч эмбрионы охлаждали при температуре от 2^oC до 8^oC, асептически вскрывали, отбирали по 2,0 см³ ЭЭЖ и объединяли в одну пробу.

Объединённую пробу ЭЭЖ от эмбрионов первого пассажа использовали для проведения второго пассажа, который выполняли аналогично. Объединённую пробу ЭЭЖ от эмбрионов второго пассажа использовали для проведения третьего заключительного пассажа, который выполняли по аналогичной схеме.

После третьего пассажа от эмбрионов отбирали отдельные пробы ЭЭЖ, которые исследовали в РГА.

Вакцину считали полностью инаktivированной, если после третьего пассажа все эмбрионы оставались живыми, а ЭЭЖ от каждого эмбриона не обладала гемагглютинирующей активностью.

2.2.5 Определение стерильности. Определение контаминации бактериальной и грибной микрофлорой живой вакцины проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 28085 «Препараты биологические. Метод контроля стерильности», инаktivированной вакцины - в соответствии с ГФ XV, ОФС.1.2.4.0003. Исключали рост бактериальной и грибной микрофлоры путем посевов проб, взятых из образцов, на питательные среды.

2.2.6 Определение стабильности эмульсии. Стабильность эмульсии оценивали путем центрифугирования в пробирках образцов вакцины по 10 см³ при 2500-3000 об/мин в течение 30 минут. Испытание проводили в прозрачных центрифужных пробирках, в которых высота столба тестируемого препарата позволяла достоверно определять отрезок в 10% от верхней границы. Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования в каждой из трех пробирок в процессе визуального контроля не было обнаружено никаких изменений содержимого, или если высота столба прозрачной фракции, сформировавшейся в верхней части пробирки, не превышала 10 мм. Не допускалось появления после центрифугирования прозрачной фракции на дне пробирки или полного расслоения эмульсии, когда препарат полностью теряет свой белый цвет, разлагаясь на составляющие компоненты: верхнюю масляную и нижнюю водную фракции с видимой границей раздела двух фаз. Данный тест рассматривали как модель долговременных испытаний состояния эмульсии.

2.2.7 Определение кинематической вязкости. Кинематическую вязкость определяли с помощью вискозиметра по ГФ XV, ОФС.1.2.1.0015. Показатель вязкости вакцины должен быть не более 200 мм²/с.

2.2.8 Определение безвредности вакцин. Живую вакцину на безвредность проверяли на 10-14 суточных цыплятах интраназально в 10-

кратной дозе. Инактивированную вакцину для определения безвредности вводили птицам в возрасте 30 суток в двукратной дозе внутримышечно в объеме 1,0 см³.

Группы птиц были по 10 голов. По пять голов птицы для каждой группы оставляли интактными. За птицей вели наблюдение в течение 14 суток. По окончании срока наблюдения проводили диагностический убой птицы, отмечая наличие реакции на месте введения вакцины. Вакцину считали безвредной, если вся птица в течение 14 суток наблюдения оставалась живой, без клинических признаков переболевания. При патоморфологическом обследовании подопытных птиц на месте введения вакцины не должно быть выраженной воспалительной реакции.

2.2.9 Оценка местной реакции на введение эмульсионной вакцины.

Оценку проводили при вскрытии птиц через 28 суток после вакцинации в двукратном прививном объеме. Степень воспалительного процесса тканей на месте инъекции оценивали по критериям Н. Stone:

- легкие поражения: побледнение тканей, окружающих место инъекции, на площади до 1 см³ в диаметре, отсутствие воспаления и инкапсулированных остатков вакцины;
- средние поражения: зона воспалительной реакции тканей, проявляющаяся их отеком, побледнением или гиперемией, имеет размеры от 1 до 2 см³ в диаметре, присутствуют остатки инкапсулированной или диффузно распределенной вакцины;
- сильные поражения: очаг воспаления тканей с вовлечением глубоких и поверхностных мышц и образованием гранулем составляет в диаметре от 3 до 4 см³, вакцина вытекает на разрезе или присутствует в тканях в виде творожистого вещества.

2.2.10 Определение антигенной активности вакцин.

Инактивированную вакцину проверяли на птице 30-60-суточного возраста, живую на цыплятах 10-14-суточного возраста. Опытным птицам (в группах по

10 голов) вводили образцы серий вакцин в одной прививной дозе: живую перорально/интраназально/спрей методом, инактивированную в грудную мышцу или подкожно однократно в объёме 0,5 см³. По 10 голов птицы для каждой группы оставляли интактными. У птицы опытной и контрольной групп до и через 28 суток после вакцинации из подкрыльцовой вены брали кровь, из которой получали сыворотку общепринятым методом. Пробы сывороток от птицы каждой группы, полученные до и после вакцинации, исследовали в РТГА на наличие антител к вирусам ГП и НБ, используя коммерческие наборы производства ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Вакцину считали антигенно активной, а вакцинацию эффективной, в случае если через 28 суток после вакцинации не менее чем у 80% привитой птицы титры антител составляли в РТГА:

- к вирусу гриппа птиц Н9 не ниже 4,0 log₂;
- к вирусу ньюкаслской болезни штамма «ВНИИЗЖ G7» или штамма «Ла-Сота» не ниже 5,0 log₂;
- к вирусу гриппа птиц Н5 не ниже 6,0 log₂.

При наличии у опытной и контрольной птицы до вакцинации антител к вирусам ГП и НБ через 28 суток после вакцинации оценивали, чтобы уровень сывороточных антител у птицы опытной группы не менее чем в два раза превышал таковой у птицы контрольной группы. При этом прирост титров антител у птицы контрольной группы за период опыта должен отсутствовать.

2.2.11 Получение 1%-ной суспензии эритроцитов петуха. Для получения 1%-ной суспензии эритроцитов у петухов старше 6 месяцев из подкрыльцовой вены отбирали кровь в стерильный шприц с 3%-ным раствором лимоннокислого натрия в соотношении 1:2, осадок трижды отмывали ФБР путём центрифугирования при 1500 g в течение 10 мин. Из осадка эритроцитов на ФБР готовили 1%-ную суспензию. Для этого к 99,0 см³ ФБР добавляли 1,0 см³ осадка эритроцитов. Хранили суспензию при температуре 2⁰-8⁰С.

2.2.12 Определение гемагглютинирующей активности. Определяли гемагглютинирующий титр вируса в реакции гемагглютинации (РГА) и рассчитывали его рабочую дозу.

Гемагглютинирующую активность вируса ГП устанавливали в реакции гемагглютинации с использованием 1%-ной суспензии эритроцитов петуха. Для постановки реакции использовали 96-луночные полистироловые планшеты. В каждую лунку планшета вносили по 0,025 см³ стерильного ФБР, далее в первую лунку вносили пипеткой 0,025 см³ вирусосодержащей ЭЭЖ, трёхкратно пипетировали и готовили двукратные последовательные разведения от 1:2 до 1:4096. Из последней лунки 0,025 см³ удаляли. Затем во все лунки вносили 1%-ную суспензию эритроцитов петуха в объёме, равном исходному объёму ФБР. Планшеты аккуратно встряхивали и оставляли при температуре 20-25⁰С. Учёт реакции проводили после оседания эритроцитов в контроле. Результат РГА учитывали как положительный при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», как отрицательный - в виде «пуговки». За титр вируса принимали его предельное разведение, дающее чётко выраженную агглютинацию в виде «зонтика», и выражали в log₂. Контролем служил ряд лунок с эритроцитами и ФБР в равных объёмах, по 0,05 см³ в каждой.

2.2.13 Определение титра антител в сыворотках крови птиц в РТГА. Использовали антигены вирусов НБ и ГП из наборов и дополнительно инактивированный антиген вируса НБ штамма «ВНИЗЖ G7». РТГА проводили в два этапа:

- определяли гемагглютинирующий титр антигена вируса в реакции гемагглютинации, и рассчитывали его рабочую дозу (4 ГАЕ);
- определяли титр антител в пробах сывороток крови.

Для постановки РГА готовили двукратные разведения антигена вируса от 1:2 до 1:4096. С этой целью во все лунки полистиролового планшета пипеткой разливали ФБР (0,025 см³), в первую вносили в равном объёме антиген, трёхкратно пипетировали и последовательно переносили 0,025 см³ во

вторую лунку и т.д. Из последней лунки $0,025 \text{ см}^3$ удаляли. После во все лунки вносили 1%-ную суспензию эритроцитов петуха в объеме, равном исходному объему ФБР. Планшет аккуратно встряхивали и оставляли при температуре $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$. Учёт реакции проводили после оседания эритроцитов в контроле. РГА учитывали положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», отрицательно - в виде «пуговки». За титр антигена принимали его наибольшее разведение, дающее чётко выраженную агглютинацию в виде «зонтика». Для постановки РТГА готовили рабочую дозу антигена (4 ГАЕ), исходя из его титра.

Во все лунки полистиролового планшета вносили ФБР в объеме $0,025 \text{ см}^3$. В первую лунку добавляли равный объем испытуемой сыворотки, трижды пипетировали и готовили ряд последовательных двукратных разведений (от 1:2 до 1:4096). После этого, во все лунки вносили рабочее разведение антигена в объеме $0,025 \text{ см}^3$, осторожно встряхивали и после 30 мин. контакта сыворотки с антигеном при температуре 37°C в каждую лунку добавляли равный объем суспензии эритроцитов. РТГА учитывали через 25-40 мин. При наличии в сыворотке специфических антител наблюдают торможение гемагглютинации - эритроциты выпадают в осадок в виде «пуговки». Титром сыворотки считали наибольшее её разведение, дающее полное торможение гемагглютинации 4 ГАЕ антигена вируса ГП специфичного подтипа, выражали в $\log_2$.

Постановка РТГА сопровождалась контролями:

- $0,025 \text{ см}^3$ 1%-ной суспензии эритроцитов петуха и $0,025 \text{ см}^3$ ФБР (агглютинации эритроцитов не должно быть);

- $0,025 \text{ см}^3$ специфической положительной к ВГП исследуемого подтипа сыворотки крови, $0,025 \text{ см}^3$ антигена ВГП гомологичного подтипа в рабочем разведении и $0,05 \text{ см}^3$ 1%-ной суспензии эритроцитов петуха (должно наблюдаться торможение гемагглютинации);

- $0,025 \text{ см}^3$ нормальной (отрицательной) к ВГП сыворотки крови кур, $0,025 \text{ см}^3$ антигена в рабочем разведении и $0,05 \text{ см}^3$ 1%-ной суспензии

эритроцитов петуха (должна наблюдаться чётко выраженная гемагглютинация).

2.2.14 Определение стабильности штамма при репродукции последовательными пассажами в КЭ. Данная процедура является обязательной при депонировании вновь выделенных штаммов вируса. Системой культивирования служат 9–11-суточные эмбрионы кур. Задачей исследования являлось исключение признаков модификации вируса при проведении пяти последовательных пассажей вируса в организме эмбрионов. Критерием стабильности штамма считали статистическое равенство оценок инфекционного титра вируса, установленных в данной биосистеме на первом и пятом пассаже.

2.2.15 Определение индекса интрацеребральной патогенности (ICPI) вируса Ньюкасла для цыплят проводили по стандартной рабочей процедуре, используемой Международной референс-лабораторией ВОЗЖ/ФАО [439]. Для определения ICPI использовали десять суточных СПФ-цыплят. Каждому цыпленку интрацеребрально в объеме 0,05 см³ вводили образец тестируемого вирусосодержащего материала, в котором исключено присутствие посторонних вирусов или бактерий. Ежедневно, в течение восьми суток, определяли клиническое состояние инфицированных птиц. Раздельно учитывали количество здоровых (а), клинически больных (b) и павших птиц (с). В случае, если больная птица имела признаки параличей и не могла принимать пищу, то ее считали, как погибшую. По окончании срока наблюдений определяли накопленные величины: $\sum a$; $\sum b$; $\sum c$. Полученные значения умножали на соответствующие коэффициенты (баллы, k) и вычисляли общий клинический показатель в баллах: $\sum w = (\sum a) \times 0 + (\sum b) \times 1 + (\sum c) \times 2$. Индекс интрацеребральной патогенности (ICPI) рассчитывали по следующей формуле:

$$ICPI = (\sum w) / 80,$$

где 80 – константная величина, равная количеству птицеведней.

Для вируса болезни Ньюкасла величина ICPI, превышающая единицу, свойственна высоковирулентным агентам, оценка 0,7 и ниже соответствует фенотипу лентогенных штаммов. При значении ICPI = 1,2 и выше для вируса гриппа штамм считали высокопатогенным.

2.2.16 Определение индекса внутривенной патогенности для цыплят проводили по стандартной рабочей процедуре, используемой Международной референс-лабораторией ВОЗЖ/ФАО [438]. Для определения IVPI использовали десять СПФ-цыплят в возрасте шести недель. Каждому цыпленку в подкрыльцовую вену в объеме 0,1 см³ вводили образец тестируемого вируссодержащего материала, в котором исключено присутствие посторонних вирусов или бактерий. Ежедневно, в течение 10 суток, определяли клиническое состояние инфицированных птиц. Раздельно учитывали количество здоровых (a), больных (b), тяжело больных (c) и павших птиц (d). В случае, если больная птица имела признаки параличей и не могла принимать пищу, то ее считали, как погибшую. По окончании срока наблюдений определяли накопленные величины: $\sum a$; $\sum b$; $\sum c$; $\sum d$. Полученные значения умножали на соответствующие коэффициенты (баллы, k) и вычисляли общий клинический показатель в баллах: $\sum w = (\sum a) \times 0 + (\sum b) \times 1 + (\sum c) \times 2 + (\sum d) \times 3$. Индекс интравенозной патогенности (IVPI) рассчитывали по следующей формуле:

$$IVPI = (\sum w) / 100,$$

где 100 – константная величина, равная количеству птицеводней.

Индекс внутривенной патогенности IVPI, превышающий 1,2, указывает на высокую патогенность вируса птичьего гриппа А в соответствии с критериями, принятыми ВОЗЖ.

2.2.17 Оценка результатов контрольного заражения вакцинированных птиц. Образец вакцины испытывали на отдельной группе птиц численностью не менее 10 голов. Дополнительно была образована группа контроля активности вируса численностью 10 голов, которых не

вакцинировали (интактные птицы). Группы птиц содержали в изолированных боксах с автономной вентиляцией, подачей воды и корма.

Через 28 сут после вакцинации в группах иммунизированных и интактных птиц проводили контрольное заражение. Наблюдения клинического состояния зараженной птицы продолжали в течение 7-10 суток. В каждой группе ежедневно регистрировали количество больных и погибших птиц. По окончании срока наблюдений в опытной и контрольной группах вычисляли клинические индексы (С):

$$C = (\sum a + \sum b)/n,$$

где: $\sum a$ – число клинически больных птиц на конец опыта; $\sum b$ - число павших птиц за период опыта; n – число птиц в группе до заражения (при проведении анализа результатов контрольного заражения оценки $\sum a$ и $\sum b$ могут быть рассмотрены отдельно и использованы для вычисления индексов: $I_n = (\sum a)/n$ – **индекса заболеваемости** и $L_e = (\sum b)/n$ - **индекса смертности**).

Оценку эффекта иммунной защиты вакцинированной птицы представляли в виде **протективного индекса (Pr)**:

$$Pr = (C_0 - C_1)/C_0,$$

где: C_0 - клинический индекс в контрольной группе; C_1 - тоже в вакцинированной группе.

Оценка Pr может принимать следующие значения:

- $Pr = 0$, если защита вакцинированных птиц отсутствует (т. е. $C_0 = C_1$);
- $Pr = 1$, если все вакцинированные птицы защищены (т. е. $C_1 = 0$).
- $Pr = (1 - C_1)$, если в контрольной группе после контрольного заражения все птицы погибли (т. е. $C_0 = 1$), или как $Pr = \sum e/n$, где $\sum e$ – число клинически здоровых вакцинированных птиц на конец опыта.

2.2.18 Оценка показателя PD_{50} для инактивированных вакцин.

Определение количества PD_{50} в прививном объеме вакцины проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке титра 50-процентных протективных доз (PD_{50}) для инактивированных вакцин против

вирусных болезней птиц» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024 г.). Концентрацию антигена (D) в составе вакцины регулировали путем разведения физиологическим раствором. Приготовленные разведения антигена объединяли с масляным адъювантом в соотношении 30:70 (по весу) и эмульгировали на высокоскоростном лабораторном эмульсоре «Сильверсон» при скорости 6000 об/мин в течение пяти минут. Таким образом, готовили образцы вакцины, содержащие цельный антиген ($D=1$) и образцы, содержащие антиген в разведениях 1:25, 1:50 и 1:100 ($D=25$; $D=50$ и $D=100$).

Для каждого образца вакцины в соответствии с пунктом 2.2.17 был определен протективный индекс (Pr).

Для вычисления показателя D_{50} применяли регрессионный анализ [47]. Для приближения зависимости между величинами D и Pr к линейному виду значения D логарифмировали ($\lg D$), при этом оценки P преобразовывали в линейные эквиваленты ($Y = f(P)$). В качестве линейных эквивалентов использовали пробиты [19] или (аналог пробитов) логит-преобразования по Берксону [7] по формуле: $Y = \log (Pr/(1 - Pr))$. Логит-эквиваленты позволяли производить обратное преобразование по формуле: $P = 1 - 1/(1 + (\text{antilg } Y))$.

Для эмпирических значений $Pr = 1$ и $Pr = 0$, использовали условные оценки $'Pr_1 = (1 - 1/5n)$ и $'Pr_0 = 1/5n$ [79].

2.2.19 Оценка иммунизирующей (прививной) дозы антигена в размерности ГАЕ. Прививную дозу антигена (A) в ГАЕ вычисляли соответственно доле антигена в прививном объеме препарата ($0,5 \text{ см}^3$), его содержанию в исходном материале ($A_0, \text{ ГАЕ}/0,1 \text{ см}^3$) и заданной концентрации (разведению) антигена при приготовлении вакцины (D). Расчет выполняли по формуле $A = (5/3 A_0)/D \approx 1,7A_0/D$, $\text{ГАЕ}/0,5 \text{ см}^3$.

2.2.20 ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Реакцию проводили с помощью SynTaq ДНК-полимеразы (Синтол, Россия), MMLV-ревертазы (Синтол, Россия), ПЦР-Буфера-Б 10x (Синтол, Россия), смеси дНТФ (Синтол,

Россия), раствора $MgCl_2$ 25 мМ (Синтол, Россия), воды, свободной от РНК-аз, раствора прямого праймера (M4100F, 5'-agt-gat-gtg-ctc-gga-cct-tc-3'), обратного праймера (M4220R, 5'-atc-gtt-tac-gga-gag-gag-tcc-3') и флуоресцентного зонда (M4169, 5'-ttc-tct-agc-agt-ggg-aca-gcc-tgc-3') в амплификаторе Rotor Gene Q (Qiagen, Германия).

Использовали следующие температурно-временным режимы: обратная транскрипция – 20 мин. при 40°C, активация полимеразы – 8 мин. при 95°C, далее 40 циклов ПЦР, состоящие из денатурации – 10 сек при 95°C, отжига праймеров – 35 сек при 55°C и элонгации – 10 сек при 72°C.

Результирующим показателем реакции считали величину порогового цикла амплификации (Ct).

2.2.21 Секвенирование. Анализ нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы BioEdit, версия 7.0.5.3. Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы множественного выравнивания ClustalW. Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 6.06.

2.2.22 Статистическая обработка результатов экспериментов. Использовали стандартные методы обработки выборок n - числа варьирующих переменных (x) [27]. Определяли средние оценки ($\sum x/n$), стандартные отклонения выборок вида $S = \sqrt{Q/(n-1)}$ и стандартные отклонения средних вида $s = \sqrt{Q/(n-1)n}$, где $Q = (\sum x^2) - (\sum x)^2/n$. Статистические различия эмпирических средних оценок считали существенными при $p \leq 0,05$. Специальные статистические методы описаны в соответствующих разделах диссертации. Вычислительные операции и графические построения выполняли с помощью приложения «Excel».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Эпизоотологический анализ распространения вирусов болезни Ньюкасла и высокопатогенного гриппа птиц на территории Российской Федерации

Болезнь Ньюкасла и высокопатогенный грипп птиц являются наиболее значимыми заболеваниями, представляющими опасность как для здоровья сельскохозяйственной птицы, так и человека. Поэтому для обеспечения благополучия и минимизации проблем, связанных со вспышками высокопатогенного гриппа птиц и болезни Ньюкасла необходимо контролировать циркуляцию и распространение вышеуказанных вирусов на территориях субъектов Российской Федерации.

При анализе эпизоотической ситуации по болезни Ньюкасла в Российской Федерации за последние годы необходимо отметить, что страна эндемически неблагополучна по вышеуказанному заболеванию. Так, с 2005 по 2018 годы болезнь Ньюкасла практически ежегодно регистрировалась в популяциях домашней птицы в 15 субъектах Российской Федерации, в т.ч. Краснодарском, Ставропольском, Приморском, Алтайском, Забайкальском краях, Чеченской Республике, Республике Крым, Республике Ингушетия и Саратовской, Ростовской, Омской, Владимирской, Ивановской, Челябинской и Курской областях (рисунок 1). Вспышки регистрировали преимущественно в лично-подсобных хозяйствах, занимающихся содержанием кур на не вакцинированном поголовье. Как видно из данных, представленных на рисунке 1, наибольшее количество неблагополучных пунктов по ньюкаслской болезни в вышеуказанный период было зарегистрировано в Центральном, Южном, Приволжском и Сибирском федеральных округах.

Особо можно отметить вспышки болезни Ньюкасла в Республике Крым. Там впервые на территории РФ был выделен вирус НБ субгенотипа VII_i, в конце 2015 г. Случаи возникновения ньюкаслской болезни на данной

территории продолжались весь 2016 г., что на тот период времени являлось самой крупной и продолжительной эпизоотией болезни среди сельскохозяйственных птиц в России за несколько последних десятилетий (21 неблагополучный пункт).

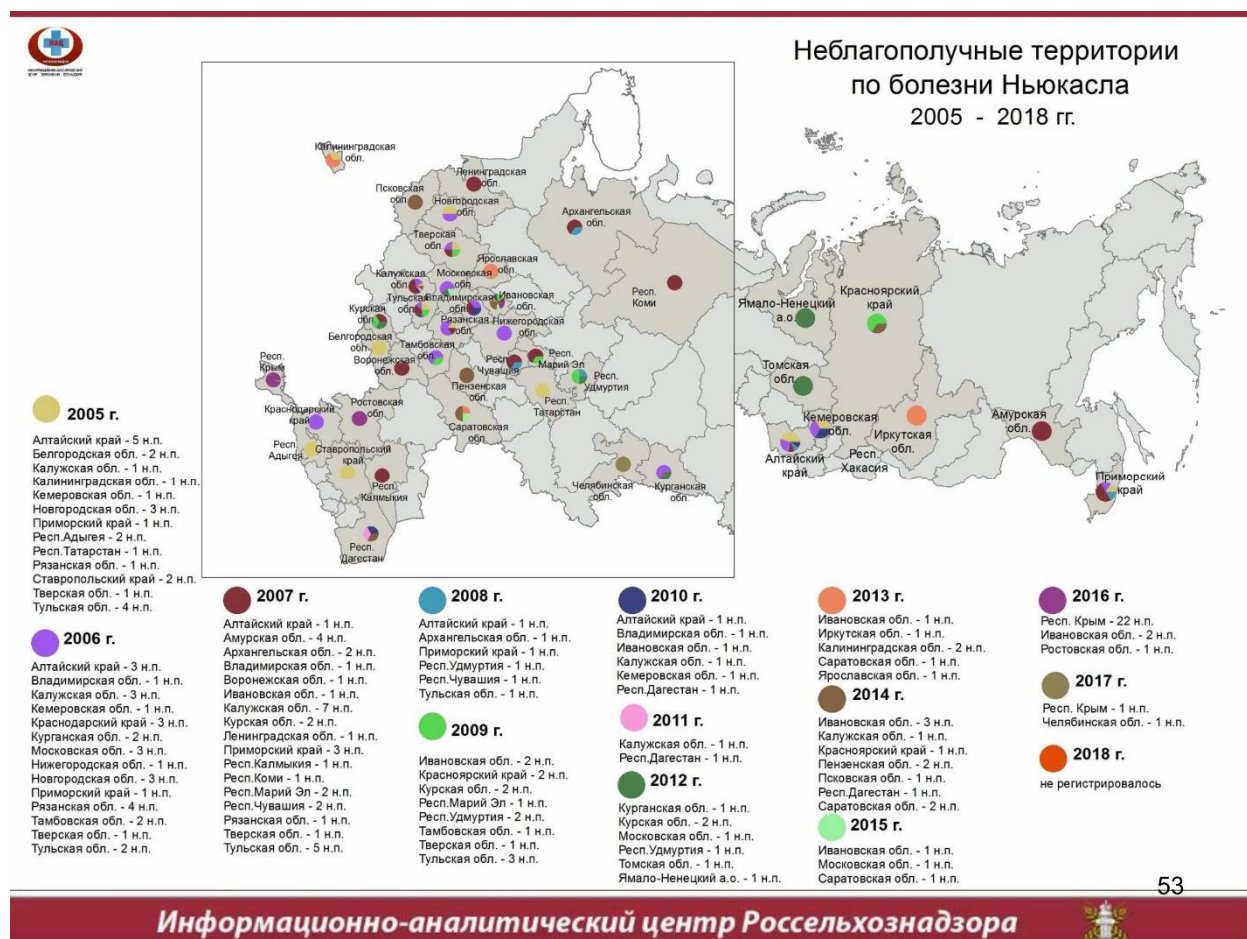


Рисунок 1 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории РФ в 2005-2018 гг.

По данным срочных сообщений ветеринарных служб субъектов РФ за 2019 г. было зарегистрировано 18 неблагополучных пунктов по ньюкаслской болезни в девяти регионах страны (рисунок 2). Болезнь Ньюкасла была выявлена преимущественно у кур, содержащихся в ЛПХ, за исключением одного очага в Ставропольском крае (пос. Солнечный), где ее установили у гусей. Изоляты вируса болезни Ньюкасла, выделенные на территории РФ в 2019 году, были генетически гомогенны и относились к новому субгенотипу

VII L, впервые описанному в 2017 г. в Иране (уровень отличия от иранских изолятов не превышал 2%). Сайт расщепления белка F0 вируса имел структуру 112RRQKR^F117, что позволяло охарактеризовать его как потенциально вирулентный. До 2019 года высоковирулентные изоляты вируса болезни Ньюкасла, выделяемые на территории Российской Федерации, относились к субгенотипам VII и VIIi.

Следует отметить, что эпизоотия ньюкаслской болезни, вызванная вирусом подтипа VII L, в 2019 г. была масштабной по географии распространения (Краснодарский край, Чеченская Республика, Ставропольский край, Приморский край, Саратовская область, Забайкальский край, Алтайский край, Омская и Курская области) и достаточно длительной по времени (с января по декабрь 2019 г.).

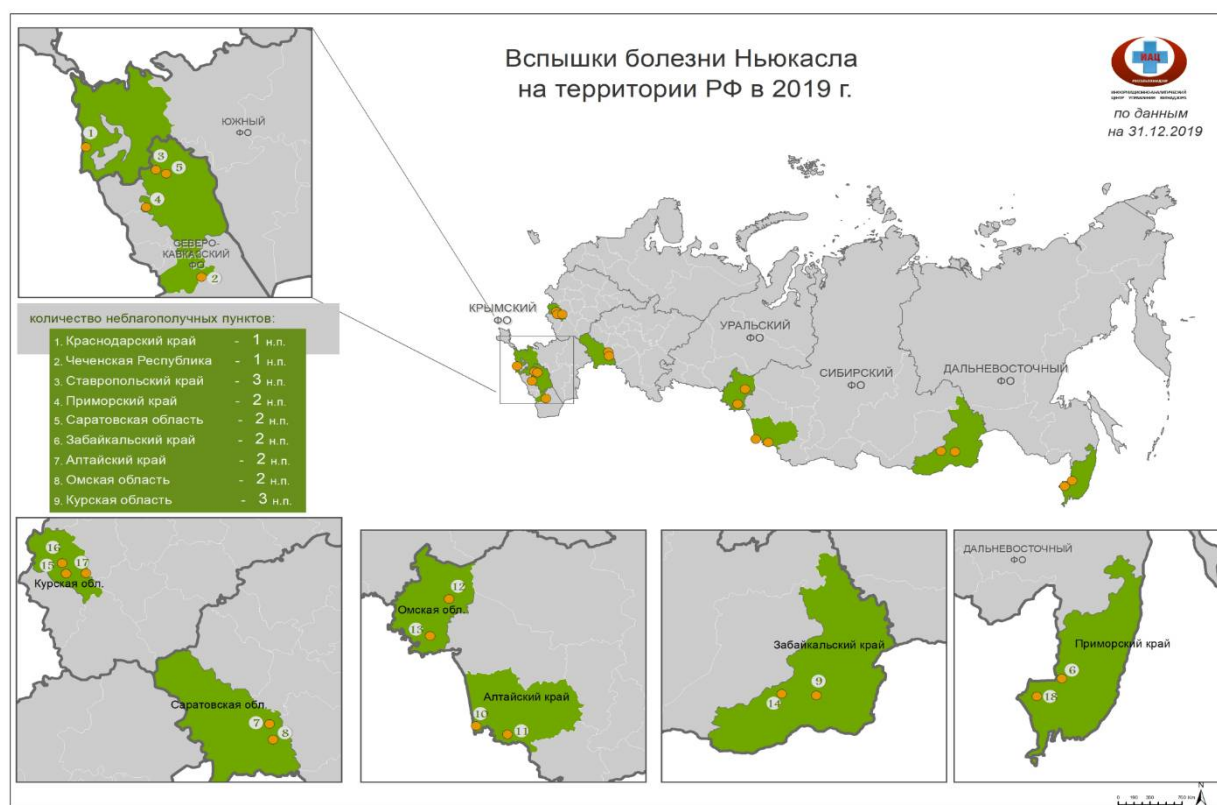


Рисунок 2 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории РФ в 2019 г.

В 2020 г. эпизоотическая ситуация по НБ оставалась напряженной, новый для России вирус болезни Ньюкасла субгенотипа VII L (7.1.1 по другой классификации) продолжил свое распространение по территории страны и уже регистрировался в Центральном и Северо-Кавказском федеральных округах. Всего на территории Российской Федерации в 2020 г. было зарегистрировано 15 неблагополучных пунктов по НБ (рисунок 3). Восемь неблагополучных пунктов были зафиксированы на территории Владимирской области.

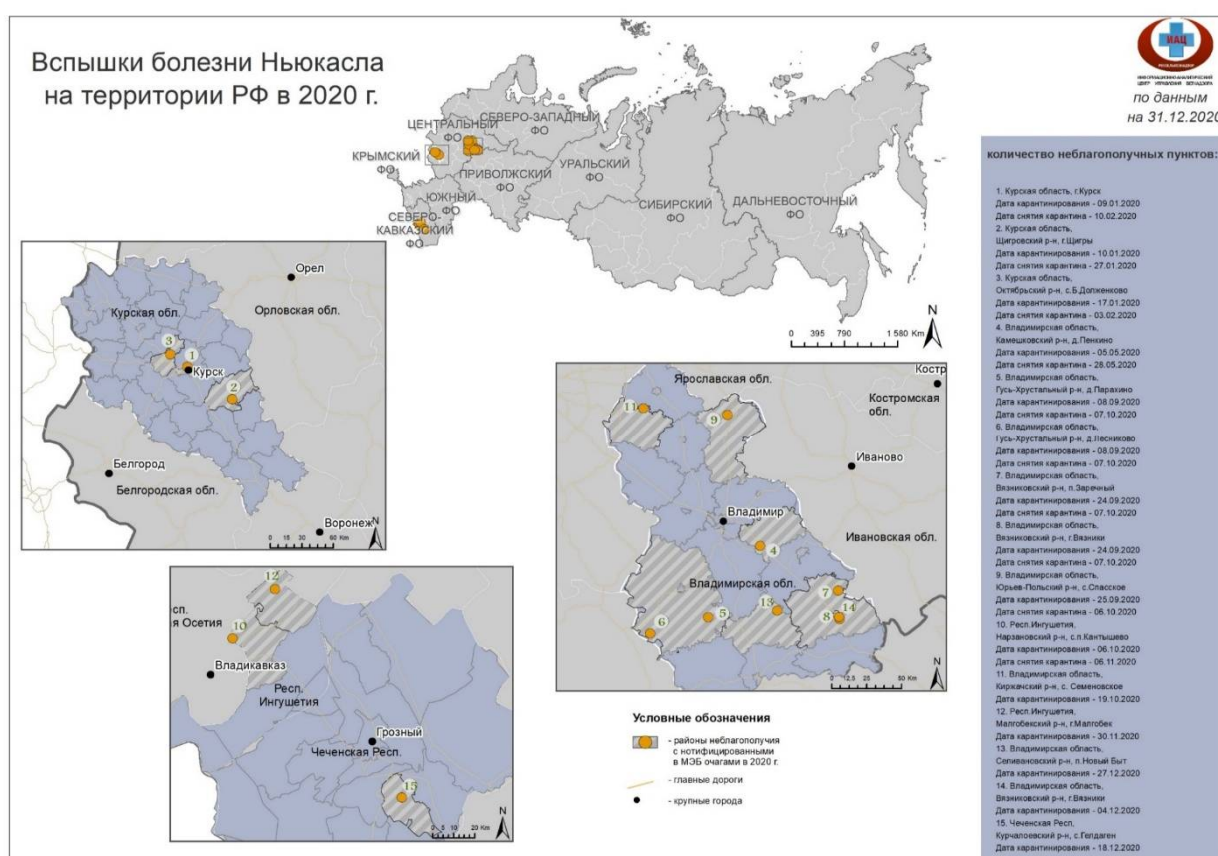


Рисунок 3 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории РФ в 2020 г.

В 2021 г. вспышки ньюкаслской болезни в стадах домашних кур были зарегистрированы в пяти случаях в Центральном, Дальневосточном и Уральском федеральных округах (рисунок 4). Неблагополучными по НБ в указанный период были Владимирская и Нижегородские области, Ханты-

Мансийский АО и Приморский край. Все зарегистрированные случаи также отмечали у домашних кур в лично-подсобных хозяйствах. Вирус НБ также относился к субгенотипу VII L.

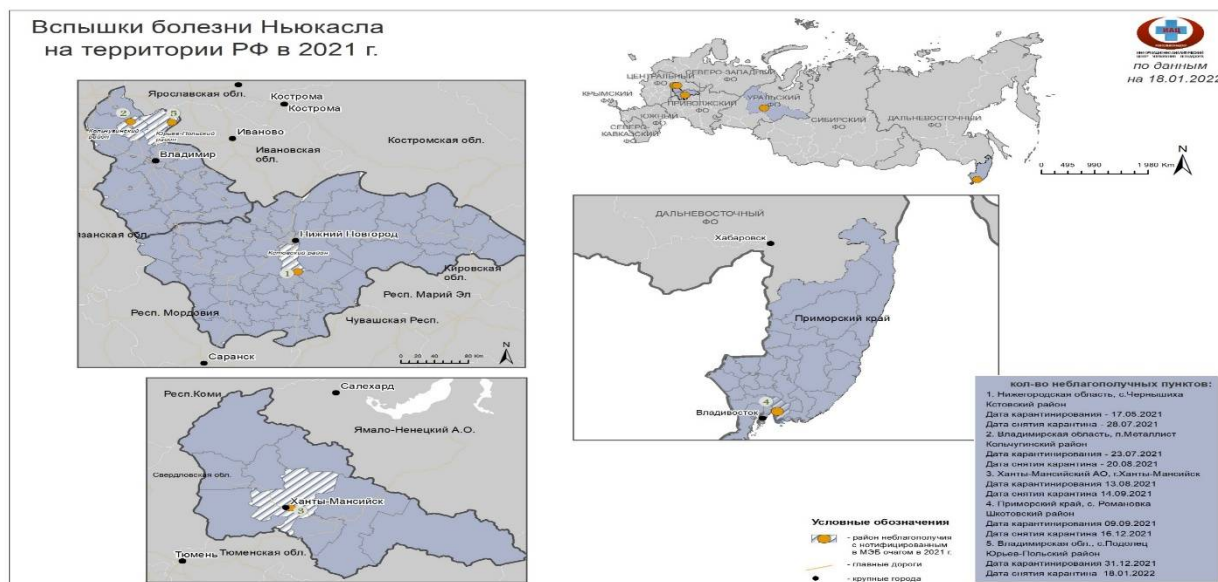


Рисунок 4 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории РФ в 2021 г.

В 2022 г. на территории РФ установлено 16 неблагополучных пунктов по НБ (рисунок 5) в шести регионах страны (Владимирская, Ростовская, Саратовская и Самарская области, а также Республика Башкортостан и Забайкальский край). Стерлибашевская птицеферма в Башкирии в 2022 г. из-за вспышки болезни Ньюкасла потеряла девять тысяч цыплят-бройлеров: семь тысяч погибли от болезни, еще две тысячи голов пришлось уничтожить в порядке карантинных мер.

В литературе имеются публикации о выявлении болезни Ньюкасла в 2022 г. в официально благополучных регионах [78; 415]. В августе 2022 г. в частном хозяйстве Подмосковья в течение короткого времени после появления первых симптомов заболевания погибло все поголовье кур. В тканях органов погибших птиц был обнаружен вирус ньюкаслской болезни. Лабораторное исследование изолята показало высокую патогенность данного вируса для кур и отсутствие патогенности для мышей. С помощью

молекулярного анализа и теста MDT проверено несколько факторов, указывающих на отношение изолята NDV/chicken/Moscow/6081/2022 к группе велогенных ВНБ. Для гена F определен мотив сайта протеолиза 109SGGRRQKRFIG119, типичный для велогенного патотипа, также проведен филогенетический анализ, по результатам которого установлена принадлежность изолята вируса к субгенотипу VII L. С помощью BasicLocal AlignmentSearch Tool было выявлено наиболее генетически близкое родство выделенного вируса с изолятами из Ирана.

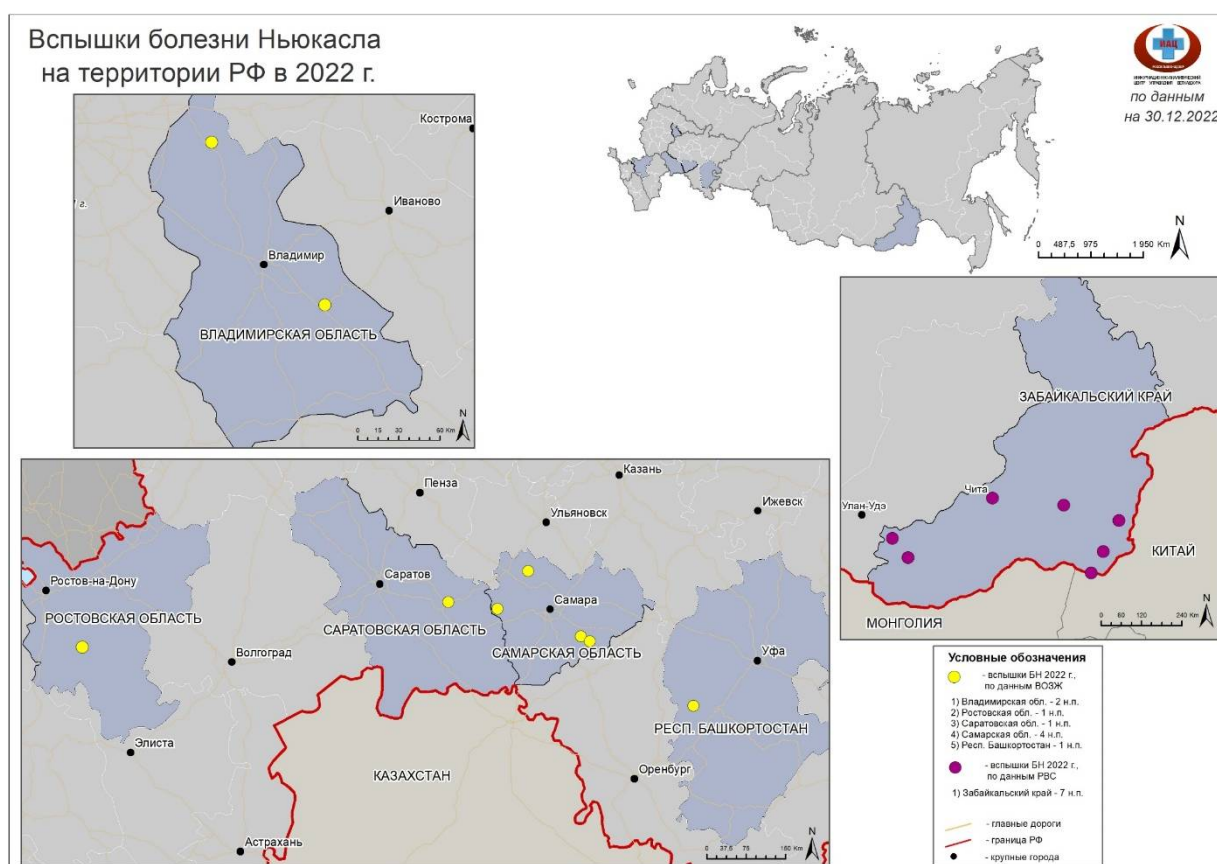


Рисунок 5 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории Российской Федерации в 2022 г.

В 2023 г. в России было зарегистрировано 13 неблагополучных пунктов по НБ в семи регионах страны: Владимирская, Иркутская, Нижегородская области, Республики Марий Эл и Удмуртия, Самарская область и Ханты-Мансийский АО (рисунок 6).

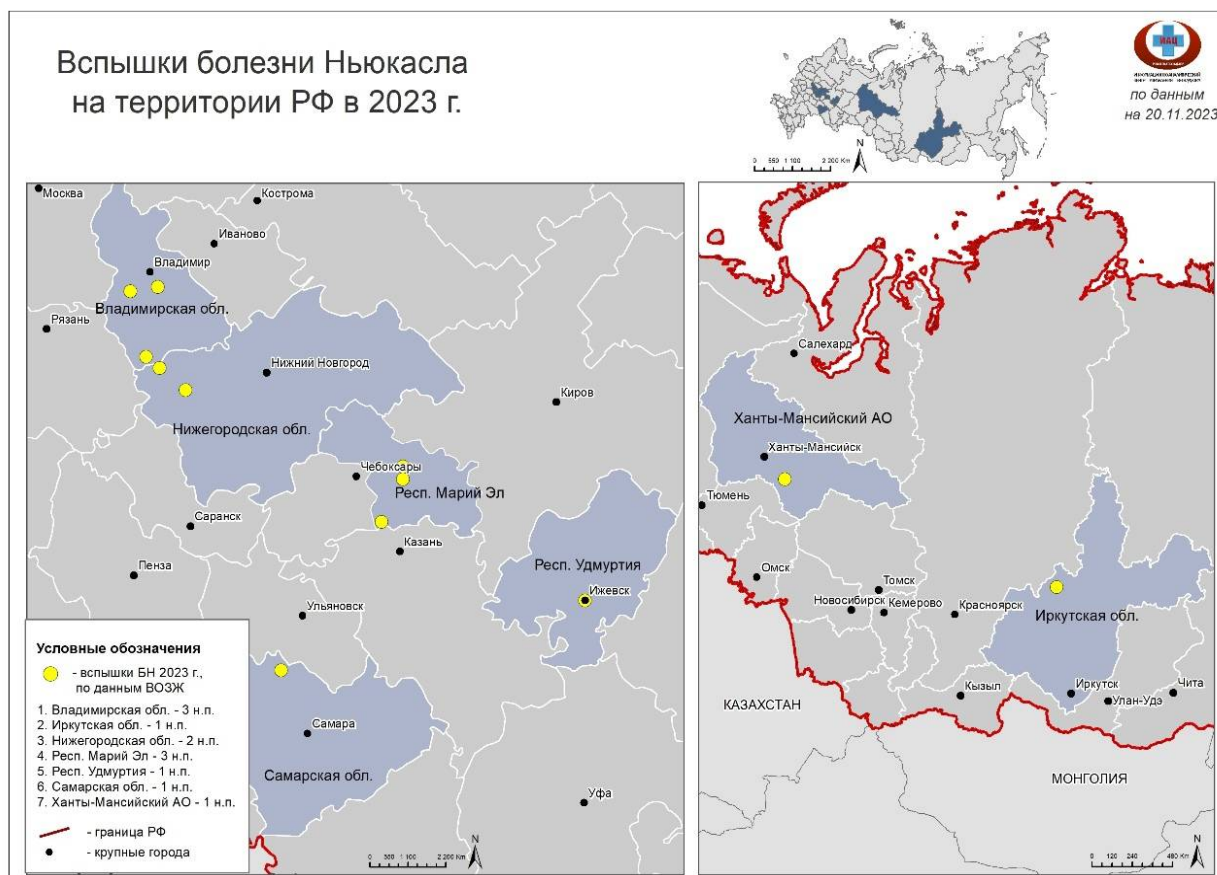


Рисунок 6 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории РФ в 2023 г.

Таким образом, анализируя эпизоотическую обстановку по ньюкаслской болезни в РФ можно сделать вывод, что возбудитель НБ распространен практически на всей территории страны. До 2019 г. изоляты вируса ньюкаслской болезни относились к субгенотипам VIId, VIIh и VIIi, а выделенные во время вспышек с 2019 года по настоящее время вирусы были отнесены к субгенотипу VII L (7.1.1).

По высокопатогенному гриппу птиц эпизоотическая ситуация как в мире, так и России в настоящее время остается крайне напряженной. Проведенный эпизоотологический анализ показывает, что на территории России следует выделить два эпизоотических периода: с 2005 по 2007 г. и с 2016 г., продолжающегося и сейчас. Пик первой волны эпизоотии, которая была обусловлена вирусом ВГП типа А подтипа H5N1, пришелся на летне-

осенний период в 2005 г. и зимне-весенний сезон в 2006-2007 гг. В результате пало и было уничтожено около трех млн. голов птиц сельскохозяйственного назначения.

За период с 2007 по 2024 г. на территории России было нотифицировано по ВГП 290 неблагополучных пунктов в ЛПХ, 103 вспышки заболевания на дикой птице и наложен карантин на 49 птицефабрик (рисунок 7).

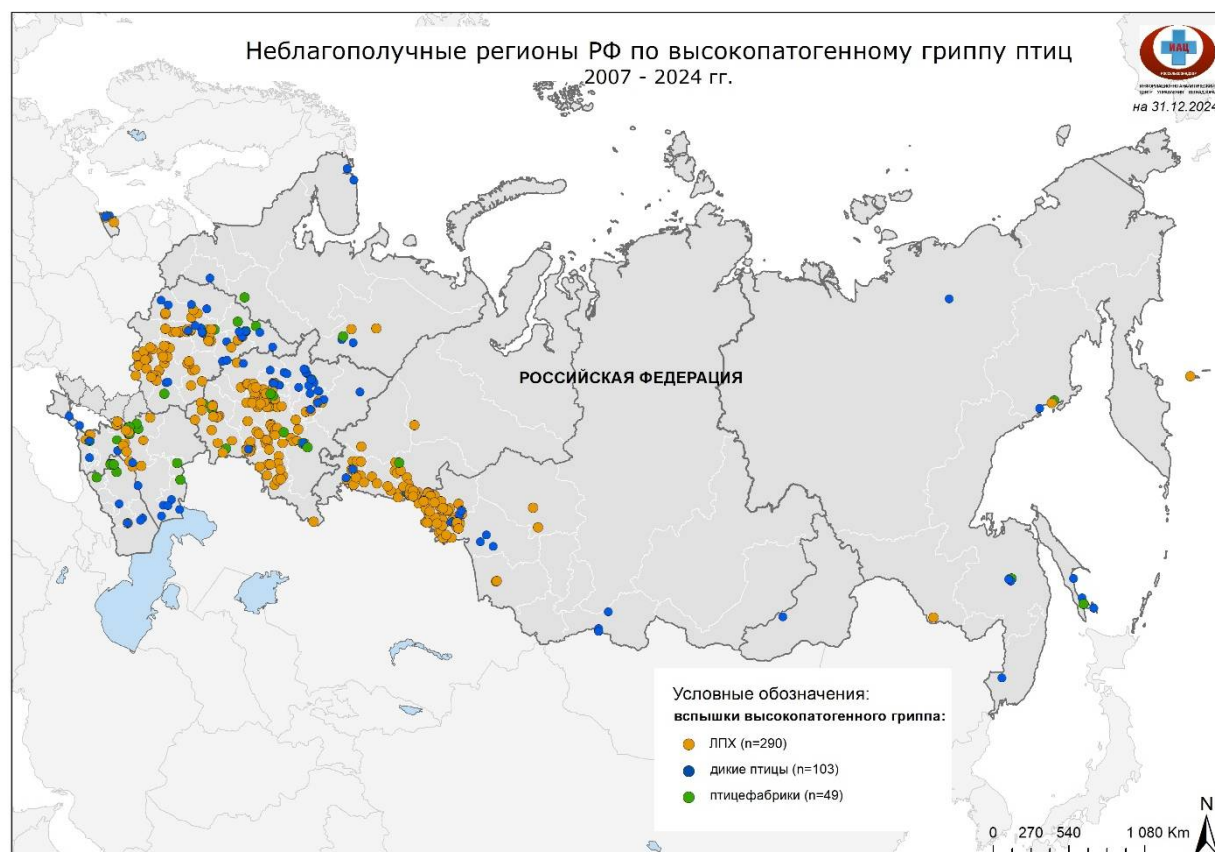


Рисунок 7 – Неблагополучные пункты по высокопатогенному гриппу птиц на территории РФ в 2007-2024 гг.

Несмотря на принятую в стране стратегию ограниченной целевой вакцинации птиц в личных подворных хозяйствах, не удалось предотвратить распространения вируса и его заноса в крупные промышленные предприятия закрытого типа. При сравнении двух эпизоотий ВГП - 2005-2007гг. (H5N1) и 2016-2021гг. (H5N8, H5N2, H5N5 и H5N1) - можно отметить, что количество вспышек ВГП в 2016-2024г. значительно выше. По количеству охваченных

болезнью регионов и поголовья домашних птиц, погибшего и уничтоженного при ликвидации вспышек, последствия текущей эпизоотии гораздо серьезней, особенно для промышленного птицеводства страны. В 2020 г. пало и уничтожено более 3,5 млн гол птиц, в 2021 – более 6 млн гол, а всего с 2016 по 2024 гг. это количество превысило 20 млн гол.

Ситуация по высокопатогенному гриппу птиц в мире также остается напряженной. Так, в 2024 г. инфекция затронула 68 стран, в результате чего погибли или были уничтожены порядка 19 млн голов сельскохозяйственной птицы. В 2025 г. только Европе в коммерческом птицеводстве было зарегистрировано 727 вспышек ВГП Н5. Кроме того, зафиксировано большое количество случаев выявления вируса гриппа А(Н5N1) среди диких и домашних млекопитающих, преимущественно на территории США. К их числу относятся вспышки на молочных фермах, поражавшие стада и охватившие более 900 молочных хозяйств на территории 16 штатов, а также ставшие причиной инфицирования 40 работников ферм в четырех штатах. Вирусы А(Н5N1), выявленные у работников ферм, содержали мутации адаптации к млекопитающим. Всего в 2024 г. зарегистрировано более 100 случаев инфицирования людей зоонозными вариантами вируса гриппа, при этом в 81 случае выявлен вирус гриппа А(Н5N1). Помимо вспышек А(Н5N1), в мире отмечена циркуляция и других вариантов вируса гриппа, таких как А(Н5N6), А(Н5N8), А(Н5N5), А(Н5N2). Кроме того, в ряде стран регистрировались вспышки среди домашней птицы, вызванные различными подтипами вируса гриппа А (Н7). В период осенней миграции 2025 года в 26 странах Европы у диких птиц было обнаружено 1443 случая заражения вирусом высокопатогенного птичьего гриппа А (Н5). Это в четыре раза больше, чем за аналогичный период предыдущего года. В России ситуация по высокопатогенному вирусу гриппа в 2024-2025 гг. была менее напряженной. Все выявленные вирусы гриппа А(Н5N1) относились к кладе 2.3.4.4b и генетически схожи с вакцинными штаммами, рекомендованными ВОЗ [12].

На основании результатов анализа эпизоотической ситуации, в динамике за последние годы, по высокопатогенному гриппу птиц и болезни Ньюкасла можно сделать вывод, что на территории Российской Федерации циркулируют изоляты высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа H5 и высоковирулентные изоляты вируса болезни Ньюкасла субгенотипа VII. Наиболее сложная эпизоотическая ситуация, как по одной, так и по другой болезни, отмечается в Южном и Центральном федеральных округах. По высокопатогенному гриппу птиц, к тому же, в Приволжском, Сибирском и Уральском федеральных округах.

Для обеспечения благополучия и минимизации проблем, связанных со вспышками высокопатогенного гриппа птиц и болезни Ньюкасла необходимо: соблюдение требований биологической безопасности в птицеводческих хозяйствах, контроль за циркуляцией и распространением вируса болезни Ньюкасла и высокопатогенного вируса гриппа птиц на территориях субъектов Российской Федерации, раннее выявление возбудителей и своевременное принятие мер по ликвидации очагов заболеваний. Для контроля распространения вируса необходимо также своевременно вакцинировать домашнюю птицу не только на птицефабриках, но и в частных хозяйствах.

3.2 Вакцинопрофилактика болезни Ньюкасла

3.2.1 Определение эффективности вакцин против болезни Ньюкасла

3.2.1.1 Протективная активность вакцин против болезни Ньюкасла производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» в отношении актуальных вирусов VII генотипа

Обострение эпизоотической ситуации по болезни Ньюкасла в 2019 г. и распространение данного вируса генотипа VII по всей территории Российской Федерации послужили основанием для проведения экспериментов с

заражением птиц актуальными изолятами вируса НБ VII генотипа для оценки протективной активности живых и инактивированных вакцин из штамма «Ла-Сота» при разных схемах применения.

Для проведения исследований было сформировано три опытных группы цыплят в возрасте 14-суток яичного направления продуктивности методом случайной выборки по 30 голов в каждой группе и одна контрольная (90 голов). Группа №1 была привита однократно живой вакциной против НБ из штамма «Ла-Сота», группа №2 была иммунизирована живой вакциной против НБ из штамма «Ла-Сота» – двукратно, группа №3 была привита двукратно живой вакциной против НБ и однократно инактивированной трехвалентной вакциной, содержащей антиген НБ. Кратность вакцинации была следующей: группа №2 была вакцинирована повторно через 28 дней после первой иммунизации, группа №3 также была иммунизирована через 28 дней повторно живой вакциной и далее через 21 дней – инактивированной. Группа №4 служила в качестве отрицательного контроля и состояла из не вакцинированных цыплят.

Живую вакцину против ньюкаслской болезни применяли интраназально в дозе $6,7 \lg \text{ЭИД}_{50}$, что соответствует одной иммунизирующей дозе для вакцины против НБ из штамма «Ла-Сота» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», а инактивированный препарат применяли методом внутримышечного введения также в одной иммунизирующей дозе в объёме $0,5 \text{ см}^3$.

Иммуногенность вакцин оценивали по результатам контрольного заражения цыплят, а также по результатам серологических исследований.

Контрольное заражение цыплят проводили в соответствии с «Руководством ВОЗЖ по диагностическим тестам и вакцинам» [524]. Цыплят из разных опытных групп подвергали контрольному заражению вирулентными вирусами НБ VII генотипа. Для этого были использованы три актуальных для РФ изолята вируса НБ VII генотипа: NDV/chicken/Rus/Crimea/54/17 [89], NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9/19 [236],

NDV/chicken/Rus/Kaliningrad/184/13 [63]. В дальнейшем этим вирусам присвоили следующие условные обозначения: «Калининград», «Крым» и «Краснодар», соответственно. Заражающие дозы вирулентных вирусов НБ составили следующие значения: 5,9 lg ЭИД₅₀ для вируса «Калининград», 6,6 lg ЭИД₅₀ для вируса «Крым», и 6,9 lg ЭИД₅₀ для вируса «Краснодар». Цыплят заражали внутримышечно в объёме 0,5 см³. Срок наблюдения за цыплятами после заражения составил 8 дней. При этом каждый раз формировали методом случайной выборки по шесть опытных групп цыплят (по 10 голов), которых подвергали заражению:

группа №1 – иммунные цыплята, заражённые вирусом NDV/chicken/Rus/Crimea/54/17 («Крым»);

группа №2 – иммунные цыплята, заражённые вирусом NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9/19 (Краснодар»);

группа №3 – иммунные цыплята, заражённые вирусом NDV/chicken/Rus/Kaliningrad/184/13 («Калининград»);

группа №4 – не иммунные цыплята, заражённые вирусом NDV/chicken/Rus/Crimea/54/17 («Крым»);

группа №5 – не иммунные цыплята, заражённые вирусом NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9/19 (Краснодар»);

группа №6 – не иммунные цыплята, заражённые вирусом NDV/chicken/Rus/Kaliningrad/184/13 («Калининград»).

Контрольное заражение вирулентными изолятами вируса ньюкаслской болезни проводили каждый раз через 21 день после иммунизации живыми вакцинами и через 28 дней после вакцинации инактивированной.

На рисунке 8 представлены нуклеотидные последовательности изолятов и штаммов вируса ньюкаслской болезни, охарактеризованных сотрудниками ФГБУ «ВНИИЗЖ» и опубликованные в базе данных GenBank электронного ресурса NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) и платформе EpiFlu (<https://www.gisaid.org/>).

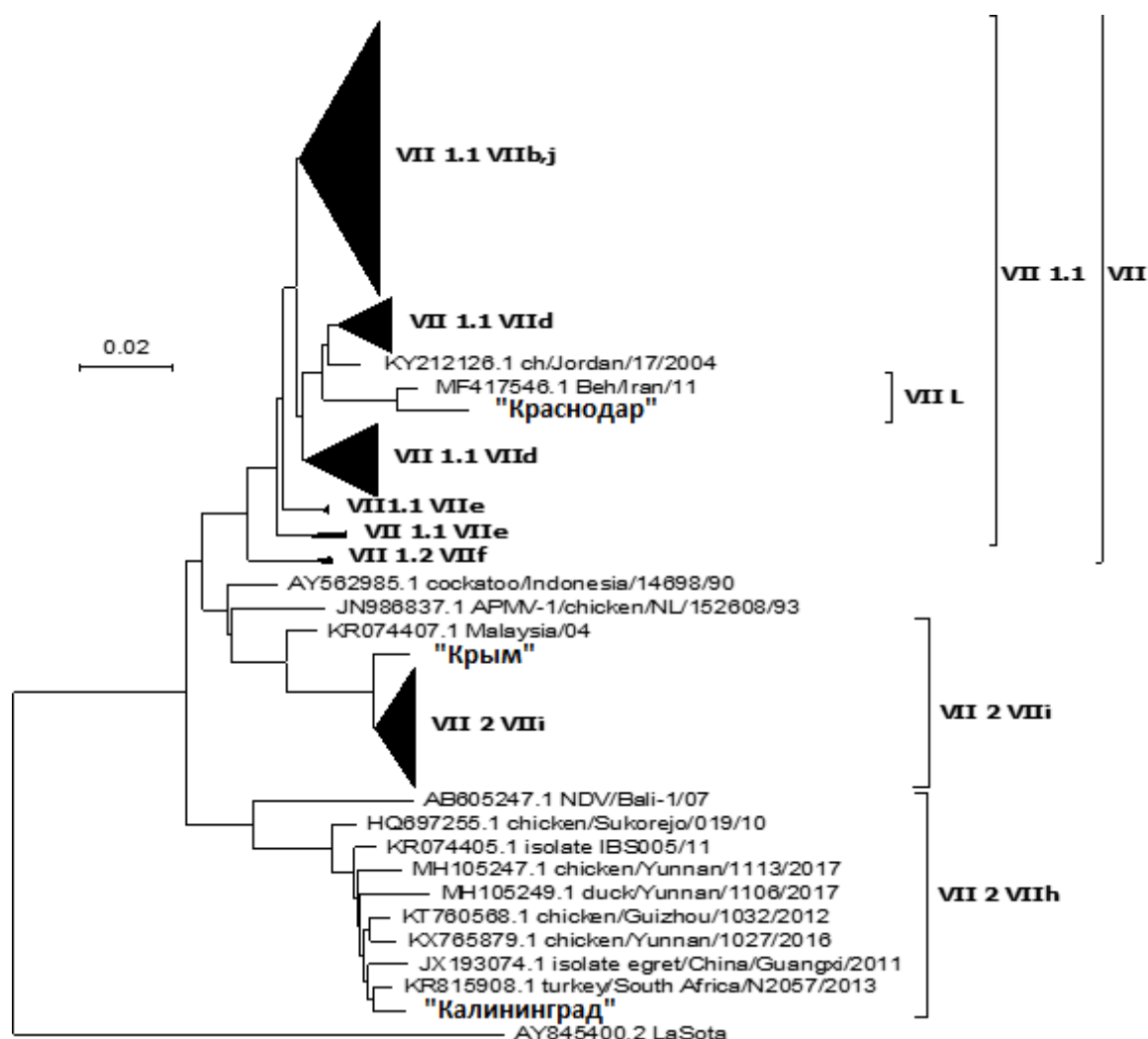


Рисунок 8 - Филогенетическое положение изолятов генотипа VII, вызвавших в России вспышки НБ в последние годы. Дендрограмма получена для полных последовательностей ORF гена F трех российских и 304 ранее опубликованных штаммов и изолятов с помощью программы NJ пакета MEGA 6.0. Российские изоляты выделены жирным шрифтом и курсивом. Справа приведены названия филогенетических групп по Diel D.G. et al. [180] (римские цифры и латинские буквы) и по Dimitrov K. et al. [182] (римские и арабские цифры). Филогенетические группы, не содержащие изучаемых изолятов, для удобства показаны в свернутом виде

Для серологических исследований от цыплят разных опытных групп отбирали сыворотки для исследования в РТГА: до вакцинации и каждый раз перед контрольным заражением, а также через 7-8 дней после контрольного заражения, от выживших цыплят.

Иммуногенность вакцин и эффективность схем вакцинации против НБ оценивали по устойчивости к контрольному заражению вирулентными вирусами НБ генотипа VII, а также по результатам серологических

исследований. После контрольного заражения в каждой группе регистрировали клиническое проявление болезни Ньюкасла, гибель заболевших особей и определяли показатель иммунной защиты - протективный индекс (Pr).

В таблице 2 представлены обобщённые результаты устойчивости вакцинированных цыплят к контрольному заражению вирулентными вирусами НБ VII генотипа.

Таблица 2 – Протективный эффект различных схем вакцинации против ньюкаслской болезни при заражении цыплят вирусами НБ генотипа VII

Схема вакцинации	Протективный индекс (Pr)* при заражении вирулентным штаммом вируса НБ		
	«Крым»	«Краснодар»	«Калининград»
Однократно, живая вакцина «Ла-Сота»	8/10** (Pr= 0,80)	4/10 (Pr= 0,40)	10/10 (Pr= 1)
Двукратно, живая вакцина «Ла-Сота»	10/10 (Pr= 1)	10/10 (Pr= 1)	10/10 (Pr= 1)
Двукратно, живая «Ла-Сота» и инактивированная вакцины	10/10 (Pr= 1)	10/10 (Pr= 1)	10/10 (Pr= 1)
Не вакцинированы (контроль)	0/10 (н/о)	0/10	0/10

Примечание: * - $Pr = \sum e/n$, где $\sum e$ – число защищенных (клинически здоровых) вакцинированных птиц на конец опыта; n – общее число птиц в данной группе;

** - отношение число защищенных к общему количеству заражённых цыплят.

Из данных, представленных в таблице 2 следует:

- во всех контрольных группах при проведении трёх этапов заражения наблюдали гибель всех не вакцинированных цыплят (в интервале времени от трех до семи суток после заражения). Это доказывает, что все испытанные изоляты вируса НБ генотипа VII были высоковирулентными;

- эффективность защиты после однократной вакцинации в группах цыплят, заражённых высоковирулентными вирусами НБ, варьировала от 40 до 100% и, очевидно, зависела от конкретного вируса для заражения. Наибольший протективный индекс после однократной вакцинации был

отмечен в отношении штамма «Калининград» субгенотипа VII d ($Pr=1$), при этом наименьшую защиту наблюдали в отношении вируса «Краснодар» субгенотипа VII L ($Pr=0,4$).

- протективный эффект вакцинации против НБ при заражении вирулентными вирусами генотипа VII был абсолютно зависим от используемой схемы. Наименьшая эффективность была получена после однократного применения живой вакцины и максимальная - после двукратного применения живой вакцины и дополнительно инактивированной.

Изучали гуморальный иммунитет цыплят против НБ после применения различных схем вакцинации, а также у клинически здоровой вакцинированной птицы после контрольного заражения. В таблице 3 представлены результаты соответствующих серологических исследований.

Таблица 3 – Динамика титров антител у цыплят, иммунизированных против НБ с использованием различных схем вакцинации

Схема вакцинации цыплят	Титр антител в РТГА ($\log_2 \pm s$)		
	до вакцинации	21-28 суток после вакцинации	8 суток после контрольного заражения
А) Однократно живая вакцина «Ла-Сота»	3,2 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,3	10,8 $\pm$ 0,3
В) Двукратно живая вакцина «Ла-Сота»		4,8 $\pm$ 0,2	11,7 $\pm$ 0,1
С) Двукратно живая вакцина «Ла-Сота» и инактивированная вакцина		11,9 $\pm$ 0,1	11,9 $\pm$ 0,1

Приведенные в таблице 3 данные позволили сделать ряд заключений:

- титры антител к вирусу НБ как после однократной прививки живой вакциной (5,2 $\pm$ 0,3 $\log_2$), так и после двукратной иммунизации (4,8 $\pm$ 0,2 $\log_2$), были статистически равными ($p>0,05$);
- дополнительная иммунизация цыплят инактивированной вакциной против НБ приводила к значительному (статистически значимому) приросту

титров антител ($p < 0,001$). Соответственно схемам вакцинации оценки прироста составили:

$$\log_2 T_{1C} - \log_2 T_{1A} = 6,7 \pm 0,32 \text{ (кратность увеличения } 83,3 \div 129,8);$$

$$\log_2 T_{1C} - \log_2 T_{1B} = 7,1 \pm 0,22 \text{ (кратность увеличения } 117,8 \div 159,8);$$

- для схем вакцинации с использованием только живых вакцин имел место статистически значимый ($p < 0,001$) прирост титров антител после контрольного заражения. Оценки прироста составили:

$$\log_2 T_{2A} - \log_2 T_{1A} = 5,6 \pm 0,42 \text{ (кратность увеличения } 36,3 \div 64,9);$$

$$\log_2 T_{2B} - \log_2 T_{1B} = 6,9 \pm 0,22 \text{ (кратность увеличения } 102,5 \div 139,1).$$

При использовании бустерной вакцинации изменений титра антител после контрольного заражения не произошло.

На рисунке 9 в графическом виде представлены результаты определения зависимости между коэффициентом прироста антител после контрольного заражения вирулентным вирусом НБ генотипа VII L (штамм «Краснодар») и показателем протективного индекса (Pr).

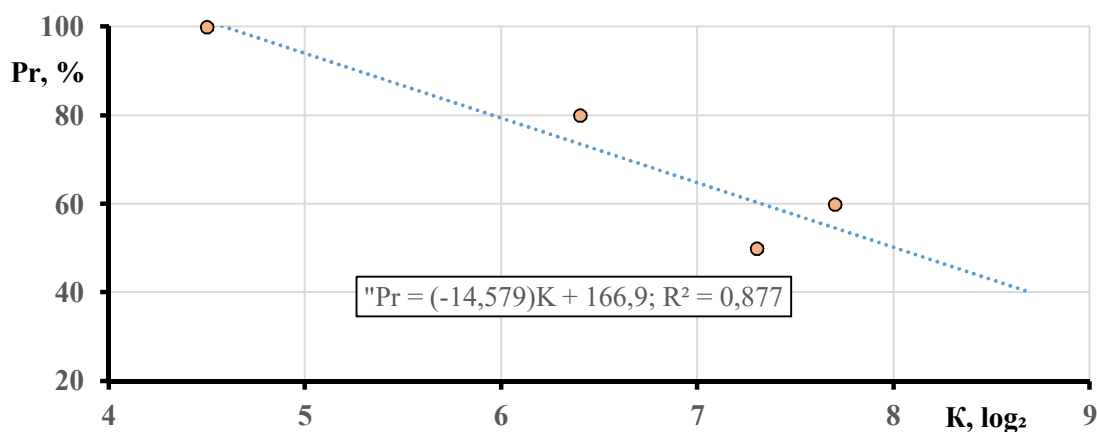


Рисунок 9 - Зависимость между коэффициентом прироста антител (K , $\log_2$) и показателем протективности (Pr, %), установленная при испытаниях штамма «Краснодар» в качестве пробойника живых вакцин против НБ. Вертикальная ось: Pr, % - протективный коэффициент (в процентах). Горизонтальная ось: K , $\log_2$ - коэффициент прироста антител ($K = T_1 - T_0$), где $\log_2 T_0$ и $\log_2 T_1$ - средние логарифмические титры антител к вирусу НБ до и после заражения. Приведено регрессионное уравнение вида $Pr = (-14,579)K + 166,9$, где Pr - ожидаемый показатель протекции для заданного K . Показан коэффициент адекватности регрессионной модели $R^2 = 0,877$.

Рисунок 9 иллюстрирует, что между показателями К и Pr присутствует выраженная отрицательная связь. Соответствующий коэффициент корреляции составил величину $R = -0,942$. Построенная регрессионная модель вида $Pr = (-14,579)K + 166,9$ с адекватностью 87,7 % позволяла прогнозировать величину "Pr" для заданного К. В биологическом смысле это означало, что низкая величина коэффициента прироста антител после контрольного заражения соответствует высокому протективному эффекту препарата в отношении вируса для контрольного заражения.

Изучали связь между протективным эффектом вакцины и заражающей дозой вируса. Считали, что наиболее устойчивым показателем будет величина ID_{50} , которая при данных условиях эксперимента инфицирует 50% вакцинированных птиц. Для проведения соответствующего статистического анализа эмпирические протективные индексы преобразовывали в линейные эквиваленты: $Y = \lg(Pr/(1-Pr))$. Далее исследовали зависимость Y от $\lg ID$. Полученные результаты в графическом виде представлены на рисунке 10.

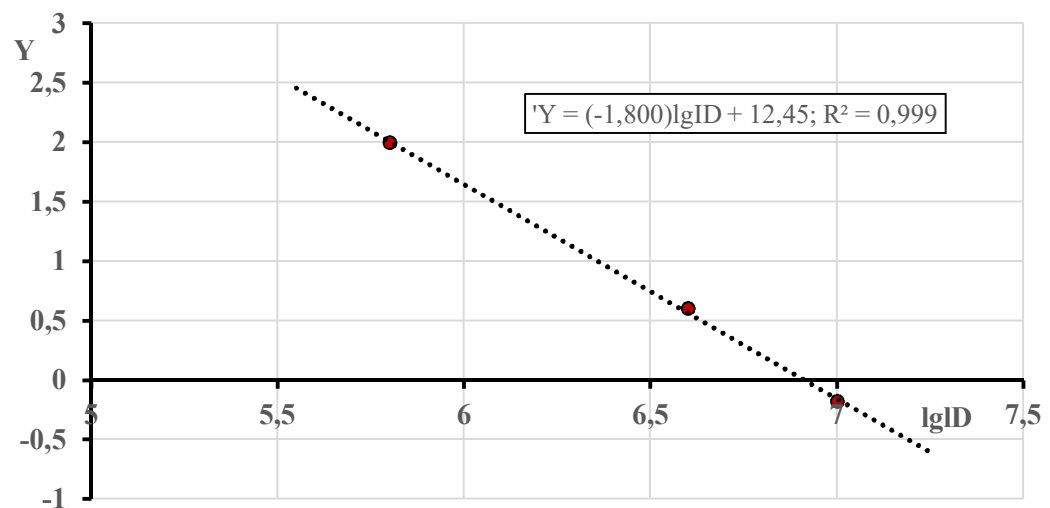


Рисунок 10 – Зависимость эквивалентов протективных индексов (Y) от дозы заражения (lgID, ЭИД₅₀) вакцинированных цыплят.

Вертикальная ось: $Y = \lg(Pr/(1-Pr))$, где: $Pr = \Sigma e/n$; Σe – число защищенных особей после заражения; n – количество вакцинированных птиц в подопытной группе (ось пересечена в точке $Y=0$, т. е. $Pr = 0,5$). Горизонтальная ось: $\lg ID$ – величина заражающей дозы, ЭИД₅₀. Приведены: первичные оценки (○); уравнение регрессии: $Y = (-1,800)lgID + 12,45$, где 'Y – прогнозируемое значение для заданного $\lg ID$; R^2 – коэффициент адекватности модели.

Рисунок 10 наглядно демонстрирует, что протективный эффект вакцины против болезни Ньюкасла был зависим от заражающей дозы вируса-пробойника (показатель связи параметров составил значение $R^2 > 99\%$). Прогнозируемая для вируса НБ штамма «Калининград» доза заражения 50% вакцинированных птиц составила величину $\lg ID_{50} = 12,45/1,8 = 6,92$ ($\lg ЭИД_{50}$). При этом доза, способная заразить не более 1% иммунного поголовья ($Pr = 0,99$ или $Y = 1,996$), имела величину $(12,45 - 1,996)/1,8 = 5,81$ $\lg ЭИД_{50}$. Указанная величина в 12,9 раз была меньше, чем ID_{50} . Эти данные позволяют считать, что степень «инфекционного давления» может существенно влиять на защищающую функцию поствакцинального иммунитета.

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что однократная интраназальная прививка цыплят живой вакциной из штамма «Ла-Сота» ФГБУ «ВНИИЗЖ» вызывает образование высоких титров гуморальных антител, которые были сравнимы с титрами антител после двукратной вакцинации живой вакциной. Однако, протективный эффект однократной вакцинации в среднем составил 73%, а после двукратной вакцинации живой вакциной и дополнительно инаktivированным препаратом, эффективность была наибольшей и достигла 100% по отношению ко всем испытанным вирулентным вирусам НБ генотипа VII.

Вероятно, что двукратная иммунизация живой вакциной и плюс инаktivированной вакциной вызывает формирование более напряжённого и специфического иммунитета, представленного главным образом, «поздним» иммуноглобулином G, который более эффективен в отношении вирулентных вирусов НБ. Тем не менее, иммунизация птицы только живыми вакцинами полностью не предотвращала репродукцию вирулентного вируса, о чём свидетельствует повышение титров гуморальных антител в 50-100 раз через восемь дней после контрольного заражения.

Только так называемая «бустерная» схема вакцинации, с использованием живых и инаktivированных вакцин, вызывала образование

высоких титров гуморальных антител, предотвращала репродукцию вирулентного вируса и вызывала 100%-ю протективную защиту от заражения.

Таким образом, было установлено, что вакцины против НБ эффективны для профилактики ньюкаслской болезни, вызываемой вирулентным вирусом НБ VII генотипа при использовании в определённой схеме вакцинации. Так, схема вакцинации, предусматривающая двукратное использование живых вакцин, предотвращала гибель птиц и клиническое проявление болезни, однако не предотвращала репликацию вируса. В то время, как схема вакцинации с использованием живых и инактивированной вакцины предотвращала гибель, клинические признаки болезни и репликацию вирулентного вируса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вирулентность циркулирующего в настоящее время возбудителя НБ заметно возросла по сравнению с вирусами, выделенными в предыдущие годы, и новый генотип VII L способен преодолевать поствакцинальный иммунитет, создаваемый живыми вакцинами. Поэтому в дальнейшем интересно было проверить вакцины против болезни Ньюкасла других производителей в остром опыте с контрольным заражением вирулентным изолятом НБ генотипа VII L.

3.2.1.2 Сравнительная оценка протективной активности вакцин против ньюкаслской болезни разных производителей в отношении актуального вируса НБ субгенотипа VII L

С учетом изменения эпизоотической обстановки по болезни Ньюкасла и появлении на территории РФ с 2019 г. вируса НБ генотипа VII L, обладающего способностью преодолевать поствакцинальный иммунитет, посчитали необходимым проверить эффективность иммунобиологических препаратов против данного заболевания различных производителей: как вакцин «нового» поколения - векторных, так и традиционных живых, но с разным количеством вируса НБ в одной прививной дозе.

В первом опыте были использованы цыплята яичного направления продуктивности в возрасте 0-15 суток в количестве 59 голов. Было сформировано шесть опытных группы цыплят методом случайной выборки. Цыплята группы № 1 привиты однократно вакциной «Вектормун ND» в день вывода однократно внутримышечно. Цыплята группы № 2 привиты вакциной «Хиправиар S» однократно методом выпаивания с водой в возрасте 15 дней. Цыплята группы № 3 привиты вакциной «Севак Витапест L» однократно окулярным методом в возрасте 15 дней. Цыплята группы № 4 привиты вакциной «Ла-Сота» однократно методом выпаивания с водой в возрасте 15 дней, а цыплята группы №5 привиты повторно этой же вакциной таким же методом в возрасте 25 дней. Цыплят группы № 6 не прививали, они служили в качестве контроля. В каждой опытной группе было по 10 голов. Вакцины применяли в соответствии с инструкциями производителей вакцин с учётом дозировки представленной на этикетках.

Иммуногенность вакцин оценивали по результатам контрольного заражения цыплят вирусом НБ VII генотипа NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9/19 «Краснодар» субгенотипа VII.1.1 (VII L), а также по результатам серологических исследований.

Цыплят шести опытных групп в возрасте 35 дней заражали внутримышечно в объеме 0,5 см³ вирулентным вирусом НБ генотипа VII L в дозе 6,6 lg ЭИД₅₀ и вели наблюдение за ними в течение 13 дней. Цыплят группы №1 заражали через 36 дней после вакцинации, цыплят групп №№ 2, 3 и 4 - через 21 день после вакцинации, а цыплят группы №5 - через 11 дней после повторной вакцинации. Таким образом, во всех случаях был выдержан срок формирования иммунитета, рекомендованный производителями вакцин, представленный в инструкциях по их применению. Для серологических исследований отбирали сыворотки по следующей схеме: до вакцинации (возраст 0 и 15 дней), перед контрольным заражением (возраст 36 дней), а также через 13 дней после заражения от выживших цыплят.

В аспекте оценки эпизоотической опасности вируса НБ изолят «Краснодар» исследовали факторы патогенности возбудителя для иммунизированных птиц. Птиц заражали на фазе развитого поствакцинального иммунитета. Соответственно образованным группам определяли показатели смертности (Le) и клинического индекса (C), которые выражали в процентах, а также протективного индекса вакцин ($Pr=1-C$). Кроме этого определяли титры антител к вирусу НБ до (T_0) и после заражения (T_1), на основании которых вычисляли коэффициент прироста антител ($K = T_1/T_0$) как показатель репродукции вируса в иммунном организме. Полученные результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Протективное действие коммерческих вакцин против ньюкаслской болезни после заражения цыплят вирусом НБ изолят «Краснодар» генотипа VII L

Установленные показатели: смертность (Le); клинический индекс (C); протективный индекс (Pr); средние логарифмические титры антител к вирусу НБ до ($\log_2 T_0$) и после заражения ($\log_2 T_1$); коэффициент прироста антител ($K = \text{antilog}_2 (T_1 - T_0)$)						
Показатель	Вакцины (прививные дозы, lg ЭИД ₅₀)					Контроль
	Вектормун (-)	Хиправиар ($\geq 6,5$)	Севак Витапест * ($\geq 5,5$)	Ла-Сота однократно ($\geq 7,7$)	Ла-Сота двукратно ($\geq 7,7$)	
Le	2/4** (50 $\pm$ 28,8) [#]	4/5 (80,0 $\pm$ 20)	4/4 (100)	0/10 (0)	0/10 (0)	10/10 (100)
C	4/9 (44,4 $\pm$ 17,6)	5/10 (50,0 $\pm$ 16,7)	4/10 (40,0 $\pm$ 16,3)	2/10 (20,0 $\pm$ 13,3)	0/10 (0)	
Pr	5/9 (Pr=0,556)	5/10 (Pr=0,50)	6/10 (Pr=0,60)	8/10 (Pr=0,80)	10/10 (Pr=1)	н/о
log₂T₀	2,3 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,5	-
log₂T₁	7,3 $\pm$ 0,5	11,7 $\pm$ 0,2	10,5 $\pm$ 1,0	11,2 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 0,4	-
log₂K	5,0 $\pm$ 0,5	7,3 $\pm$ 0,6	7,7 $\pm$ 1,1	6,4 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,6	-
K	22 $\div$ 47 ^{##}	102 $\div$ 244	97 $\div$ 446	56 $\div$ 128	15 $\div$ 34	-

Примечания:

- * - вакцина применялась окулярно согласно инструкции;
- ** - в числителе число птиц, демонстрирующих данный клинический признак, в знаменателе - общее количество птиц в группе;
- # - указан процент проявления признака и стандартное отклонение;
- ## - оценка коэффициента в границах стандартного логарифмического отклонения.

Из анализа данных таблицы 4 можно заключить, что изолят «Краснодар» вируса НБ вызывал 100% заболеваемость и 100% смертность для не вакцинированных цыплят, смерть наступала в интервале от пяти до семи суток после заражения. Возбудитель способен был преодолеть поствакцинальный иммунитет в четырех из пяти случаев по показателю заболеваемости. Исключение составила двукратная прививка вакциной из штамма «Ла-Сота». При этом указанная вакцина демонстрировала 100% протекцию по показателю смертности. В отношении тестируемого штамма из изученных препаратов наименьшую протекцию оказала вакцина «Хиправиар» при пероральном применении с количеством вируса 6,5 lg ЭИД₅₀ в одной прививной дозе (заболело пять птиц из десяти). Вакцина «Севак Витапест L» с меньшим количеством вируса в одной прививной дозе – 5,5 lg ЭИД₅₀, но примененная окулярно согласно инструкции, имела несколько больший протективный эффект: погибло четыре цыпленка из десяти. В группе цыплят привитых в первый день жизни векторной вакциной при контрольном заражении в 36 дней вирусом НБ генотипа VII L из девяти цыплят заболело пять, из которых два погибло в ходе опыта (одна голова не дожила до контрольного заражения). В группе птиц иммунизированных однократно вакциной из штамма «Ла-Сота» смертность была нулевой, однако два цыпленка из 10 заболели. Наибольшей иммунной активностью обладала птица, привитая двукратно вакциной «Ла-Сота» - после контрольного заражения все птицы были здоровы.

Исследовали связь между величиной коэффициента прироста антител ($\log_2 K$) к вирусу ньюкаслской болезни у птиц, иммунизированных живыми вакцинами против НБ, и значением показателя протективности (Pr) при контрольном заражении штаммом «Краснодар» генотипа VII L в качестве пробы-контроля. Полученные результаты в виде диаграммы представлены на рисунке 11.

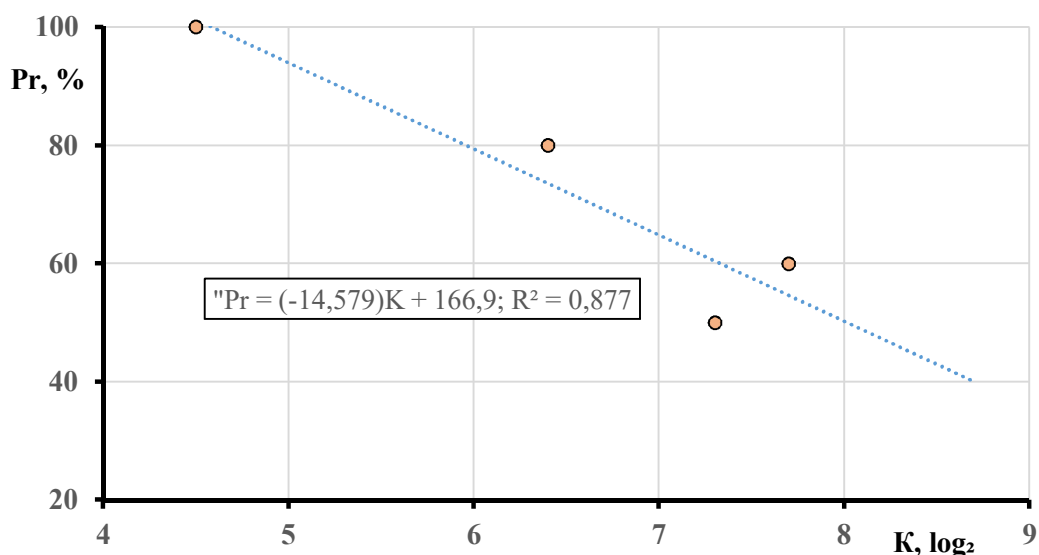


Рисунок 11 - Зависимость между коэффициентом прироста антител (K , $\log_2$) и показателем протективности (Pr , %), установленная при испытании штамма «Краснодар» в качестве «пробойника» живых вакцин против НБ. Оси координат: K , $\log_2$ - коэффициент прироста антител ($K = T_1 - T_0$), где $\log_2 T_0$ и $\log_2 T_1$ - средние логарифмические титры антител к вирусу НБ до и после заражения; Pr , % - показатель протективного действия вакцины (процент защищенных животных). Приведено регрессионное уравнение вида ${}^{\circ}Pr = (-14,579)K + 166,9$, где ${}^{\circ}Pr$ - ожидаемый показатель протекции для заданного K . Показана линия регрессии.

Рисунок 11 иллюстрирует, что между показателями K и Pr присутствует выраженная связь. Соответствующий коэффициент корреляции составил величину $R = -0,942$. Построенная регрессионная модель вида ${}^{\circ}Pr = (-14,579)K + 166,9$ с адекватностью 87,7 % позволяла прогнозировать величину ${}^{\circ}Pr$ для заданного K . В биологическом смысле это означало, что снижение величины коэффициента прироста антител способствовало увеличению протективного эффекта препарата в отношении вируса-пробойника.

Во втором опыте сравнивали иммуногенность живых вакцин примененных методом выпойки с разным количеством вируса НБ в одной прививной дозе: 5,5 lg ЭИД₅₀ живая вакцина «Севак NEW L» производства Франции, 6,5 lg ЭИД₅₀ «Хиправиар S» Испания, 7,7 lg ЭИД₅₀ «Ла-Сота», а также использовали еще векторную вакцину против НБ «Векормун ND».

Соответственно тестируемым препаратам были образованы группы птиц №№1-4 численностью по 20 голов, в том же числе параллельно содержали группу контроля (К). Вакцины применяли в соответствии с инструкциями производителей с учётом указанной дозировки. Цыплята в группе №1 были привиты в день вывода (0 суток) однократно, внутримышечно векторной вакциной. Птиц в группах №2-4 вакцинировали однократно в возрасте 15 суток методом выпойки. Птиц в группе К не прививали.

Вакцинированных и контрольных цыплят в возрасте 36 суток, т.е. через 21 суток после вакцинации в группах №№2-4, инфицировали вирусом НБ штамм «Краснодар» генотипа VII L в дозе $6,6 \lg \text{ЭИД}_{50}$ внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$. Наблюдения за клиническим состоянием зараженной птицы продолжали в течение 13 суток.

При проведении серологических исследований через заданные интервалы определяли титры (Т и $\log_2 T$). В границах интервалов по выборкам первичных значений $\log_2 T$ вычисляли средние оценки и соответствующие стандартные отклонения ($\log_2 T \pm s$).

Для проведения операции по сравнению средних тенденций в группах использовали ранговый метод Данна [Холлендер М., 1983]. Согласно данному методу все первичные значения Т, установленные во всех группах, объединяли в общий ряд, упорядоченный по величинам (от $T_{\min}$ к $T_{\max}$), и определяли их порядковые номера (ранги, h). Для одинаковых значений Т вычисляли средние ранги. Далее, в каждой группе, величины Т заменяли на соответствующие ранги и вычисляли среднегрупповые показатели ($H = \sum h/n$).

Результаты серологических исследований сывороток крови птиц, вакцинированными живыми иммунопрепаратами против НБ различных производителей, до контрольного заражения приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни в РТГА в сыворотках крови кур, иммунизированных различными коммерческими вакцинами против НБ, до контрольного заражения птиц

Значения титров антител к вирусу НБ (строкой ниже даны логарифмы титров, $\log_2$) в сыворотках крови птиц соответственно группам и возрасту (Сут)													
Вакцина (n)	Сут	≤ 4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048		
		≤ 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	$\log_2 T \pm s^{**}$	
К (20)	0						8*	10	1	1		7,75±0,13	
К (20)	14	5	6	4	3	2						3,55±0,30	
К (20)	24	16	2	2								2,3±0,15	
К (20)	36	20										2***	
													Н ₃₆ [#]
Вектормун (20)	36	14	3	3								2,45±0,17	18,30
Севак NEW L (20)	36	4	6	6	4							3,50±0,24	36,50
Хиправиар (≥ 6,5) (20)	36	2	4	6	6	2						4,10±0,26	46,25
Ла-Сота (20)	36		2	4	6	4	2	2				5,30±0,33	60,95

Примечания:

* - указано количество образцов сыворотки, для которых установлена данная величина титра;

** - приведены средние логарифмические оценки титра по данной возрастной категории и стандартные отклонения средних вида $s = \sqrt{(Q/((n-1)n))}$, где $Q = (\sum x^2) - (\sum x)^2/n$;

*** - при вычислении средних оценок, для образцов, где величина титра составила $\leq 2 \log_2$, принимали титр равный $2 \log_2$;

- показаны средние ранги значений титров, установленные для данной группы после объединения однократных измерений титров всех групп данной возрастной категории в общий упорядоченный ряд.

Из данных, приведенных в таблице 5, следует:

- использованные в эксперименте цыплята обладали достаточно напряженным пассивным иммунитетом. В возрасте первых суток средний титр трансовариальных антител у птиц составлял $(7,75 \pm 0,13) \log_2$, в границах ошибки измерения оценка титра находилась в диапазоне $197 \div 236$. Вакцинация в группе №1 была проведена при данной величине титра. Далее наблюдали снижение концентрации пассивных антител. В контрольной группе, в периоде до 36 суток, зависимость величины $\log_2 T$ от возраста птиц достаточно адекватно отражало уравнение: $\log_2 T = 7,76 + (-3,78) \times \lg \text{Сут}$, где T - ожидаемый титр для заданного возраста птицы (Сут). Вакцинации птиц в группах №№2-4, проведенные в возрасте 15 суток, соответствовали титру $(3,55 \pm 0,30) \log_2$, который находился в диапазоне $9,51 \div 14,42$. Прогнозируемое по уравнению значение титра составило $3,32 \log_2$, или ≈ 10 ;

- после прививки, в группе №1 (через 36 суток) и в группах №№2-4 (через 21 сутки) средние значения титров ($\log_2$) соответственно составили: $2,45 \pm 0,17$; $3,50 \pm 0,24$; $4,10 \pm 0,26$; $5,30 \pm 0,33$. Все приведенные величины были статистически значимы ($p < 0,05$).

Используя средние ранги (H) провели сравнительный анализ средних тенденций в групповых выборках значений поствакцинальных титров антител. С этой целью для каждой пары ранговых показателей (например H_1 и H_2) определяли существенность их различий. Процедура сравнения сводилась к следующему. Для k – числа сопоставляемых групп, имеющих соответствующие объемы элементов (n) и общий объем $N = \sum n$, проверяли выполнимость неравенства вида $z \geq z_{p''}$, где: $z = |H_1 - H_2| / \sqrt{N}$; $\sqrt{N} = \sqrt{((N \times (N + 1)) / 12) \times (1/n_1 + 1/n_2)}$; $z_{p''}$ – табличный коэффициент для $p'' = p / (k \times (k - 1))$ [85]. В итоге, если неравенство выполнялось, то с вероятностью ошибки p принимали, что $H_1 \neq H_2$. Результаты сравнительного анализа антигенной активности тестируемых препаратов приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Результаты сравнительного анализа антигенной активности вакцин против НБ по ранговым показателям титров антител для птиц в возрасте 36 суток

Оценки z , установленные при сопоставлении средних рангов (H) для проверки выполнимости неравенства $z \geq z_{p''}^*$			
Вакцины (H)	Севак NEW L (36,50)	Хиправиар (46,25)	Ла-Сота (60,95)
Векормун (18,30)	2,48	3,80**	5,80
Севак NEW L (36,50)	-	1,33	3,33
Хиправиар (46,25)	-	-	2,00

Примечания:

- * - обозначения и описание метода приведены в тексте;
- ** - жирным шрифтом выделены значения z , для которых на уровне $p \leq 0,05$ неравенство $z \geq z_{p''}$ выполняется (для $p = 0,05$ и $k=4$ $z_{p''} = 2,63$)

Данные из таблицы 6 свидетельствовали, что антигенная активность испытанных вакцин в виде ранговых оценок средних тенденций выборок была неодинакова. Препарат «Векормун ND» имел достоверно наименьший показатель (18,30) относительно живых вакцин «Хиправиар S» (46,25) и «Ла-Сота» (60,95), но статистически неотличим от «Севак NEW L» (36,50). Вакцины «Севак NEW L» и «Хиправиар S» занимали среднее положение по группе. Вакцина из штамма «Ла-Сота» демонстрировала существенно больший показатель относительно «Векормун ND» и «Севак NEW L», который, однако, статистически не отличался от ранговой оценки препарата «Хиправиар S».

При проведении контрольного заражения подопытных птиц в возрасте 36 суток определяли показатели заболеваемости (In , %), летальности среди заболевших (L , %) и протективного эффекта ($Pr=100 - In$). Аналогичные показатели вычисляли и в контрольной группе. Полученные результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Протективное действие различных вакцин против ньюкаслской болезни при заражении птиц вирусом НБ изолят «Краснодар» субгенотипа VII L

Показатели заболеваемости (In, %), летальности из числа заболевших (Le, %) и протективного индекса ($Pr=1-C$), установленные соответственно испытанным вакцинам					
Показатель	Вакцины (прививные дозы, lg ЭИД ₅₀)				Контроль
	Вектормун (-)	«Севак NEW L» ($\geq 5,5$)*	Хиправиар ($\geq 6,5$)	Ла-Сота ($\geq 7,7$)	
In	7/20 ** (35)***	10/20 (50)	8/20 (40)	2/20 (10)	20/20 (100)
Le	4/7 (57)	8/10 (80)	8/8 (100)	0/2 (0)	20/20 (100)
Pr	13/20 (Pr=0,65)	10/20 (Pr=0,50)	12/20 (Pr=0,60)	18/20 (Pr=0,90)	0/20 (н/о)

Примечания: *- указана величина прививной дозы вакцины, lg ЭИД₅₀;

** - в числителе число птиц, демонстрирующих данный клинический признак, в знаменателе - общее количество птиц в группе;

*** - приведен процент выявления данного показателя в группе.

На основании данных таблицы 7 сделали следующие заключения:

- использованный для искусственного заражения вакцинированных и контрольных птиц вирус болезни Ньюкасла штамм «Краснодар» показал высокую вирулентность, обусловив в контрольной группе абсолютную (100%) заболеваемость и летальность;

- показатели, характеризующие иммуногенность исследуемых вакцин были не одинаковы. Наименьшую заболеваемость и наименьшую летальность наблюдали у препарата «Ла-Сота» (Pr = 90%; L= 0%). Векторный препарат (Pr = 65%; L= 57%) был менее иммуногенен. Вакцины «Хиправиар S» (Pr = 60%; L= 100%) и «Севак NEW L» (Pr = 50%; L= 80%) обладали самой низкой иммуногенностью.

Для объективного подтверждения наблюдаемой картины провели сравнительный анализ вакцин по показателям In и L. Использовали метод χ^2 в

варианте процедуры множественных сравнений долей эффекта Marascuilo [Marascuilo L. A., 1966]. Задача анализа состояла в том, чтобы для k -числа долевых показателей (C), в неповторяющихся комбинациях, между каждой парой (например C_1 и C_2) установить присутствие статистических различий для заданного критериального значения (X_p) путем проверки выполнимости неравенства вида $|C_1 - C_2| \geq (\sqrt{X_p}) \times (\sqrt{S})$, где: X_p - табличное значение для заданного p и числа степеней свободы $f = k - 1$; $S = (C_1(1 - C_1))/n_1 + (C_2(1 - C_2))/n_2$. Расчеты проводили для $\sqrt{(X_{p=0,05} = 7,815)} \approx 2,8$ и $f = 3$. Результаты сравнительного анализа показателей иммуногенности (I_n и L) тестируемых препаратов приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Сравнительный анализ иммуногенности вакцин против болезни Ньюкасла по показателям заболеваемости (I_n) и летальности (L) после контрольного заражения привитых птиц вирусом НБ изолят «Краснодар» субгенотипа VII L

Отношение абсолютной разности значений показателей $ C_i - C_j $ и произведений вида $(\sqrt{X_p}) \times (\sqrt{S_{ij}})$, установленные при сравнении препаратов*				
Показатель	Вакцина (C)**	Севак NEW L (10/20)	Хиправиар (8/20)	Ла-Сота (2/20)
I_n	Вектомун (7/20)	0,15 < 0,43	0,05 < 0,43	0,25 < 0,35
	Севак NEW L (10/20)	-	0,10 < 0,44	0,40 > 0,36***
	Хиправиар (8/20)	-	-	0,30 < 0,36
L_e	Группы (C)	V2 (8/10)	V3 (8/8)	V4 (0/2)
	Вектомун (4/7)	0,21 < 0,63	0,43 > 0,20	0,43 > 0,20
	Севак NEW L (8/10)		0,20 < 0,35	0,80 > 0,35
	Хиправиар (8/8)			1,00 > 0,00

Примечания:

- * - обозначения и описание метода приведены в тексте;
- ** - в скобках приведены оценки показателей;
- *** - жирным шрифтом выделены позиции, где при $\sqrt{X_{p=0,05}} \approx 2,8$ неравенство $|C_i - C_j| \geq (\sqrt{X_p}) \times (\sqrt{S_{ij}})$ выполняется.

При анализе данных, представленных в таблице 8, можно сделать следующие заключения:

- при указанных условиях оценивания критериальное неравенство выполнялось не для всех позиций сравнения - влияла высокая статистическая неопределенность системы в целом (величина правой части неравенства). Живая вакцина из штамма «Ла-Сота», имеющая наименьший показатель заболеваемости ($I_n=2/20$), при сравнении с вакциной «Севак NEW L» ($10/20$) имела достоверные расхождения, а при сравнении с препаратами «Вектомун ND» ($7/20$) и «Хиправиар S» ($8/20$), демонстрировала явную тенденцию к достижению достоверности. При взаимном сравнении остальных I_n -показателей полученные неравенства были в большей степени удалены от критериального условия;

- I_e -показатель вакцины «Ла-Сота» ($I=0$) был достоверно ниже аналогичных оценок, установленных у всех испытанных препаратов. Отмеченный показатель у вакцины «Вектомун ND» ($4/7$) также имел достоверно меньшую величину при сравнении с препаратом V3 ($8/8$). В остальных позициях существенных различий между I -показателями не установлено.

При изучение возможности развития вирулентного вируса-пробойника в организме вакцинированных птиц через 13 суток после контрольного заражения, у птиц, которые не показали клинического проявления НБ исследовали изменение напряженности гуморального иммунитета. Считали, что возрастание иммунной реакции является следствием развития инфекционного процесса в организме птицы. В сыворотках крови опытных цыплят в РТГА определяли титры антител к вирусу НБ. Полученные результаты исследований приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни в РТГА в сыворотках крови кур через 13 суток после контрольного заражения птиц, привитых разными вакцинами против НБ

Значения титров антител к вирусу НБ (строкой ниже даны логарифмы титров, $\log_2$) в сыворотках крови птиц соответственно группам и возрасту (Сут)													
Группа (n)	Сут	≤ 4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	$\log_2 T \pm s^{**}$	$H_{49}^{\#}$
		≤ 2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Вектормун (13) ^{##}	49		3*	4	3	2	1					4,54±0,35	14,12
Севак NEW L (10)	49						1	2	4	2	1	9,00±0,49	42,05
Хиправиар (12)	49					1	2	3	3	3		8,42±0,38	41,62
Ла-Сота (18)	49		3	3	5	3	4					5,11±0,33	18,19

Примечания:

- * - указано количество образцов сыворотки, для которых установлена данная величина титра;
- ** - приведены средние логарифмические оценки титра по данной возрастной категории и стандартные отклонения средних вида $s = \sqrt{Q/((n-1)n)}$, где $Q = (\sum x^2) - (\sum x)^2/n$;
- *** - при вычислении средних оценок, для образцов, где величина титра составила $\leq 2 \log_2$, принимали титр равный $2 \log_2$;
- # - показаны средние ранги значений титров, установленные для данной группы после объединении однократных измерений титров всех групп данной возрастной категории в общий упорядоченный ряд [85];
- ## - исследованы образцы сывороток крови вакцинированных птиц, которые не имели клинических признаков НБ после искусственного заражения.

На основании данных таблицы 9 сделали заключение, что через 13 суток после контрольного заражения в группах №№1-4 средние значения титров антител к вирусу НБ ($\log_2$) соответственно составили: $4,45 \pm 0,35$; $9,00 \pm 0,49$; $8,42 \pm 0,38$; $5,11 \pm 0,33$. В такой же последовательности средние ранги титров (Н) имели вид: 14,12; 42,05; 41,62; 18,19.

По аналогии с процедурой, приведенной в таблице 5 провели сравнительный анализ среднегрупповых рангов установленных титров антител. Полученные результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Сравнительный анализ средних ранговых показателей титров антител к вирусу НБ, установленных в группах №№1-4, через 13 суток после контрольного заражения вакцинированных птиц

Оценки z , установленные при сопоставлении средних рангов (Н) для проверки выполнимости неравенства $z \geq z_{p''}^*$.			
Вакцины (Н)	Севак NEW L (42,05)₁₀^{**}	Хиправиар (41,62)₁₂	Ла-Сота (18,19)₁₈
Вектормун (14,12) ₁₃	4,30	4,45	0,72
Севак NEW L (42,05) ₁₀		0,07	3,92
Хиправиар (41,62) ₁₂			4,07

Примечания:

- * - обозначения и описание метода приведены в тексте;
- ** - нижним индексом показано число измерений;
- *** - жирным шрифтом выделены значения z , для которых на уровне $p \leq 0,05$ неравенство $z \geq z_{p''}$ выполняется (для $p = 0,05$ и $k=4$ $z_{p''} = 2,63$).

Данные из таблицы 10 были интерпретированы следующим образом: препараты «Вектормун» и «Ла-Сота» имели достоверно меньшие значения ранговых показателей титров в сравнении с вакцинами «Севак NEW L» и «Хиправиар S». При этом между ранговыми показателями вакцин «Вектормун» и «Ла-Сота», а также между «Севак NEW L» и «Хиправиар S» статистической разницы не установлено. Фактически имели место две группы вакцин - препараты

одной из групп («Вектормун» и «Ла-Сота») существенно больше сдерживали инфекционный процесс, чем вакцины в других группах.

Провели сравнительный анализ средних титров антител в подопытных группах птиц до (36 суток) и после контрольного заражения (49 суток). Определили соответствующие логарифмические коэффициенты прироста титров ($k = \log_2 T_{49} - \log_2 T_{36}$). Полученные результаты приведены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты сравнительного анализа средних титров антител к вирусу НБ до и после контрольного заражения вакцинированных птиц

Средние величины титров антител, установленные соответственно испытанным вакцинам у птиц в возрасте 36 ($\log_2 T_{36}$) и 49 суток ($\log_2 T_{49}$) и значения коэффициентов прироста титров ($k = \log_2 T_{49} - \log_2 T_{36}$)				
Вакцины	$\log_2 T_{36}^*$	$\log_2 T_{49}^{**}$	$k = \log_2 T_{49} - \log_2 T_{36}$	2^k
Вектормун	$2,45 \pm 0,17$	$4,54 \pm 0,35$	$2,09 \pm 0,39$	$4,26 (3,25 - 5,58)^{***}$
Севак NEW L	$3,50 \pm 0,24$	$9,00 \pm 0,49$	$5,50 \pm 0,55$	$45 (31,00 - 66,26)$
Хиправиар	$4,10 \pm 0,26$	$8,42 \pm 0,38$	$4,32 \pm 0,46$	$19,97 (14,52 - 27,47)$
Ла-Сота	$5,30 \pm 0,33$	$5,11 \pm 0,33$	$-0,19 \pm 0,47$	#

Примечания:

- * - данные из таблицы 5;
- ** - данные из таблицы 9;
- *** - в скобках указаны границы диапазона стандартного отклонения коэффициента;
- # - величина статистически не значима.

Данные таблицы 11 позволили считать, что препараты против ньюкаслской болезни, используемые в опыте для вакцинации птиц в группах №№1-3, показали достоверные ($p < 0,05$) коэффициенты прироста антител к вирусу НБ, установленные после контрольного заражения. При этом только вакцина из штамма «Ла-Сота» статистически значимого прироста антител не демонстрировала.

3.2.1.3 Протективная активность схем комбинированной вакцинации против болезни Ньюкасла препаратами разных производителей в отношении вируса НБ субгенотипа VII L на бройлерах

В следующем опыте изучали эффективность против НБ генотипа VII L схем вакцинаций при комбинации векторной вакцины с живыми препаратами и инактивированной вакцины с живыми иммунопрепаратами.

В опыте использовали 210 голов бройлеров суточного возраста. Цыплят произвольно разделили на семь групп по 30 голов в каждой. Цыплята-бройлеры содержались в изоляторах с момента выведения до окончания эксперимента, затем они были подвергнуты эвтаназии. Все цыплята-бройлеры были идентифицированы (промаркированы) в индивидуальном порядке.

В опыте использовали следующие вакцины:

- «Gallimune ND» (далее Галлимун). Вакцина против ньюкаслской болезни инактивированная. Производство: «Берингер Ингельхайм». Создана на основе штамма «Ulster 2C» с добавлением масляного адъюванта.

- «Авинью Хатчпак» (далее Авинью). Вакцина против НБ живая. Производство: «Берингер Ингельхайм». Создана на основе штамма «VG-GA». Предназначена для вакцинации цыплят бройлерного и яичного направления с суточного возраста, а также взрослых кур яичных и мясных кроссов птицы. Вакцину применяли в одной назальной дозе методами крупнокапельного спрея и интраокулярно.

- «Вакцина Векормун ND» (далее Векормун). Производство: «Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals Company», Венгрия. Вакцина против ньюкаслской болезни живая, векторная. Создана на основе штамма герпеса вируса индеек 3-го серотипа с экспрессией фрагмента генома вируса НБ, кодирующего белок F. Предназначена для вакцинации цыплят бройлерного и яичного направления с суточного возраста.

- «Вакцина Хиправиар В1» (далее В1 Хипра). Производство: «Hirpa (Испания). Вакцина против ньюкаслской болезни живая на основе штамма «B1».

Предназначена для вакцинации цыплят бройлерного и яичного направления с суточного возраста, а также взрослых кур яичных и мясных кроссов птицы. Вакцину применяли согласно наставлению – одна назальная доза методами крупнокапельного спрея и интраокулярно.

- «Вакцина Хиправиар-Клон». Вакцина против ньюкаслской болезни живая на основе клонированного штамма «Ла-Сота». Предназначена для вакцинации цыплят бройлерного и яичного направления с суточного возраста, а также взрослых кур яичных и мясных кроссов птицы. Вакцину применяли согласно наставлению – одна доза интраокулярным методом.

Схема опыта, программа вакцинации и последующего контрольного заражения представлена в таблице 12.

Таблица 12 – Схема опыта по изучению эффективности комбинаций вакцин против болезни Ньюкасла в отношении ВНБ субгенотипа VII L

№ п\п	Название группы	Кол-во (голов)	Программа вакцинации и контрольного заражения		
			Возраст вакцинации, сутки	Метод вакцинации	Возраст заражения, сутки
1	Отрицательный контроль	30	-	-	-
2	Контроль вируса	30	-	-	13
3	Контроль вируса	30	-	-	28
4	Галлимун+Авинью	30	1	Подкожно+интраокулярно	13
5	Галлимун+Авинью+Авинью	30	1+14 Авинью	Подкожно+спрей+интраокулярно	28
6	Вектормун+В1Хипра	30	1	Подкожно+интраокулярно	13
7	Вектормун + В1Хипра+Хиправиар-Клон	30	1+14 Хипра	Подкожно+спрей + интраокулярно	28
Итоговое поголовье		210			

Оценка протективной активности вакцин определялась путём контрольного заражения высоковирулентным штаммом вируса ньюкаслской болезни генетической группы VII L. Контрольное заражение цыплят-бройлеров в дни, указанные в таблице 12, проводили изолятом вируса НБ NDV/chicken/Rus/Khanty-Mansy/1240-1/21 генетической группы VII L внутримышечно в среднюю треть бедра в дозе $6,4 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,5\text{см}^3$.

На 3, 13, 21, 28 и 35 день жизни цыплят отбирали кровь для серологических исследований в РТГА. Пробы сывороток от всех групп по мере получения замораживали и исследовали по окончании протокола одним и тем же персоналом и с использованием тест-набора одной серии.

В течение всего опыта проводили ежедневный визуальный осмотр поголовья птицы. При осмотре обращали внимание на общее состояние птицы (активность, реакция на внешние раздражители, поедаемость корма, потребление воды). Наблюдение за клиническим состоянием цыплят после проведения контрольного заражения вели в течение 25 дней (для групп птиц, зараженных в 13 суток) и 10 суток (для групп птиц, зараженных в 28 дней), в случае гибели отбирали образцы патологического материала (пробы печени, почек и селезенки) и клоакальные мазки (контроль выделения вируса) для детекции генома вируса ньюкаслской болезни методом ПЦР в реальном времени. В случае сохранения клинического здоровья у птиц для детекции выделения ВНБ после проведения контрольного заражения отбирали клоакальные мазки на 3, 4, 6, 9, 14, 24 дни (при заражении на 13 день) или на 3, 4, 5, 7, 10 дни (при заражении на 28 день). В случае положительного результата ПЦР, пробы полученной кДНК фрагмента гена F секвенировали для дифференциации штамма-пробойника и вакцинных штаммов ВНБ с помощью автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130.

В таблице 13 представлены результаты заражения различных групп цыплят вирусом NDV/chicken/Rus/Khanty-Mansy/1240-1/21 генотипа VII L в возрасте 13 и 28 суток, а также эффективность использованных схем вакцинации.

Таблица 13 – Протективное действие комбинаций вакцин против болезни Ньюкасла при заражении цыплят вирусом НБ субгенотипа VII L

Номер группы. Используемые вакцины	Летальность $Le = (\sum b)/n, \%$	Клинический индекс $C = (\sum a + \sum b)/n,$ (больные + павшие)	Протективный индекс Pr^*
Контрольное заражение в возрасте 13 суток			
№2. Контроль вируса	21/25** (84)	25/27 ($C_0=0,93$)	2/27 (Pr н/о)
№4. Галлимун +Авинью	12/21 (57)	21/27 ($C_1=0,78$)	6/27 ($Pr=0,16$)
№ 6. Вектормун +В1Хипра	16/21 (76)	21/27 ($C_1=0,78$)	6/27 ($Pr=0,16$)
Контрольное заражение в возрасте 28 суток			
№3. Контроль вируса	27/27 (100)	27/27 ($C_0=1$)	0/27 (Pr н/о)
№ 5. Галлимун +Авинью +Авинью	8/14 (57)	14/27 ($C_1=0,52$)	13/27 ($Pr=0,48$)
№7. Вектормун +В1 Хипра +ХипраКлон	13/21 (61)	21/27 ($C_1=0,78$)	6/27 ($Pr=0,22$)

Примечание: * - $Pr = (C_0 - C_1)/C_0$, где: C_0 - клинический индекс в контрольной группе; C_1 - тоже в вакцинированной группе;

** - в числителе частота признака, в знаменателе - общее число исследований.

По результатам эксперимента (данные таблицы 13) на 25-й день жизни цыплят после заражения в возрасте 13 суток патогенное действие вируса НБ для различных групп было выражено в разной степени:

- группа №2 (не вакцинированные цыплята) – на конец опыта клинически здоровы были только два цыпленка, 25 голов из 27 в группе заболели, летальность составила 84%. Видимо это было связано с наличием остаточного материнского иммунитета у цыплят;

- группа №4 (вакцинированы Галлимун (подкожно)+Авинью (спрей) в сутки) – протективный индекс составил всего 0,16, при летальности – 57%;

- группа №6 (вакцинированы Вектормун (подкожно)+ В1 Хипра (интраокулярно) в сутки) – протективный индекс составил также 0,16, при летальности – 76%.

Таким образом, цыплята групп №4 и №6 были не защищены от заражения вирулентным вирусом НБ генотипа VII L. Однако, смертность цыплят в группе №4 была несколько ниже, чем в группе №6. Можно предположить о более высокой эффективности схемы вакцинации, применённой в группе №4.

На 10-е сутки после заражения цыплят в возрасте 25 суток патогенное действие вируса НБ для различных групп было выражено также в разной степени:

- группа №3 (не вакцинированные цыплята) – погибло 100% птицы;
- группа №5 (вакцинированы Галлимун (подкожно)+Авинью (спрей) в сутки и Авинью (и/о) в 14 дней) – протективный индекс составил 0,52, при летальности – 57%.
- группа №7 (вакцинированы Вектормун (подкожно)+ В1 Хипра (спрей) в сутки и ХипраКлон (и/о) в 14 дней) – протективный индекс составил 0,22, при летальности – 61%.

Из полученных данных следует, что наиболее эффективная схема вакцинации против болезни Ньюкасла была применена в группе №5: в этой группе наблюдали наименьшие показатели патогенного действия вируса и смертности, в то время как сохранность была наиболее высокой.

Можно сделать вывод, что схемы вакцинации с применением традиционных живых и инактивированных вакцин являются более эффективными для защиты цыплят-бройлеров от заражения вирусом НБ генотипа VII L.

В таблице 14 представлены сгруппированные данные серологических исследований цыплят на наличие антител к вирусу НБ в РТГА в зависимости от групповой принадлежности и временных точек отбора проб.

Таблица 14 - Динамика гуморального иммунного ответа цыплят, привитых различными комбинациями вакцин против болезни Ньюкасла

Номер группы. Используемые вакцины	Титр антител в РТГА ($\log_2 \pm s$) соответственно возрасту проб, сутки				
	3	13	21	28	35
№1. Отрицательный контроль	5,4 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,2*	3,0 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,3
№2. Контроль вируса		4,0 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,3	10,9 $\pm$ 0,4	9,3 $\pm$ 0,3
№3. Контроль вируса		4,4 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,2	-
№4. Галлимун +Авинью		6,1 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,3	9,2 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 0,5
№5. Галлимун +Авинью +Авинью		6,2 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,3
№6. Векормун +В1Хипра		5,4 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,4	9,7 $\pm$ 0,5
№7. Векормун +В1Хипра +ХипраКлон		5,5 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,3

Примечание: * - средний титр антигемагглютинирующих антител в группе цыплят, выраженный в $\log_2$.

По данным, приведенным в таблице 14, можно заключить, что во всех группах отрицательного контроля суток происходило снижение материнского иммунитета у цыплят с возраста трех суток до 13 суток. В группах №4 и №5 цыплят, вакцинированных инактивированной вакциной, происходило увеличение титров специфических антител примерно на 1 $\log$, а в группах №6 и №7 цыплят, вакцинированной векторной вакциной, титр не повышался и был сопоставим с уровнем у трехсуточных цыплят, у которых титр материнских антител составлял 5,4 $\log$.

В группах цыплят №2, №4 и №6, заражённых в 13 суточном возрасте вирулентным ВНБ, происходило достаточно резкое нарастание титров антител на фоне высокой смертности с 16 по 28 сутки, как результат гуморального ответа на заражение. На 28 и 35 сутки титр антител у выживших цыплят этих групп был примерно одинаков и достаточно высок (9-10 $\log$). Эти группы отличались по

уровню сохранности – у не вакцинированных он был ожидаемо низок (22%), однако и у вакцинированных он был не высок (41% при вакцинации векторной и живой вакциной и 55% при вакцинации инактивированной и живой вакцинами (учитывалось количество выживших птиц на конец опыта).

Более высокую сохранность демонстрировали группы №5 и №7, где цыплята были вакцинированы двукратно, перед заражением вирулентным ВНБ в 28 суток. К этому моменту титр поствакцинальных антител достиг достаточно высокого уровня, что обеспечило повышение сохранности в группах, однако наиболее высоких показателей к 28 дню титр достигал в группе №5 (вакцинированы инактивированной и двукратно живыми вакцинами), что обеспечило наибольшую сохранность после заражения. В контрольной группе №3 при заражении в 28 суток наблюдали достаточно быструю 100% гибель цыплят (табл. 13), что ожидаемо на фоне снижения уровня специфических материнских антител до $2 \log_2$ к моменту заражения.

Динамика гуморального иммунного статуса в группах цыплят в течение опыта представлена на рисунке 12.

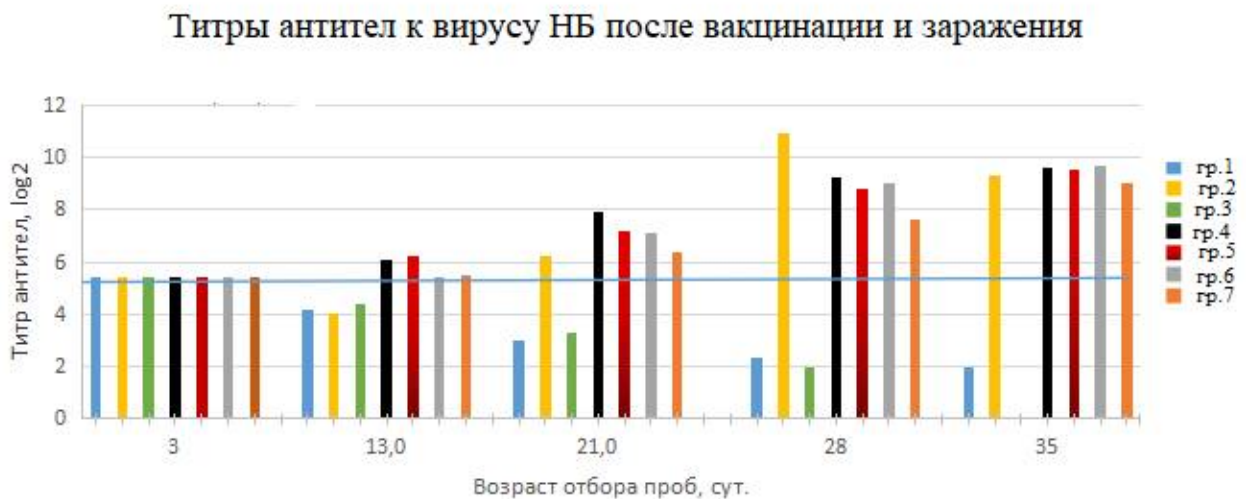


Рисунок 12 - Динамика титров антител в опытных группах цыплят в течение опыта по определению оптимальных схем вакцинации бройлера против НБ.

Примечание: горизонтальная линия обозначает минимальный протективный титр антител по Allan et al. (1978). Обозначения групп даны в таблице 12.

Анализируя серологические данные, можно заключить, что уровень антител $5,2 \log_2$ в РТГА к вирусу ньюкаслской болезни, определённый Allan W.H. et al. [112] как защищающий птицу от падежа, в условиях контрольного заражения вакцинированной птицы высоковирулентным вирусом НБ субгенотипа VII L оказался недостаточным.

В таблицах 15 и 16 представлены первичные результаты заболеваемости и смертности цыплят бройлеров после контрольного заражения вирулентным вирусом НБ субгенотипа VII L, а также данные исследования методом ПЦР патматериала и клоакальных мазков от птиц опытных групп заражённых в возрасте 13 и 28 дней.

Таблица 15 - Результаты исследований методом ПЦР и секвенирования проб (клоакальные мазки и патматериал) от опытных групп цыплят после заражения в возрасте 13 суток вирусом НБ субгенотипа VII L

№ группы	Срок после заражения, суток	Статус птицы	Кол-во обследованных	Вид пробы (клоак. мазки (кл) или пат.мат. (пм))	Кол-во ПЦР-положит. проб	% положит. проб	Рез-ты секв. положит. проб (генотип)
1	2	3	4	5	6	7	8
2	3	погибшие	4	кл,пм	4,4	100,100	VII
		больные	6	кл	6	100	VII
		здоровые	17	кл	17	100	VII
	4	погибшие	2	кл,пм	2,2	100,100	VII
		больные	10	кл	10	100	VII
		здоровые	11	кл	11	100	VII
	6	погибшие	11	кл,пм	7,11	64,100	VII
		больные	2	кл	2	100	VII
		здоровые	8	кл	6	75	VII
	9	погибшие	4	кл,пм	2,4	50,100*	VII
		больные	2	кл	2	100	VII
		здоровые	4	кл	2	50	VII
	14	погибшие	2	кл,пм	0,2	0,100*	VII
		больные	1	кл	0	0	
		здоровые	3	кл	0	0	
	24	больные	2	кл	0	0	
		Здоровые	2	кл	0	0	

1	2	3	4	5	6	7	8
4	3	погибшие	2	кл,пм	2,2	100,100	VII
		больные	1	кл	1	100	VII
		здоровые	24	кл	24	100	VII
	4	погибшие	2	кл,пм	2,2	100,100	VII
		больные	4	кл	4	100	VII
		здоровые	19	кл	15	79	VII
	6	погибшие	2	кл,пм	1,2	50,100*	VII
		больные	6	кл	4	66	VII
		здоровые	15	кл	11	73	VII
	9	погибшие	5	кл,пм	0,5	0,100*	VII
		больные	6	кл	3	50	VII
		здоровые	10	кл	5	50	VII
	14	погибшие	1	кл,пм	0,1	0,100*	VII
		больные	6	кл	1	17	VII
		здоровые	9	кл	0	0	
	24	погибшие	0	кл,пм			
		больные	6	кл	0	0	
		здоровые	9	кл	0	0	
6	3	погибшие	3	кл,пм	3,3	100,100	VII
		больные	5	кл	5	100	VII
		здоровые	19	кл	19	100	VII
	4	погибшие	2	кл,пм	2,2	100,100	VII
		больные	10	кл	10	100	VII
		здоровые	12	кл	10	83	VII
	6	погибшие	3	кл,пм	1,3	33,100*	VII
		больные	8	кл	5	63	VII
		здоровые	11	кл	8	73	VII
	9	погибшие	4	кл,пм	1,4	25,100*	VII
		больные	5	кл	2	40	VII
		здоровые	10	кл	6	60	VII
	14	погибшие	4	кл,пм	0,4	0,100*	VII
		больные	5	кл	1	20	VII
		здоровые	6	кл	0	0	
	24	погибшие	0	кл,пм			
		больные	5	кл	0	0	
		здоровые	6	кл	0	0	

Примечание: - при низкой выявляемости (или отсутствии) генома вируса в клоакальных мазках, значения Ст (в ПЦР-РВ) проб патологического материала от трупов кур (погибшие) было выше 30 (от 32 до 39), что свидетельствует о предельно низком содержании вируса в тканях печени, почек и селезенки.

Таблица 16 - Результаты исследований методом ПЦР и секвенирования проб (клоакальные мазки и патматериал) от опытных групп цыплят после заражения в возрасте 28 суток вирусом НБ субгенотипа VII L

№ группы	Срок после заражения, суток	Статус птицы	Кол-во обследованных	Вид пробы (клоак. мазки (кл) или пат. мат.(пм)	Кол-во ПЦР-положит. проб	% положит проб	Рез-ты секв. положит. проб (генотип)
1	2	3	4	5	6	7	8
3	3	погибшие	3	кл,пм	3,3	100,100	VII
		больные	12	кл	12	100	VII
		здоровые	12	кл	12	100	VII
	4	погибшие	10	кл,пм	10,10	100,100	VII
		больные	9	кл	9	100	VII
		здоровые	5	кл	5	100	VII
	5	погибшие	14	кл,пм	14,14	100,100	VII
		больные	0				
		здоровые	0				
	7	погибшие	0				
		больные	0				
		здоровые	0				
3	10	погибшие	0				
		больные	0				
		здоровые	0				
5	3	погибшие	1	кл,пм	1,1	100,100	VII
		больные	2	кл	2	100	VII
		здоровые	24	кл	16	67	VII
	4	погибшие	3	кл,пм	3,3	100,100	VII
		больные	5	кл	5	100	VII
		здоровые	18	кл	10	56	VII
	5	погибшие	2	кл,пм	2,2	100,100	VII
		больные	3	кл	3	100	VII
		здоровые	18	кл	6	30	VII
	7	погибшие	1	кл,пм	0,1	0,100*	VII
		больные	4	кл	2	50	VII
		здоровые	16	кл	3	19	VII
	10	погибшие	0				
		больные	6	кл	1	17	VII
		Здоровые	14	кл	0	0	

1	2	3	4	5	6	7	8
7	3	погибшие	1	кл,пм	1,1	100,100	VII
		больные	2	кл	2	100	VII
		здоровые	24	кл	19	79	VII
	4	погибшие	2	кл,пм	2,2	100,100	VII
		больные	10	кл	10	100	VII
		здоровые	14	кл	9	64	VII
	5	погибшие	9	кл,пм	4,9	44,100*	VII
		больные	5	кл	4	100	VII
		здоровые	10	кл	4	40	VII
	7	погибшие	0				
		больные	6	кл	4	66	VII
		здоровые	9	кл	3	33	VII
	10	погибшие	1	кл,пм	0,1	0,100*	VII
		больные	8	кл	2	25	VII
		здоровые	6	кл	0	0	

Примечание- при низкой выявляемости (или отсутствии) генома вируса в клоакальных мазках, значения Ст (в ПЦР-РВ) проб патологического материала от трупов кур (погибшие) было выше 30 (от 32 до 39), что свидетельствует о предельно низком содержании вируса в тканях печени, почек и селезенки.

По данным таблиц 15 и 16, видно, что независимо от использованных схем вакцинации высоковирулентный вирус НБ циркулирует в организме зараженной птицы и выделяется с пометом в течении 7-10 дней после заражения. Наибольшей динамики выделения вирус достигает в первые четыре дня после заражения, независимо от способа вакцинации. Наибольшая заболеваемость и гибель птицы достигается на 4-9 сутки. При этом гибель птицы с двукратной схемой вакцинации ниже на третий день, чем у цыплят с однократной схемой вакцинации. При использовании схемы с двукратной вакцинацией вирулентный вирус элиминировался из организма быстрее, чем при использовании однократной вакцинации, на фоне меньшей заболеваемости и смертности. Количество больных особей при этом в группах №4 и №5 (вакцины «Берингер Ингельхайм») было заметно меньше, чем в группах №6 и №7. К 9-14 дню после заражения вирус в клоакальных мазках как правило не выявлялся, что говорит о его эффективной элиминации в процессе развивающегося специфического иммунного ответа, однако, в тканях погибших особей вирус выявлялся в предельно низком количестве

в тканях печени, почек и селезенки, что указывает на специфическую причину их гибели.

При исследовании положительных проб методом секвенирования во всех пробах был выявлен геном ВНБ VII генотипа (пробойника), что говорит об элиминации вакцинных живых штаммов в организме птицы к моменту контрольного заражения и активной репликации вируса-пробойника (по крайней мере в первые дни после заражения) в тканях вакцинированной птицы, независимо от схемы вакцинации.

Специфичность гибели экспериментальной птицы также подтверждали при анализе патологоанатомической картины при проведении вскрытия: наблюдали геморрагический клоацит, геморрагическое воспаление желудка и преджелудка, дуоденит, а также кровоизлияния в тканях головного мозга (рисунок 13).



Рисунок 13 - Патологоанатомические изменения птиц, зараженных вирусом болезни Ньюкасла субгенотипа VII L: геморрагический клоацит, геморрагическое воспаление желудка и преджелудка, дуоденит.

Таким образом, анализируя полученные результаты можно сделать следующие заключения: после контрольного заражения вакцинированной птицы наименьшие показатели патогенного действия вируса НБ генотипа VII L (52%) и смертности (30% от общего количества птиц в группе) наблюдали у цыплят,

иммунизированных инаktivированной вакциной с последующей двукратной вакцинацией живым препаратом, сохранность была наиболее высокой - 70% (учитывалось количество выживших птиц на конец опыта). Комбинация применения векторной вакцины с последующей двукратной вакцинацией живыми препаратами после контрольного заражения в опыте показала сохранность 52%.

По результатам проведенных ПЦР исследований можно сделать вывод, что независимо от использованных схем вакцинации высоковирулентный вирус НБ продолжает циркулировать в организме зараженной птицы и выделяться с пометом как минимум 7-10 дней после заражения. Наибольшей динамики выделения вирус достигает в первые четыре дня после заражения, независимо от способа вакцинации. Наибольшая заболеваемость ньюкаслской болезнью и гибель птицы достигается на 4-9 сутки после заражения вирулентным вирусом НБ VII L. При двукратной вакцинации вирулентный ВНБ элиминировался из организма быстрее, чем при однократной на фоне меньшей заболеваемости и смертности.

3.2.2 Изучение иммунологических свойств инаktivированных вакцин против болезни Ньюкасла на основе антигенов вируса НБ генотипов II («Ла-Сота») и VII (VII L)

Проведенные выше опыты по изучению эффективности различных вакцин для профилактики НБ против генотипа VII L свидетельствуют о необходимости разработки новых иммунобиологических препаратов. Задачей настоящих исследований являлась сравнительная оценка иммунологических свойств двух вариантов инаktivированных вакцин, изготовленных на основе антигенов вируса НБ «ВНИИЗЖ G7» генотипа VII L и штамма «Ла-Сота» генотипа II.

Антигены НБ «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» содержали $8 \log_2$ ГАЕ/0,1 см³ и $10 \log_2$ ГАЕ/0,1 см³, соответственно. Инфекционная активность вирусов НБ штаммов «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» до инаktivации составляла 9,25 ЭИД₅₀/см³ и 10,25 ЭИД₅₀/см³, соответственно. На основе вирусных антигенов и масляного адьюванта Montanide ISA 70VG готовили образцы эмульсионных вакцин. Каждый образец содержал антиген в заданной концентрации (разведении). Испытывали образцы, имеющие концентрацию антигена (D): 1(цельный); 1:25, 1:50 и 1:100.

Цыплятам яичного кросса «Ломан Браун» в возрасте 4-х недель вводили образцы вакцин внутримышечно в объеме 0,5 см³ в область груди. В контрольной группе птиц не иммунизировали.

Вакцинированных и контрольных птиц заражали через 28 суток после вакцинации вирулентным вирусом НБ изолятом NDV/by/chicken/612/2021 в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀/0,5 см³ внутримышечно в область бедра. В течение последующих десяти суток контролировали клиническое состояние зараженной птицы.

Оценками напряженности поствакцинального гуморального иммунитета служили установленные в РТГА титры антител к вирусу НБ. Для постановки реакции параллельно использовали антигены «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота». Результаты клинических наблюдений в группах после контрольного заражения выражали в виде клинических показателей и индексов защиты (таблица 17).

Таблица 17 - Иммуногенность инаktivированных вакцин на основе антигенов НБ «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» при заражении цыплят ВНБ субгенотипа VII L

Вакцина на основе антигена	Доза антигена (D)	Результаты РТГА соответственно антигену		Клинический индекс С	Протектив- ный индекс Pr
		log ₂ (T±S)**			
	D* (lg D)	«Ла-Сота»	«ВНИИЗЖ G7»	C=(∑c)/n***	Pr=1-(∑c)/n
«ВНИИЗЖ G7»	1 (0)	3,55±0,3	5,60±0,6	0/10	1,0
	1:25 (1,40)	3,33±0,3	5,67±0,6	0/10	1,0
	1:50 (1,70)	3,43±0,5	5,43±0,7	3/10	0,7
	1:100 (2,00)	1,25±0,3	3,00±0,6	5/10	0,5
«Ла-Сота»	1(0)	6,00±0,4	3,61±0,4	0/10	1,0
	1:25 (1,40)	6,00±0,6	3,44±0,4	2/10	0,8
	1:50 (1,70)	4,33±0,4	2,83±0,4	7/10	0,3
	1:100 (2,00)	3,50±0,8	1,83±0,3	7/10	0,3
Контроль	невакцин.	2,10±1,6	1,8±1,2	10/10	0,0

* - Оценки показателей соответственно испытанным препаратам и дозам антигенов

** - средний логарифмический титр антител и соответствующее стандартное отклонение, установленные перед заражением птиц.

Из данных таблицы 17 следует: а) антигенная активность и протективный эффект обоих препаратов зависели от концентрации антигенов в прививном объеме; б) оценки титров антител всегда были выше при использовании в РТГА гомологичных антигенов; в) препарат на основе антигена «ВНИИЗЖ G7» (гомологичный заражающему штамму) демонстрировал больший протективный эффект.

Строили регрессионные модели (P_r по $\lg D$), используя которые вычисляли дозы антигена, обеспечивающие защиту 50% (PD_{50}). Установили, что прививной объем не разведенной вакцины на основе антигена «ВНИИЗЖ G7» ВНБ содержал 105 PD_{50} . Аналогичная оценка для препарата на основе антигена из штамма «Ла-Сота» имела величину 50 PD_{50} . Это означало, что протективный потенциал вакцины, содержащей антиген гомологичный заражающему штамму, был в два раза выше.

Исследовали зависимость между дозой антигена и индексом защиты. Для приближения зависимости к линейному виду использовали формулу Берксона [7], позволяющую получить линейные эквиваленты индексов: $f = \log (P/(1 - P))$. Для значений $P = 1$, приняли условные оценки ' $P_1 = (1 - 1/5n)$ [79].

Использовали регрессионный анализ. Построенные модели (уравнения) регрессии f по $\lg D$ для антигенов «ВНИИЗЖ G7» (1) и «Ла-Сота» (2) имели вид:

$$1) 'f = (-1,890)\lg D + 3,817; R^2 = 0,836,$$

$$2) 'f = (-2,200)\lg D + 3,736; R^2 = 0,915,$$

где: ' f - ожидаемый эквивалент для заданного значения $\lg D$. Используя приведенные уравнения произвели расчет прогнозируемых доз антигенов, обеспечивающих защиту 50% (PD_{50}) и 95% (PD_{95}) вакцинированных птиц. Кроме этого вычислили соответствующие концентрации в единицах гемагглютинации. Полученные результаты исследований представлены в таблице 18.

Таблица 18 - Прогнозируемые дозы вирусных антигенов НБ обеспечивающих защиту 50% (PD₅₀; PA₅₀) и 95% (PD₉₅; PA₉₅) иммунизированных птиц

Антиген	lgPD ₅₀ *	PD ₅₀	PA ₅₀ , ГАЕ	lgPD ₉₅	PD ₉₅	PA ₉₅ , ГАЕ
«ВНИИЗЖ G7»	$3,817/1,890 = 2,02$	1:105	8,13	$(3,817-1,279)/1,890 = 1,34$	1:22	38,79
«Ла-Сота»	$3,736/2,200 = 1,70$	1:50	34,13	$(3,736-1,279)/2,200 = 1,12$	1:13	131,28

Примечание: * - рассчитаны по регрессионным уравнениям для $f_{50} = \lg(0,5/(1-0,5)) = 0$ и $f_{95} = \lg(0,95/(1-0,95)) = 1,279$

Данные, представленные в таблице 18, демонстрируют, что для достижения защиты 50% вакцинированных птиц антигена «ВНИИЗЖ G7» требовалось меньше, чем антигена «Ла-Сота», как в относительных единицах ($105/50=2,10$), так и в ГАЕ ($34,13/8,13=4,20$). Аналогичное сравнение для достижения 95% защиты иммунизированных птиц показало следующие соотношения: $22/13 = 1,70$ и $131,28/38,79 = 3,40$, соответственно.

На основании данных реакции торможения гемагглютинации исследовали антигенную родственность штаммов «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» вируса ньюкаслской болезни. Анализировали результаты наибольших иммунизирующих доз. Использовали стандартную процедуру Архетти и Хорсвала [119], в соответствии с которой для двух антигенов и двух сывороток в гомо- и гетерологичных реакциях (hom и het) определяли значения титров (T_{hom} и T_{het}), оценивали два отношения (r_1 и r_2) вида $r = T_{het} / T_{hom}$, и вычисляли результирующий процентный показатель $R = 100\sqrt{(r_1 \times r_2)}$.

Расчеты выполняли с использованием логарифмов. Полученные результаты приведены в таблице 19.

Таблица 19 - Оценка двустороннего антигенного родства (R) в РТГА между штаммами «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» вируса ньюкаслской болезни *

Вариант реакции**	log ₂ T	log ₂ (r) = log ₂ T _{het} - log ₂ T _{hom}	R ^{***} =×100 (%)
hom: s(«ВНИИЗЖ G7») ×a(«ВНИИЗЖ G7»)	5,67±0,6	- 2,34±0,67	18,3 (13,0 ÷ 25,7) [#]
het: s(«ВНИИЗЖ G7»)×a(«Ла-Сота»)	3,33±0,3		
hom: s(«Ла-Сота»)×a(«Ла-Сота»)	6,00±0,6	- 2,56±72	
het: s(«Ла-Сота»)×a(«ВНИИЗЖ G7»)	3,44±0,4		

Примечания:

- * - по результатам испытания наибольших иммунизирующих доз (данные из таблицы 17);
- ** - hom, het - гомо- и гетерологичные реакции; s - сыворотка; a - антиген;
- *** - $\log_2 R = [\log_2(r)_1 + \log_2(r)_2]/2$;
- # - в скобках указаны границы ошибки измерения R.

Результаты, представленные в таблице 19, показали, что обе оценки $\log_2(r)$ по критерию двух стандартных отклонений были статистически значимы ($p < 0,05$), что позволило считать показатель $R=18,3\%$ достоверной оценкой двустороннего антигенного родства между штаммами «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» вируса НБ.

Таким образом, в ходе проведенных исследований было установлено, что эмульсионная инактивированная вакцина против НБ, изготовленная на основе антигена «ВНИИЗЖ G7», по изученным свойствам (интенсивности гуморальной иммунной реакции и протективному действию против высоковирулентного вируса генотипа VII L, распространенного в РФ с 2019 г.) продемонстрировала более высокую эффективность, чем аналогичный препарат на основе антигена из классического штамма «Ла-Сота», входящий в состав традиционных вакцин против вышеуказанной болезни. Поэтому в ФГБУ «ВНИИЗЖ» было принято решение о разработке инактивированных вакцин против НБ, включающих в свой состав актуальный для Российской Федерации в настоящее время вирус болезни Ньюкасла генотипа VII L.

3.2.3 Разработка инактивированных вакцин против НБ с вирусом субгенотипа VII L «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» и «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

3.2.3.1 Депонирование производственного штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни субгенотипа VII L

Целью нашего исследования являлось разработать новый препарат, защищающий птицу от актуальных, циркулирующих на территории РФ в настоящее время изолятов вируса ньюкаслской болезни. В результате был выделен новый изолят вируса НБ генотипа VII L, изучены его культуральные свойства, он был адаптирован к системам промышленного культивирования и депонирован во Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ») в качестве производственного штамма.

Изолят «NDV/by/chicken/612/2021» вируса ньюкаслской болезни выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала, полученного от цыплят-бройлеров птицефабрики Гомельской области Республики Беларусь. Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г. путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. В результате пяти последовательных пассажей вирус был адаптирован к культивированию на 9-11-суточных эмбрионах кур. Вирус вызывал гибель эмбрионов на 48 сутки, накапливаясь не менее $7,0 \lg \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и с гемагглютинирующей активностью не менее $7 \log_2$ в РГА.

Определение генетической принадлежности штамма методом ПЦР и нуклеотидного секвенирования (работа выполнена совместно с сотрудниками референтной лаборатории вирусных болезней птиц) Определяли нуклеотидную последовательность фрагмента гена F_0 вируса НБ в ПЦР в соответствии с «Методикой выявления генома и штаммовой дифференциации вируса ньюкаслской болезни с использованием ПЦР и прямого секвенирования».

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена F₀, выявленная в составе восстановленной суспензии исследуемого образца, соответствует последовательности гена F₀ штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни, представлена ниже:

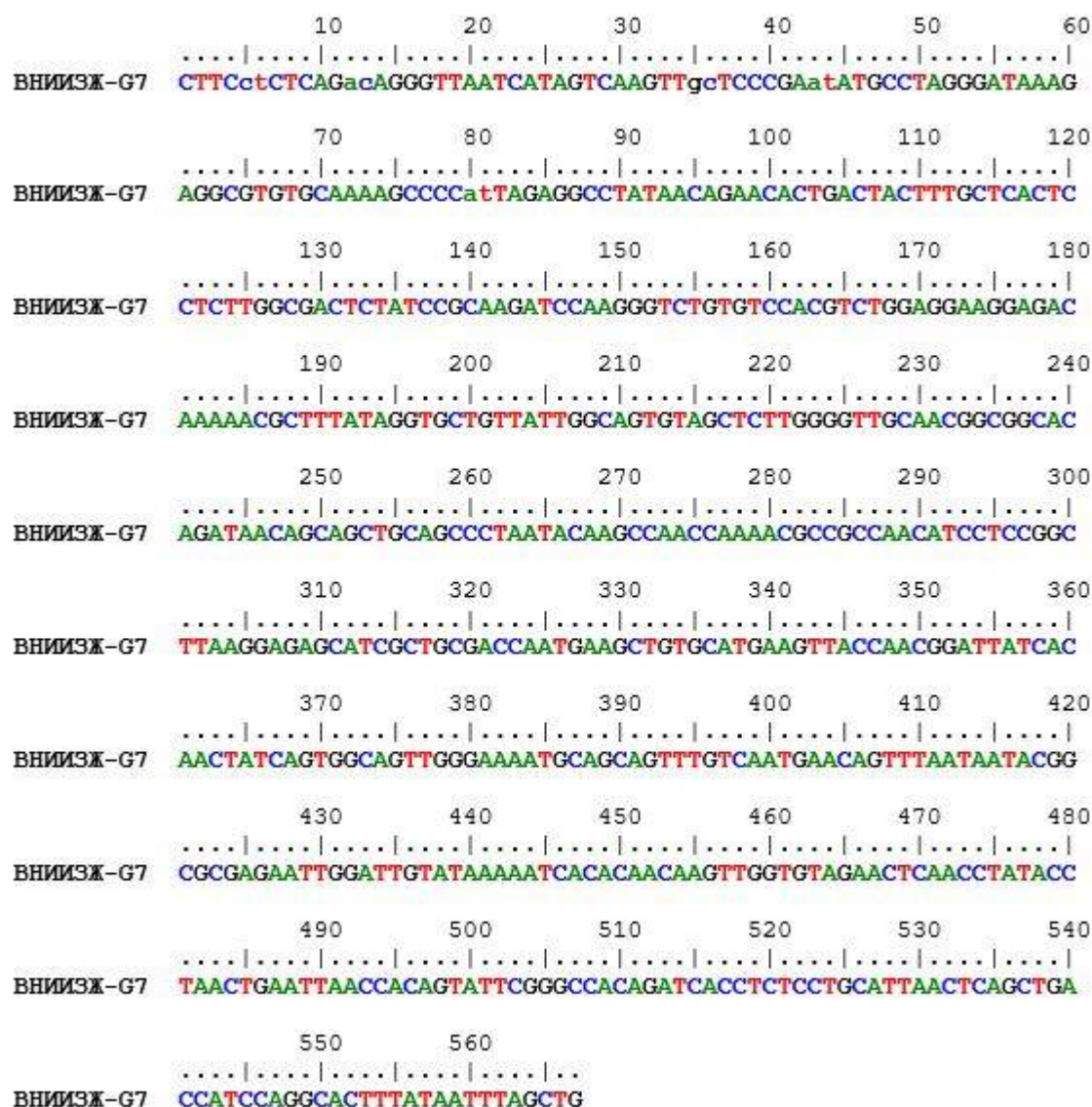


Рисунок 14 - Нуклеотидная последовательность фрагмента гена F₀ штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни

Контроль стерильности штамма. При испытании по подтверждению отсутствия контаминации штамма бактериальной, грибной микрофлорой и микоплазмами микробиологическими методами использовали пять флаконов со штаммом «ВНИИЗЖ G7» ВНБ, которые исследовали в соответствии с ГОСТ 28085.

В результате исследований установлено, что штамм вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ G7» не контаминирован бактериями, грибами и микоплазмами.

Контроль отсутствия контаминации посторонними вирусами и микоплазмами (работа проведена совместно с сотрудниками референтной лаборатории вирусных болезней птиц). Результатами ПЦР установлено, что штамм вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ G7» не контаминирован вирусами ССЯ-76, РЕО, ИББ, МПВИ, ГП, ИБК, ИЛТ, ИЭМ, ВАЦ, БМ, оспы, лейкоза, микоплазмами (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*).

Определение инфекционной и гемагглютинирующей активности штамма. Испытания проводили в соответствии с типовыми методиками. Результаты титрования штамма представлены в таблице 20.

Таблица 20 - Инфекционная активность штамма НБ «ВНИИЗЖ G7» (n=5)

Повторность	Титр вируса, ЭИД ₅₀ /см ³	ГАЕ, log ₂
1	7,5	7,0
2	7,7	8,0
3	8,5	7,0
4	9,0	7,0
5	8,5	8,0

В результате исследований установлено, что инфекционная активность штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ составила 7,5-9,0 lg ЭИД₅₀/см³ (M=8,2±0,05 lg ЭИД₅₀/см³), при этом гемагглютинирующая активность вируса (ГАЕ) в ЭЭЖ была в диапазоне 7,0-8,0 log₂ (M=7,4±0,25 log₂).

Определение индекса интрацеребральной патогенности (ICPI) штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ

Эксперимент проводили в соответствии с рекомендациями Кодекса наземных животных [526]. Для определения ICPI десяти головам суточных цыплят вводили интрацеребрально подготовленный образец главного посевного материала в объеме 0,05 см³ (T>2^{0,7} ГАЕ). Наблюдение за цыплятами продолжали в течение

восьми суток. Ежедневно проводили клинический осмотр птицы, при котором каждой из них присваивали баллы, соответственно их клиническому состоянию: 0 – здоровые, 1 – заболевшие и 2 - погибшие. В случае, если больная птица не могла есть и пить, то ее повергали вынужденному убою и считали, как погибшую, т.е. присваивали 2 балла.

По завершении времени наблюдений рассчитывали индекс интрацеребральной патогенности (ICPI) по следующей формуле: $ICPI = (\sum P) / 80$, где $\sum P$ – сумма баллов, полученных за время наблюдений за всей птицей; 80 – константная величина, равная количеству птицеведней.

Полученные результаты по определению индекса интрацеребральной патогенности штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ представлены в таблице 21.

Таблица 21 - Оценка индекса интрацеребральной патогенности вакцинного штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ на суточных цыплятах, выведенных из СПФ-яиц

Клиническое состояние птицы	Количество голов цыплят соответственно их клиническому состоянию и дню наблюдений								Итого баллов (P)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Здоровые	10	10	10	0	0	0	0	0	0
Заболевшие	0	0	0	5	0	0	0	0	$5 \times 1 = 5$
Погибшие	0	0	0	5	10	10	10	10	$45 \times 2 = 90$
$ICPI = \sum (0 + 5 + 90) / 80 = 1,19$									

В эксперименте было установлено, что при интрацеребральной инъекции суточным цыплятам штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ происходил динамичный инфекционный процесс с проявлением клинических признаков, характерных для ньюкаслской болезни. Инкубационный период болезни составил трое суток. Далее, в течение 4-х и 5-х суток наблюдений вся птица погибла. По итогам наблюдений, соответственно принятой методике расчета, оценка индекса составила величину 1,19.

Определение стабильности штамма при культивировании последовательными пассажами в куриных эмбрионах. При проведении испытаний осуществляли пять последовательных пассажей, репродуцируя вирус штамма в 11-суточных КЭ и определяя биологическую/инфекционную активность каждого пассажа вируса на этой же биосистеме. Полученные результаты свидетельствуют о стабильной и высокой биологической активности вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ G7», инфекционный титр которого на пятом пассаже составил $8,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

На основании результатов комиссионных испытаний штамм вируса болезни Ньюкасла «ВНИИЗЖ G7» был депонирован в ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» в качестве производственного (Справка о депонировании № 436-деп/22-70 от 30.12.2022 г.). Данный производственный штамм был использован для разработки двух новых вакцин – «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» и «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти».

3.2.3.2 Разработка ассоциированной вакцины против ньюкаслской болезни («Ла-Сота» и G7) и гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» инактивированной эмульсионной

3.2.3.2.1 Доклинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни и гриппа птиц H9N2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

В рамках разработки нового препарата для специфической профилактики ньюкаслской болезни, вызываемой вирусами II и VII генотипов, и низкопатогенного гриппа птиц, вызываемого вирусом подтипа H9N2, были проведены исследования по определению оптимального состава препарата, способа его введения, прививного объёма, сроков появления иммунного ответа, изучению безопасности для птиц, стабильности физико-биологических свойств в течение рекомендуемого срока хранения, длительности иммунного ответа у привитых птиц.

**Обоснование оптимального компонентного состава вакцины
«ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»**

В эксперименте использовали антигены вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ G7» ($8 \log_2$ ГАЕ /0,1 см³) и штамма «Ла-Сота» ($10 \log_2$ ГАЕ/0,1 см³), а также антиген вируса ГП смеси штаммов «A/chicken/Amursky/03/12/H9N2» и «Челябинск-20» ($9 \log_2$ ГАЕ/0,1 см³). Инфекционная активность вирусов НБ штаммов «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» до инаktivации составляла 9,25 ЭИД₅₀/см³ и 10,25 ЭИД₅₀/см³, соответственно. Соотношение материалов из разных штаммов в рамках гриппа птиц («A/chicken/Amursky/03/12/H9N2» и «Челябинск-20» с инфекционной активностью до инаktivации 9,25 ЭИД₅₀/см³ и 9,5 ЭИД₅₀/см³, соответственно) было равным.

Для нахождения оптимального компонентного состава в вакцине «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» были приготовлены четыре опытных образца с заданными объемными долями антигенов. Полученные смеси объединяли со стерильным масляным адъювантом в весовом соотношении 30:70 и при помощи лабораторного эмульсора Silverson Unit L4R получали стабильную эмульсию. В результате были приготовлены экспериментальные образцы вакцины, с разным соотношением антигенов вирусов ньюкаслской болезни и низкопатогенного гриппа птиц в прививном объеме 0,5 см³, данные по которым приведены в таблице 22.

Таблица 22 – Соотношение антигенов болезни Ньюкасла и гриппа птиц H9N2 в образцах вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Образец	Содержание антигенов в прививном объеме (0,5 см ³): ГП : НБ «Ла Сота»: НБ G7	
	Объемное соотношение, %	ГАЕ
1	35:40:25	269:614:96
2	40:30:30	307:461:115
3	40:20:40	307:307:154
4	50:20:30	384:307:115

Образцы вакцины испытывали на птице кросса «Хайсекс Браун» 50-суточного возраста. До начала эксперимента у 10 голов птицы отобрали кровь для исследований сывороток на наличие антител к вирусам НБ и ГП. В РТГА установили, что птица имела средний титр антител к вирусу болезни Ньюкасла $T \pm s = 3,3 \pm 0,2 \log_2$.

Было сформировано четыре опытных и контрольная группы птиц по 10 голов в каждой. Птицу опытных групп иммунизировали в прививном объеме 0,5 см³, соответственно номеру образца вакцины, контрольная группа оставалась интактной. Через 28 суток в РТГА оценивали титры антител к испытанным антигенам. Результаты исследования приведены в таблице 23.

Таблица 23 - Активность сывороток в РТГА соответственно пропорции антигенных компонентов, входящих в состав экспериментальных образцов вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Номер группы	Объемное соотношение антигенов	Средние титры антител (T , $\log_2$) и их стандартные ошибки ($\pm s$) к соответствующим антигенам вирусов		
		ГП	НБ «Ла-Сота»	НБ G7
1	35:40:25	7,0 $\pm$ 0,54	10,2 $\pm$ 0,49	6,2 $\pm$ 0,44
2	40:30:30	8,7 $\pm$ 0,42	9,3 $\pm$ 0,52	7,2 $\pm$ 0,39
3	40:20:40	8,9 $\pm$ 0,23	9,1 $\pm$ 0,50	8,6 $\pm$ 0,27
4	50:20:30	9,1 $\pm$ 0,31	8,9 $\pm$ 0,57	7,1 $\pm$ 0,43
Контроль	-	н/о*	1,9 $\pm$ 0,23	1,1 $\pm$ 0,31

Примечание: * - не обнаружено

По результатам опыта было установлено, что на 28 сутки после прививки во всех опытных группах у птицы сформировался напряженный иммунитет, индуцированный антигенами, входящими в состав испытуемых препаратов. При этом следует отметить, что гуморальный иммунный ответ в группах к разным штаммам вирусов был не одинаков. Величина титра антител к вирусу гриппа возрастала с увеличением количества антигена, в среднем от 7,0 до 9,1 $\log_2$. Таким

образом, увеличение объема антигена гриппа H9N2 в образце №4 на 15 % усилило интенсивность антителообразования у птицы до 4,2 раз.

Средние титры антител к штамму «Ла-Сота» вируса ньюкаслской болезни в вакцинированных группах находились в значительно более узком диапазоне, границы которого составляли $8,9 \div 10,2 \log_2$ (разница была равна всего $1,3 \log_2$).

Изменение объема антигена «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ на 15% в большую сторону, как и в случае с антигеном гриппа, привело к усилению гуморальной иммунной реакции птицы. Наибольшую концентрацию антител $T \pm s = 8,6 \pm 0,27 \log_2$ наблюдали в группе №3, где количество антигена генотипа VII L ВНБ было максимальным (40%).

Для определения достоверности различий среди полученных значений по каждому из антигенов вирусов ньюкаслской болезни и низкопатогенного гриппа птиц H9N2 провели статистический анализ по Шеффе. Результаты проведенного анализа представлены в таблице 24.

Анализируя попарное сопоставление полученных среднегрупповых титров антител к каждому из антигенов, установили, что:

- у группы птиц (№1), привитой вакциной с наименьшей концентрацией антигена гриппа (269 ГАЕ/0,5 см³ или 35% в весовом соотношении), интенсивность гуморальной иммунной реакции была самой слабой и достоверно отличалась от всех остальных привитых групп ($p=0,05$). Группы птиц, где концентрации антигена были наибольшими (307 и 384 ГАЕ или в весовом соотношении 40 и 50%), показали статистически равные результаты и имели самый высокий иммунный отклик;

- увеличение концентрации антигена НБ штамма «Ла-Сота» в 2 раза с 20 до 40% в весовом соотношении (или с 307 до 614 ГАЕ), не дало достоверного прироста антител у птиц;

- антиген штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ в образцах препарата работал по аналогии с антигеном гриппа. Однако, лишь одна группа птиц, привитая вакциной с наибольшей испытанной концентрацией (40% или 156 ГАЕ) антигена индуцировала наиболее высокий гуморальный иммунный ответ, достоверно отличающийся от других групп.

Таблица 24 – Сопоставление средних логарифмических титров антител (Т, log₂), установленных соответственно вирусных антигенов, входящих в состав испытуемых образцов вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Статистические коэффициенты (F)** для данной пары сопоставляемых значений lg Т к вирусу ГП				
Номер группы	lg 'T(Q; n)	lg Т		
		7,0 (1)*	8,7 (2)	8,9 (3)
1	7,0 (26,0; 10)	-	-	-
2	8,7 (16,1; 10)	3,10***		
3	8,9 (4,9; 10)	3,87	0,04	
4	9,1 (8,9; 10)	4,73	0,17	0,04
Статистические коэффициенты (F)** для данной пары сопоставляемых значений lg Т к вирусу НБ штамма «Ла-Сота»				
Номер группы	lg 'T(Q; n)	lg Т		
		10,2 (1)*	9,3 (2)	9,1 (3)
1	10,2 (21,6; 10)	1,48	1,06	0,71
2	9,3 (24,1; 10)	0,14	0,03	
3	9,1 (22,9; 10)	0,03		
4	8,9 (8,9; 10)			
Статистические коэффициенты (F)** для данной пары сопоставляемых значений lg Т к вирусу НБ штамма «ВНИИЗЖ G7»				
Номер группы	lg 'T(Q; n)	lg Т		
		6,2 (1)*	7,2 (2)	8,6 (3)
1	6,2 (17,6; 10)			
2	7,2 (13,6; 10)	1,60		
3	8,6 (6,4; 10)	9,14	3,11	
4	7,1 (16,9; 10)	1,29	0,02	3,57

Примечания:

* В скобках указан номер группы, соответствующий испытанному образцу вакцины;

** использовали метод Шеффе, где $F_{1,2} = (\lg T_1 - \lg T_2)^2 / (D/n_1 + D/n_2)$, где: $D = ((\Sigma Q) \times (k-1)) / (\Sigma n - k)$; Q – сумма квадратов отклонений выборки; n – число элементов в выборке; k – число выборок;

*** - жирным шрифтом выделены ячейки с коэффициентами, для которых выполняется неравенство $F \geq F_{p=0,05} = 2,87$, где F_p – критерий Фишера соответственно заданного уровня p для $v_1 = k-1$ и $v_2 = \Sigma n - k$.

По результатам проведенного эксперимента пришли к заключению, что если исходная гемагглютинирующая активность вирусов гриппа птиц H9N2 и ньюкаслской болезни штаммов «Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7» будет составлять 9, 10 и 8 ГАЕ/0,1 см³, соответственно, то наиболее эффективной и экономически обоснованной будет вариант вакцинного препарата с соотношением антигенов 40:20:40.

***Обоснование способа введения вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу
Мульти»***

Эксперимент проводили на птицах кросса «Хайсекс Браун» 90-суточного возраста, которых разделили на три группы. Птицу групп № 1 и №2 подвергали иммунизации образцом инаktivированной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» подкожно в область средней трети шеи и внутримышечно в грудную мышцу, соответственно. Прививной объем для всех способов введения препарата составлял 0,5 см³. Группа №3 была интактной (контроль).

До прививки и далее с периодичностью в 14 суток от птиц отбирали пробы сывороток крови для исследований. Эксперимент продолжали 28 суток. Определяли среднегрупповые значения титров антител к соответствующим антигенам вирусов ньюкаслской болезни и низкопатогенного гриппа птиц H9N2 в РТГА. Результаты исследования представлены в таблице 25.

Результаты эксперимента показали, что при обоих способах введения препарата организм птицы реагирует достаточно высоким иммунным откликом на все антигены, входящие в состав вакцины: во всех опытных группах к 14-м суткам наблюдений концентрация антител к штамму «Ла-Сота» вируса НБ была значительно выше минимальных значений, установленных требованиями НТД. Титры антител к вирусу НБ генотипа 7 также проявились в этот срок и составляли минимальный требуемый уровень. Уровни антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9N2 спустя две недели после прививки были недостаточно высокими и были ниже требуемых значений.

Таблица 25 - Антигенная активность компонентов НБ и ГП вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в зависимости от способа введения

Наименование группы	Титр антител до вакцинации	Периодичность отбора проб сывороток крови после вакцинации	
		14 суток	28 суток
НБ штамм «Ла-Сота»			
Группа №1 (подкожно)	6,5±0,3*	7,2±0,1	8,9±0,2
Группа №2 (внутримышечно)	6,8±0,2	7,0±0,1	9,1±0,2
Группа №3 (контроль)	6,3±0,1	4,8±0,2	3,3±0,4
НБ «ВНИИЗЖ G7»			
Группа №1 (подкожно)	3,8±0,4	5,1±0,2	8,4±0,2
Группа №2 (внутримышечно)		5,2±0,1	8,6±,1
Группа №3 (контроль)		Н/О	Н/О
ГП H9N2			
Группа №1 (подкожно)	Н/О	3,9±0,2	9,0±0,2
Группа №2 (внутримышечно)		3,8±0,2	9,2±0,2
Группа №3 (контроль)		Н/О	Н/О

Примечание: * - даны среднегрупповые логарифмические оценки титров антител в РТГА ($\log_2 T \pm s$, где: m – стандартная ошибка среднего).

К 28-и суткам наблюдений концентрация антител в группах №1 и №2 нарастала, при этом в контрольной группе прирост антител не наблюдали. Средние значения титров антител к каждому из антигенов между группами различались не значительно. Проведенные испытания показали, что подкожный и внутримышечный способы введения препарата являются равнозначными. Концентрации антител на каждый конкретный антиген в организме птицы к 28-и суткам при подкожном и внутримышечном способах введения статистически не различались.

Таким образом, уровень антител, индуцированных организмом птицы к 28-и суткам, при подкожном и внутримышечном способах введения являлся достаточными, чтобы считать вакцину против ньюкаслской болезни и гриппа птиц

H9N2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» антигенно активной. Вакцина может быть рекомендована к применению как внутримышечным, так и подкожным способом.

Определение динамики поствакцинальной гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Исследовали динамику развития поствакцинальной иммунной реакции соответственно возраста птицы при условии разной вариации прививной дозы (антигенов вируса ГП (смесь штаммов «A/chicken/Amursky/03/12/H9N2» и «Челябинск-20»), а также вируса НБ (смесь штаммов «Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7»). Исходная концентрация антигенов в суспензиях до включения в состав вакцины составляла: ГП – $9 \log_2$ ГАЕ/0,1см³; «Ла-Сота» - $10 \log_2$ ГАЕ/0,1см³ и «ВНИИЗЖ G7» – $8 \log_2$ ГАЕ/0,1см³. На основании результатов ранее проведенных исследований (см. раздел 3.2.3.2.1.1) оптимальная концентрация указанных антигенов в водной фракции эмульсионной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» соответствовала (ГАЕ/0,5 см³): ГП – 308; «Ла-Сота» - 308 и «ВНИИЗЖ G7» – 154. Иммунизирующую дозу антигена регулировали величиной прививного объема вакцины. Испытывали объемы (см³): 0,25; 0,5 и 1,0. Таким образом антиген ГП исследовали в дозах (ГАЕ): 154; 308 и 616; антиген «Ла-Сота» - 154; 308 и 614, антиген «ВНИИЗЖ G7» – 77; 154 и 308.

Исследования проводили на коммерческой птице кросса «Хайсекс Браун» разных возрастных групп общим количеством 140 голов. В экспериментах участвовали птицы в возрасте 1, 15, 30 и 70 суток. Каждую дозу антигена испытывали на отдельной возрастной группе из 10 голов птиц. Параллельно, в том же числе содержали контрольную группу, в которой вакцинацию не производили (интактная птица). В каждой группе до иммунизации и, далее через 7, 14, 21 и 28 суток после прививки, от птиц отбирали пробы сывороток крови для исследований в РТГА. В соответствии с инструкциями по применению реакции определяли титр антител к вирусам НБ и ГП. Вычисляли логарифмические среднегрупповые оценки ($\log_2 T$). Полученные результаты представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Динамика поствакцинальной гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» соответственно составляющим антигенам, возрастным группам птиц и иммунизирующим дозам

Даны среднегрупповые логарифмические оценки титров антител в РТГА (log ₂ T±s, где: m – стандартная ошибка среднего; n=10)						
Возраст птиц, сутки	Прививная доза, объем см ³ /ГАЕ	Сутки после вакцинации				
		0	7	14	21	28
1	2	3	4	5	6	7
Антиген вируса НВ штамма «Ла-Сота»						
1	0,25/ 154	6,9±0,5	5,5±0,3	6,4±0,2	7,7±0,2	8,8±0,2
	0,5/ 308		5,8±0,3	6,5±0,3	8,0±0,2	9,2±0,4
	Контроль		5,2±0,2	5,3±0,3	4,0±0,2	1,0±0,1
15	0,25/ 154	7,3±0,5	6,4±0,4	5,9±0,2	7,8±0,3	9,8±0,2
	0,5/ 308		6,8±0,3	5,5±0,4	7,4±0,4	9,5±0,1
	Контроль		6,3±0,3	5,9±0,3	4,8±0,2	4,7±0,2
30	0,25/ 154	6,4±0,4	5,9±0,2	6,2±0,2	6,5±0,2	7,6±0,2
	0,5/ 308		6,3±0,3	6,6±0,2	8,1±0,2	9,8±0,2
	1,0/ 616		6,1±0,4	6,5±0,2	8,1±0,2	9,3±0,2
	Контроль		6,1±0,3	5,6±0,2	4,1±0,3	3,4±0,2
70	0,25/ 154	5,8±0,4	5,7±0,4	5,8±0,2	6,6±0,2	6,9±0,3
	0,5/ 308		5,4±0,2	6,8±0,3	8,0±0,2	9,4±0,2
	1,0/ 616		5,9±0,4	6,4±0,2	8,3±0,2	9,5±0,5
	Контроль		5,6±0,2	4,4±0,2	3,6±0,4	3,4±0,3
Антиген вируса НВ штамма «ВНИЗЖ G7»						
1	0,25/ 77	5,4±0,2	4,4±0,4	3,7±0,3	7,3±0,3	7,9±0,2
	0,5/ 154		4,8±0,6	3,8±0,3	7,8±0,3	8,3±0,3
	Контроль		5,0±0,4	3,3±0,5	2,0±0,2	1,0±0,4

1	2	3	4	5	6	7
15	0,25/ 77	5,3±0,5	4,4±0,5	4,4±0,4	7,2±0,4	7,8±0,2
	0,5/ 154		4,8±0,4	4,2±0,3	7,2±0,4	7,6±0,3
	Контроль		4,3±0,3	3,5±0,3	3,3±0,2	2,7±0,2
30	0,25/ 77	5,0±0,4	3,9±0,5	4,6±0,2	4,9±0,2	4,3±0,3
	0,5/ 154		4,3±0,3	4,8±0,2	7,0±0,2	7,7±0,2
	1,0/ 308		4,2±0,4	4,7±0,2	7,3±0,2	7,4±0,1
	Контроль		4,1±0,3	4,0±0,5	3,1±0,3	1,4±0,6
70	0,25/ 77	4,6±0,5	3,5±0,3	4,6±0,1	5,7±0,2	4,2±0,3
	0,5/ 154		3,9±0,4	4,9±0,4	7,2±0,3	7,3±0,1
	1,0/ 308		4,1±0,5	5,9±0,3	7,5±0,1	7,1±0,2
	Контроль		3,6±0,2	2,4±0,2	1,6±0,4	0,4±0,5
Антиген вируса ГП Н9N2						
1	0,25/ 77	н/о	н/о	4,0±0,2	6,8±0,3	7,6±0,2
	0,5/ 154		н/о	4,5±0,2	6,6±0,3	7,6±0,2
	Контроль		н/о	н/о	н/о	н/о
15	0,25/ 77	н/о	н/о	3,9±0,4	6,5±0,1	7,7±0,2
	0,5/ 154		н/о	4,1±0,3	6,1±0,2	7,4±0,2
	Контроль		н/о	н/о	н/о	н/о
30	0,25/ 77	н/о	н/о	3,9±0,3	4,5±0,3	4,5±0,2
	0,5/ 154		н/о	4,3±0,3	6,4±0,1	7,5±0,1
	1,0/ 308		н/о	3,7±0,3	6,3±0,3	7,8±0,3
	Контроль		н/о	н/о	н/о	н/о
70	0,25/ 77	н/о	н/о	4,7±0,2	5,0±0,2	4,9±0,3
	0,5/ 154		н/о	4,0±0,3	6,6±0,3	6,7±0,2
	1,0/ 308		н/о	4,2±0,2	6,4±0,2	7,1±0,2
	Контроль		н/о	н/о	н/о	н/о

Из данных таблицы 26 следует:

- использованная в эксперименте коммерческая птица всех возрастов до вакцинации имела высокий уровень гуморального иммунитета против НБ, который монотонно снижался на протяжении 28 суток наблюдений. Средний относительный коэффициент регрессии титра антител составил $(-0,102) \log_2/\text{сутки}$. При этом для всех заданных условий (тип антигена, прививные дозы и возрастная группа), уровень предшествующего иммунитета птиц, очевидно, не влиял на развитие поствакцинальной иммунной реакции. В практическом аспекте это может означать, что антигенный эффект вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» не будет зависеть от напряженности трансовариального иммунитета, например, против НБ.

- наблюдаемая в течение эксперимента динамика иммунного ответа после семи суток от даты вакцинации, для всех заданных условий, соответствовала фазе развития иммунного ответа. В подавляющем большинстве случаев наибольшие титры антител были зафиксированы через 28 суток после вакцинации;

- величины титров антител для большинства заданных условий увеличивались с возрастанием дозы соответствующего антигена. При этом разница, как правило, была более выражена между дозами, содержащимися в инъекционных объемах 0,25 и 0,5 см³, чем между дозами в объемах 0,5 и 1,0 см³;

- достижение устойчивого поствакцинального протективного титра против вируса НБ ($5,0 \log_2$), учитывая регрессию титров в контроле, при всех условиях, в группе Ла-Сота наступало после 14 суток от даты прививки и после 21 суток в группе G7. Аналогичный показатель против вируса ГП ($4,0 \log_2$) в большинстве позиций имел место после 14 суток.

Результаты, приведенные в таблице 26, позволяют считать, что ассоциированная вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» может индуцировать гуморальную иммунную реакцию птицы против НБ и ГП при всех заданных условиях. Однако, в аспекте технологии (себестоимости препарата) оптимальными

целесообразно признать «средние» концентрации антигенов, а именно (ГАЕ/0,5 см³): «Ла-Сота» – 307; G7 – 154; ГП – 154. При этом устойчивые протективные титры антител ко всем антигенам следует ожидать в интервале от 14 до 21 суток после вакцинации. Таким образом, поскольку для возрастных групп 30 и 70 суток экспериментальная вакцина проявляет слабую антигенную активность в прививном объеме 0,25 см³, и является высокоиммуногенной по всем специфическим компонентам после введения в объеме 0,5 см³ и 1,0 см³, то представляется целесообразным выбрать рабочий прививной объем вакцины 0,5 см³ для птиц с 30-суточного возраста. При применении вакцины для возрастных групп 1-15 суток прививного объема 0,25 см³ достаточно для выработки минимально необходимого уровня антител.

Оценка продолжительности поствакцинального гуморального иммунитета после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Использовали образец вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», содержащий антигены (ГАЕ/0,5 см³): НБ «Ла-Сота» – 308; НБ «ВНИИЗЖ G7» – 154; ГП H9N2 – 308. Тест-объектами служили птицы кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 30 суток в количестве 30 голов, которых разделили на опытную (20 голов) и контрольную (10 голов) группы. Опытная группа птиц была вакцинирована. Вакцину вводили внутримышечно, в область груди, в объеме 0,5 см³. Контрольную группу не вакцинировали.

В опытных группах, с заданной периодичностью, через (сутки): 28, 90 (3 мес.), 180 (6 мес.), 270 (9 мес.) и 360 (12 мес.) отбирали пробы сыворотки крови для исследования в РТГА, где определяли титры антител к вирусу НБ с антигенами «Ла-Сота» и G7, а также к вирусу ГП с антигеном H9N2. Полученные результаты в графическом виде представлены на рисунке 15.

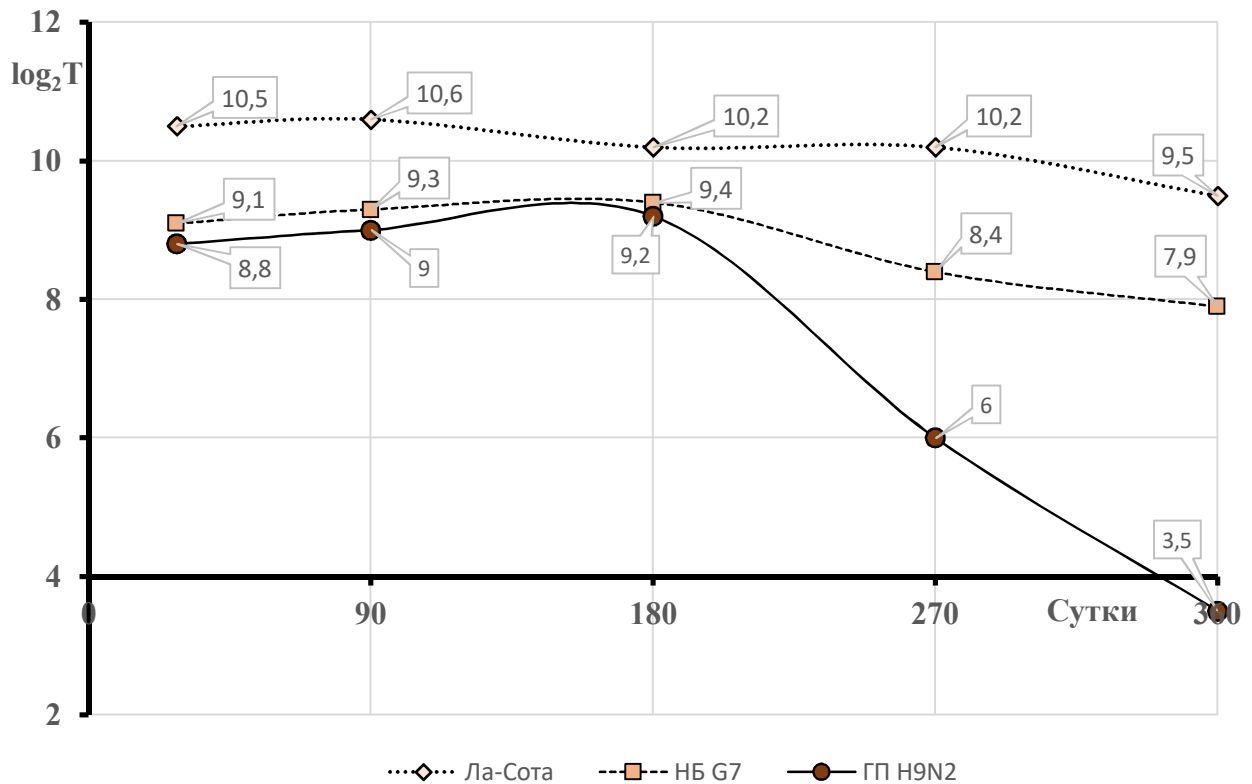


Рисунок 15 - Средние логарифмические титры антител ($\log_2 T$), установленные в РТГА соответственно антигенам: НБ Ла-Сота, НБ G7, ГП H9N2 и времени после иммунизации птиц (сут.) вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти». Горизонтальная ось координат построена из точки $\log_2 T=4$, которая соответствует нижней критической границе протективного титра антител к вирусу ГП. Значения стандартных отклонений по выборкам находились в границах диапазона $(0,15 \div 0,27) \log_2$. Оценки титров антител в контрольной группе за период эксперимента не достигали положительных величин в РТГА с антигенами НБ ($\log_2 T < 2,0$) и ГП ($\log_2 T < 2,0$).

Данные рисунка 15 демонстрируют, что в интервале от 28 до 180 суток после иммунизации для всех изученных антигенов наблюдали фазу стабилизации поствакцинальной гуморальной реакции. Титры антител, установленные через 180 суток ($\log_2 T$: 10,2 – НБ «Ла-Сота»; 9,4 – НБ «ВНИИЗЖ G7»; ГП H9N2 – 9,2), значительно превышали величины, обеспечивающие протективный эффект против НБ ($\log_2 T \geq 5,0$) и против ГП ($\log_2 T \geq 4,0$).

Исследования, проведенные через 270 суток, показали, что (при условии средней статистической неопределенности данных равной $\pm 0,31 \log_2$) оценки титров РТГА с антигеном НБ «Ла-Сота» не изменились, титр с антигеном НБ

«ВНИИЗЖ G7» снизился на 1 $\log_2$ (от 9,4 до 8,4, $p < 0.05$) и значительно сократился с антигеном ГП Н9Н2 (от 9,2 до 6,0, $p < 0.05$).

Полученные через 360 суток оценки титров антител соответственно антигенов составили ($\log_2$): НБ «Ла-Сота» - 9,5; НБ «ВНИИЗЖ G7» – 7,9; ГП Н9Н2 – 3,5.

Результаты проведенного эксперимента позволили сделать заключение, что срок, в течение которого тестируемая поливалентная вакцина способна индуцировать гуморальную иммунную реакцию всех составляющих валентностей на уровне, обеспечивающем протективный эффект, должен быть определен по наименее стабильному антигену. А именно, по антигену ГП Н9Н2. Указанная валентность в интервале от 270 до 360 суток после прививки понизила антигенное воздействие до средней оценки $\log_2 T = 3,5$, т. е. ниже границы протективного титра антител к вирусу ГП. На этом основании считали, что инактивированная эмульсионная вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» способна обеспечить протективный гуморальный иммунитет по всем составляющим валентностям в течение не менее 270 суток, т.е. девять месяцев от даты прививки.

***Определение безвредности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»,
примененной в повышенной дозе***

Для выполнения поставленной цели необходимо выполнить следующие задачи: образец экспериментальной серии вакцины в двукратном прививном объеме привить птицам разных возрастных групп различными способами (внутримышечно и подкожно); в течение 21 суток провести клинические наблюдения за привитой птицей; путем патологоанатомического осмотра оценить степень воздействия экспериментального препарата на ткани птицы в точке инъекции.

В исследовании использовали кур кросса «Хайсекс Браун» 30, 80 и 120-суточного возраста в количестве 60 голов, группы из которых разделили ещё на две подгруппы по 10 голов в каждой.

Птицам подкожно и внутримышечно вводили экспериментальный образец инаktivированной вакцины в двукратной дозе в прививном объёме 1,0 см³. В течение 21 суток за ними проводили клинические наблюдения на предмет выявления изменений в общем состоянии (угнетение, отказ от корма, диарея) и наличия припухлостей в местах введения вакцины.

По истечении срока наблюдений провели диагностический убой птиц и патологоанатомический осмотр точек введения препарата и окружающих тканей на наличие в них патизменений (гиперемия, отёки, некрозы, экссудация, инкапсуляции, присутствие изменённой или неизменённой эмульсии). Вакцину считали ареактогенной и безвредной, если не наблюдали описанные прижизненные или посмертные явления. Оценку реактогенного воздействия вакцины на ткани проводили по следующим критериям:

- лёгкие поражения: побледнение тканей, окружающих место инъекции, на площади до 1 см в диаметре, отсутствие признаков воспаления;
- средние поражения: зона воспалительной реакции тканей, проявляющаяся их отёчностью, побледнением или гиперемией имеет размеры от 1 до 2 см в диаметре, присутствие диффузно расположенной вакцины;
- сильные поражения: очаг воспаления тканей с вовлечением глубоких и поверхностных мышц и образованием гранулём составляет в диаметре от 3 до 4 см, вакцина вытекает на разрезе или присутствует в тканях в виде белого творожистого вещества.

Клинические наблюдения за птицами, привитыми двукратным объёмом инаktivированной вакцины различными способами, не выявили каких-либо изменений в поведении и общем состоянии – птицы были активными, снижение аппетита не было. Патологоанатомический осмотр мест введения вакцины также не выявил каких-либо патизменений в тканях в области инъекции.

Таким образом, вакцина против ньюкаслской болезни (G7 и «Ла-Сота») и гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) ассоциированная инаktivированная эмульсионная

«ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» при применении в повышенной дозе ареактогенна и безвредна для птиц как после подкожного, так и после внутримышечного введения.

Изучение стабильности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в течение срока годности

В рамках поставленной цели были выполнены следующие задачи: определено соответствие оценочных показателей трех серий вакцины нормативам проекта СТО 00495527-0468 на момент изготовления и через 3, 6, 9, 12 и 18 месяцев хранения в защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C; на основании полученных данных определили допустимый срок хранения препарата.

Изучение стабильности препарата было проведено на трех экспериментальных сериях вакцины против ньюкаслской болезни и гриппа птиц H9N2 ассоциированной инактивированной эмульсионной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»: серия №010322 (дата выпуска 03.2022г.) расфасована в пластиковые флаконы по 100 см³/200 доз, серия №020322 (дата выпуска 03.2022г.) расфасована в пластиковые флаконы по 200 см³/400 доз и серия № 030322 (дата выпуска 03.2022г.), расфасована в пластиковые флаконы по 500 см³/1000 доз. В испытаниях использовали птицу кросса «Хайсекс Браун» суточного и 60-суточного возраста.

Результаты испытаний трёх серий вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» по показателям, указанным в проекте СТО00495527-0468 в течение 18 месяцев при условии хранения от 2°C до 8°C, представлены в таблице 27. Контрольными точками, согласно ОФС.1.1.0009 (ГФ XV), были 0, 3, 6, 9, 12 и 18 месяцев хранения препарата. При проведении испытаний антигенной активности экспериментальных серий вакцины оценочными показателями были величины поствакцинальных титров антител к вирусам ГП и НБ. На каждом временном отрезке до начала испытаний от птицы отбирали кровь для исследований в соответствующих диагностических тест-системах сывороток крови с целью подтверждения отсутствия антител к вирусам ГП и НБ.

Таблица 27 - Оценка стабильности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» по антигенной активности соответственно времени хранения (сут.) и испытанным сериям

Первичные данные титров антител (Т) к вирусу гриппа птиц (Н5), установленных в РТГА в сыворотках крови птиц, иммунизированных вакциной против гриппа птиц Н5, соответственно интервалу времени хранения вакцины (L, сутки).				
Результаты РТГА ($\log_2$ "Т$\pm$s")* к вирусу				
L,сут	n**	НБ «Ла-Сота»	НБ «ВНИИЗЖ G7»	Гриппа птиц Н9
Серия 010322				
28	10	9,5 $\pm$ 0,46	9,7 $\pm$ 0,43	9,1 $\pm$ 0,37
90	10	9,7 $\pm$ 0,37	9,6 $\pm$ 0,46	8,8 $\pm$ 0,40
180	10	9,5 $\pm$ 0,50	9,6 $\pm$ 0,37	9,0 $\pm$ 0,43
270	10	9,4 $\pm$ 0,48	8,9 $\pm$ 0,53	9,1 $\pm$ 0,50
360	10	9,2 $\pm$ 0,36	9,3 $\pm$ 0,45	8,9 $\pm$ 0,37
540	10	9,1 $\pm$ 0,46	9,2 $\pm$ 0,37	8,8 $\pm$ 0,50
Серия 020322				
30	10	9,7 $\pm$ 0,37	9,8 $\pm$ 0,52	8,7 $\pm$ 0,46
90	10	9,5 $\pm$ 0,49	9,6 $\pm$ 0,48	9,1 $\pm$ 0,39
180	10	9,4 $\pm$ 0,46	9,6 $\pm$ 0,39	8,8 $\pm$ 0,40
270	10	9,5 $\pm$ 0,50	9,4 $\pm$ 0,47	8,7 $\pm$ 0,43
360	10	9,4 $\pm$ 0,53	9,3 $\pm$ 0,46	8,6 $\pm$ 0,50
540	10	9,2 $\pm$ 0,46	8,9 $\pm$ 0,40	8,5 $\pm$ 0,48
Серия 030322				
28	10	9,9 $\pm$ 0,47	10,2 $\pm$ 0,53	9,3 $\pm$ 0,37
90	10	10,0 $\pm$ 0,49	10,1 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 0,46
180	10	9,8 $\pm$ 0,53	9,9 $\pm$ 0,47	9,6 $\pm$ 0,53
270	10	9,6 $\pm$ 0,46	9,8 $\pm$ 0,37	9,4 $\pm$ 0,46
360	10	9,4 $\pm$ 0,50	9,5 $\pm$ 0,43	9,3 $\pm$ 0,45
540	10	9,4 $\pm$ 0,37	9,6 $\pm$ 0,40	9,3 $\pm$ 0,36

Примечания:

* - дано среднее логарифмическое значение и стандартная ошибка измерения;

** - число исследованных проб.

Контрольными точками, согласно ОФС.1.1.0009 ГФ XV [18], были 0, 3, 6, 9, 12 и 18 месяцев хранения препарата. При проведении испытаний антигенной активности экспериментальных серий вакцины оценочными показателями были величины поствакцинальных титров антител к вирусам ГП и НБ. На каждом временном отрезке до начала испытаний от птицы отбирали кровь для

исследований в соответствующих диагностических тест-системах сывороток крови с целью подтверждения отсутствия антител к вирусам ГП и НБ.

Было установлено, что на всех контрольных точках в испытуемых группах у птицы через 28 суток после прививки экспериментальными сериями вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» наблюдали индукцию антител на входящие в состав препарата антигены. Иммунитет у птицы считали напряженным, поскольку титры антител к соответствующим возбудителям были на достаточно высоком уровне. В ходе проведенных испытаний было установлено, что внешний вид, цвет вакцины, стабильность эмульсии, вязкость не изменялись, серии препарата были стерильны, безвредны и антигенно активными.

В течение 18 месяцев при соблюдении условий хранения (в защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C) вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» сохраняет свою антигенную активность, т.е. остается стабильной. Показатели качества по проекту СТО 00495527-0468 меняются не существенно и находятся в границах нормативов. На этом основании приняли, что сроком годности следует считать период 18 месяцев.

3.2.3.2.2 Клинические испытания вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в производственных условиях

Проведение клинических испытаний вакцин является основным этапом при разработке лекарственных средств и является неотъемлемым элементом системы регистрации вакцин.

Клинические исследования лекарственных препаратов для ветеринарного применения проводятся в ветеринарных организациях и в организациях, осуществляющих разведение, выращивание и содержание животных, в целях:

- 1) установления переносимости лекарственных препаратов здоровыми животными;
- 2) подбора оптимальных дозировок лекарственных препаратов и курса лечения на конкретной группе животных с определенным заболеванием;

3) установления безопасности и эффективности лекарственного препарата, предназначенного для лечения определенных заболеваний животных, или эффективности лекарственного препарата для профилактики заболеваний здоровых животных;

4) изучения возможностей расширения показаний к применению зарегистрированного лекарственного препарата и выявления ранее неизвестных побочных действий.

Для проведения клинических испытаний использовали вакцину против ньюкаслской болезни и гриппа птиц H9N2 ассоциированную инаktivированную эмульсионную «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», серии 010523 (дата изготовления 05.2023), расфасованную по 200 см³/400 доз, срок годности 18 месяцев.

В исследовании использовали птиц ремонтного молодняка родительского стада кросса «Ross-308» 43-45-суточного возраста в количестве 120 154 голов. Птиц содержали в корпусах хозяйства в производственных условиях ЦРМ «Бутырки-1» липецкого филиала АО «Куриное царство» (АО «КЦ») ГК «Черкизово». Все птицы, используемые в исследованиях были здоровыми, содержание обеспечено согласно санитарно-гигиеническим нормативам и нормам кормления данной возрастной группы. Уход и все процедуры проводились с соблюдением гуманных мер обращения с животными.

Птице внутримышечно вводили инаktivированную вакцину «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в прививном объёме – 0,5 см³. Для оценки ареактогенности и безвредности за привитыми птицами в течение 21 суток вели клинические наблюдения на предмет выявления изменений в общем состоянии (угнетение, отказ от корма, диарея) и наличия припухлостей в местах введения вакцины.

Для оценки антигенной активности вакцины у привитой птицы отбирали пробы крови до иммунизации и через 28 суток после иммунизации, которые исследовали на наличие антител к вирусам НБ и ГП Н9 согласно инструкции по применению соответствующего набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Вакцинацию считали успешной, если после неё не менее чем у 80% привитых

цыпляют титр антител к вирусам гриппа птиц Н9 и ньюкаслской болезни составлял не ниже $4 \log_2$ и $5 \log_2$ в РТГА соответственно.

Для оценки сохранности птиц, привитых экспериментальной вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» после вакцинации вели контроль сохранности стада, величина которого должна составлять не менее 95%.

По результатам проведенных производственных испытаний ассоциированной вакцины против ньюкаслской болезни и низкопатогенного гриппа птиц Н9Н2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» на протяжении 21 суток после вакцинации у привитых птиц не наблюдали какие-либо изменения в клиническом состоянии и воспалительные реакции в местах введения препарата. Вакцина показала себя безвредной для кур 43-45-суточного возраста.

Напряжённость иммунитета у птиц исследовали через 28 суток после вакцинации. По результатам исследований напряжённость иммунитета после применения вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» на птицах в промышленных условиях к вирусам гриппа птиц Н9 и болезни Ньюкасла составляла не менее 99% согласно данным, представленным в таблицах 28-29.

Таблица 28 – Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни в сыворотках крови кур ЦРМ «Бутырки-1» после применения вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Цех №	Количество положительных проб сывороток в РТГА соответственно их разведениям											
	Кол-во	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	$T \pm s \log_2$
9	20				5	8	5	1	1			$7,25 \pm 0,24^*$
10	20	1	3	5	3	1	4	1	1	1		$6,35 \pm 0,49$
11	20		1	1			6	10		2		$8,45 \pm 0,36$
3	20					1	6	4	4	5		$9,30 \pm 0,29$
6	20				2	1	1	3	5	6	2	$9,70 \pm 0,40$
9	20						4	3	2	7	4	$10,20 \pm 0,33$
10	20						3	4	9	3	1	$9,75 \pm 0,24$
11	20						1	4	8	5	2	$10,15 \pm 0,23$

Примечание: * - дано среднее логарифмическое значение и стандартная ошибка измерения.

Таблица 29 - Титры антител к вирусу гриппа птиц Н9 в сыворотках крови кур ЦРМ «Бутырки-1» после применения вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Цех №	Количество положительных проб сывороток в РТГА соответственно их разведениям											
	Кол-во	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	T±s log ₂
9	20			1	4	6	2	3	4			6,70±0,36
10	20	1	1	4	2	4	1	1	5	1		6,25±0,53
11	20			1	5	5	4	3	1	1		6,50±0,34
3	20					1	3	1	7	8		8,90±0,28
6	20							3	8	5	4	9,50±0,22
9	20						1	3	7	7	2	9,30±0,23
10	20							1	9	9	1	9,50±0,15
11	20						3	2	4	6	5	9,40±0,31

Примечание: * - дано среднее логарифмическое значение и стандартная ошибка измерения.

Результаты оценки сохранности привитого поголовья вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в промышленных условиях птицефабрики представлены в таблице 30.

Таблица 30 - Сохранность птицы ЦРМ «Бутырки-1» после применения вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Период	12 июля 2023 г. по 26 сентября 2023 г.			
Партия	Сохранность на начало периода, %		Сохранность на конец периода, %	
	Норматив	Факт	Норматив	Факт
1	98,6	99,37	97,4	98,12
2	98,6	99,52	97,4	98,38
3	98,6	99,65	97,4	98,59
Цех 11	97,6	98,61	96,4	96,6
Цех 10	97,6	98,71	96,4	96,5

По результатам производственных испытаний было сделано заключение, что применение вакцины ассоциированной инактивированной эмульсионной

«ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» согласно Инструкции по применению в прививной дозе оказало положительное влияние на показатели сохранности иммунизированного поголовья птиц.

Результаты испытаний, проведенные в ЦРМ «Бутырки-1» липецкого филиала АО «КЦ», показали, что вакцина, примененная согласно инструкции в прививной дозе, безвредна и ареактогенна для птицы. Препарат, применённый согласно проекту Инструкции, обладает высокой антигенной активностью, оказывает положительное влияние на сохранность и продуктивность привитого поголовья. В ходе испытаний в условиях птицеводческого предприятия было доказано, что целевые животные (куры) хорошо переносят экспериментальную вакцину в рекомендуемом прививном объёме 0,5 см³, который вызывает образование напряжённого иммунитета к вирусам НБ и ГП Н9.

По результатам проведенных клинических испытаний экспериментальная инактивированная вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» была признана безопасной и эффективной.

В результате проведенных доклинических и клинических исследований был сформирован комплект регистрационного досье СТО 00495527-0468-2024 «Вакцина против ньюкаслской болезни (G7 и «Ла-Сота») и гриппа птиц Н9Н2 (Y280 и G1) ассоциированная инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»» и был зарегистрирован вышеуказанный препарат 06.02.2024 г.

3.2.3.3 Разработка полиштаммной вакцины против ньюкаслской болезни («Ла-Сота» и G7) «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» инактивированной эмульсионной

Для обеспечения птицефабрик Российской Федерации высокоэффективными средствами профилактики против актуального вируса болезни Ньюкасла генотипа VII L с учетом того, что в стране имеются хозяйства не применяющие вакцинацию

против низкопатогенного гриппа птиц H9N2, которым не подходит ранее разработанный препарат «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», практически параллельно была разработана полиштаммная вакцина («Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7») против болезни Ньюкасла инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти».

3.2.3.3.1 Доклинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Обоснование оптимального компонентного состава вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

В эксперименте использовали антигены вируса НБ штамм «ВНИИЗЖ G7» и штамма «Ла-Сота» с активностью в РГА и титром инфекционной активности до инактивации $8 \log_2$ ГАЕ/0,1см³ и $9,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно и $10 \log_2$ ГАЕ/0,1см³, и $10,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно.

Было приготовлено три образца вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» с заданными объемными долями антигенов НБ «ВНИИЗЖ G7» (далее по тексту «НБ G7») и НБ «Ла-Сота» (НБ Ла-Сота): 30:70; 50:50 и 70:30, соответственно. Антигенные смеси объединяли с масляным адъювантом в весовом соотношении 30:70 и эмульгировали.

Образцы вакцины испытывали на птице кросса «Хайсекс Браун» 50-суточного возраста. До начала эксперимента у 10 голов птицы отобрали кровь для исследований сывороток в РТГА на наличие антител к вирусу НБ соответственно штаммам. Установили, что средний титр антител к штамму «Ла-Сота» составил $T_{\pm s}=4,3 \pm 0,2 \log_2$, к штамму «ВНИИЗЖ G7» - $T_{\pm s}=1,8 \pm 0,3 \log_2$ в РТГА.

Было сформировано три опытных и контрольная группы птиц по 10 голов в каждой. Птицу опытных групп иммунизировали вакциной в прививном объеме (0,5 см³), соответственно номеру образца препарата, контрольная группа оставалась интактной. Через 28 суток в РТГА оценивали титры антител к испытанным антигенам. Полученные результаты приведены в таблице 31.

Таблица 31 - Активность сывороток в РТГА соответственно пропорции антигенных компонентов, входящих в состав экспериментальных образцов вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Номер группы	Соотношение антигенов НБ G7 : НБ Ла-Сота		Средние титры антител (Т, log ₂) и их стандартные ошибки (±s) к соответствующим антигенам вирусов	
	Объемные %	ГАЕ	НБ G7	НБ «Ла-Сота»
1	30:70	115:1075	7,0±0,37	10,6±0,48
2	50:50	192:768	8,4±0,34	9,9±0,55
3	70:30	269:461	8,9±0,28	9,0±0,37
Контроль	-		1,3±0,37	1,7±0,21

Примечание: * - не обнаружено

Из данных таблицы 31 следует, что на 28 сутки после прививки во всех опытных группах у птицы сформировался напряженный иммунитет, индуцированный антигенами, включенными в состав испытуемых образцов. Диапазон среднегрупповых титров к штамму «ВНИИЗЖ G7» составил от 7,0 до 8,9 log₂, к штамму «Ла-Сота» - от 9,0 до 10,6 log₂. При этом имела место тенденция, что увеличением доли антигена величина титров антител возрастала. Превышение доли антигена в 2,3 раза усиливало индукцию антител в 3,0 и 3,7 раза к штаммам «Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7», соответственно.

Для определения достоверности различий среди полученных значений титров антител к каждому из антигенов провели статистический анализ по Шеффе, представленный в таблице 32.

Сравнительный анализ средних значений титров к штамму «Ла-Сота» не показал значимых отличий полученных величин. Относительно штамма «ВНИИЗЖ G7» следует сказать, что в группе №1, где доля антигена была минимальной (30%), концентрация поствакцинальных титров была достоверно ниже относительно других групп.

Таблица 32 – Сопоставление средних логарифмических титров антител ($\log_2 T$), установленных соответственно вирусных антигенов, входящих в состав испытуемых образцов вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Статистические коэффициенты (F)** для данной пары сопоставляемых значений $\lg T$ к вирусу НБ штамма «ВНИИЗЖ G7»				
Номер группы	$\lg T(Q; n)$	$\lg T$		
		7,0 (1)*	8,4 (2)	8,9 (3)
1	7,0 (12,0; 10)	-	-	-
2	8,4 (10,4; 10)	4,52		
3	8,9 (6,9; 10)	8,32	0,58	
Статистические коэффициенты (F)** для данной пары сопоставляемых значений $\lg T$ к вирусу НБ штамма «Ла-Сота»				
Номер группы	$\lg T(Q; n)$	$\lg T$		
		10,2 (3)*	9,3 (2)	9,1 (1)
3	9,0 (12,0; 10)			
2	9,9 (26,9; 10)	0,92		
1	10,61 (20,4; 10)	2,91	0,56	

Примечания:

- * В скобках указан номер группы, соответствующий испытанному образцу вакцины;
- ** Использовали метод Шеффе, где $F_{1,2} = (\lg T_1 - \lg T_2)^2 / (D/n_1 + D/n_2)$, $D = ((\Sigma Q) \times (k-1)) / (\Sigma n - k)$; Q – сумма квадратов отклонений выборки; n – число элементов в выборке; k – число выборок;
- *** - жирным шрифтом выделены ячейки с коэффициентами, для которых выполняется неравенство $F \geq F_{p=0,05} = 3,35$, где F_p – критериальный коэффициент Фишера соответственно заданного уровня p для $v_1 = k-1$ и $v_2 = \Sigma n - k$.

Обобщая полученные результаты пришли к заключению, что оптимальным соотношением антигенов НБ «ВНИИЗЖ G7»: НБ «Ла-Сота» в вакцине «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» следует считать 70:30. При этом исходная гемагглютинирующая активность штаммов НБ «ВНИИЗЖ G7» и НБ «Ла-Сота» должна составлять не менее 8 и 9,25 ГАЕ/0,1 см³, соответственно.

Выбор способа введения вакцины против ньюкаслской болезни инактивированной эмульсионной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

В исследовании использовали кур кросса «Хайсекс Браун» 80-суточного возраста в количестве 30 голов. Птицу случайным образом разделили на группы: две опытных по 10 гол (№1 и №2) и контрольную - 10 гол (№3).

Разделенную случайным образом птицу групп № 1 и №2 подвергали иммунизации образцом вакцины экспериментальной серии 010322 от 03.2022 г. Группу №1 прививали при помощи шприцев однократного применения подкожно, в область средней трети шеи, однократно. Группу № 2 прививали внутримышечно, в грудную мышцу, также однократно. Прививной объём для обоих способов введения препарата составлял 0,5 см³. Группа №3 в продолжение всего эксперимента оставалась интактной (контроль).

Определяли среднегрупповые значения титров антител к соответствующим антигенам вирусов на 14 сутки и 28 сутки после вакцинации. Результаты представлены в таблице 33.

Таблица 33 - Антигенная активность компонентов НБ в составе вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» в зависимости от способа введения и в соответствии с периодичностью отбора проб крови

Наименование группы	Титр антител до вакцинации	Титр антител после вакцинации	
		через 14 суток	через 28 суток
НБ (штамм «Ла-Сота»)			
Группа №1 (подкожно)	5,3±0,2	7,3±0,3	9,0±0,2
Группа №2 (внутримышечно)		7,4±0,3	9,3±0,2
Группа №3 (контроль)		4,2±0,3	3,3±0,4
НБ (штамм «ВНИИЗЖ G7»)			
Группа №1 (подкожно)	3,8±0,4	5,2±0,1	8,0±0,3
Группа №2 (внутримышечно)		5,0±0,2	8,3±0,1
Группа №3 (контроль)		2,2±0,3	1,4±0,4

Примечание: * - дано среднее логарифмическое значение и стандартная ошибка измерения.

Результаты эксперимента показали, что при обоих способах введения препарата организм птицы реагирует достаточно высоким иммунным ответом на все антигены, входящие в состав инактивированной вакцины: во всех опытных группах к 14-ым суткам наблюдений титр антител к штамму «Ла-Сота» вируса НБ была значительно выше минимальных значений, установленных требованиями

НТД. Титры антител к вирусу НБ 7-го генотипа также проявились в этот срок и составляли минимальный требуемый уровень.

К следующему зачетному периоду (28 суток наблюдений) концентрация антител в группах №1 и №2 нарастала, при этом в контрольной группе прирост антител не наблюдали. Средние значения титров антител к каждому из антигенов между группами различались не значительно. Проведенные испытания показали, что подкожный и внутримышечный способы введения препарата в организм птицы являются равнозначными. Титры антител на каждый конкретный антиген в организме птицы к 28 суткам при подкожном и внутримышечном способах введения были тождественными.

Динамика поствакцинальной гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюМульти»

Изучали развитие иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюМульти» соответственно возраста птицы при условии двукратной вариации прививных доз составляющих антигенов вируса НБ штаммов «Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7». Содержание антигенов в исходных суспензиях составляло ($\log_2$ ГАЕ/0,1): «Ла-Сота» - 10 и «ВНИИЗЖ G7» – 8. На основании результатов ранее проведенных исследований (см. раздел 3.2.3.3.1.1) оптимальная концентрация указанных антигенов в водной фракции эмульсионной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюМульти» соответствовала (ГАЕ/0,5 см³): «Ла-Сота» - 461 и «ВНИИЗЖ G7» – 269. Иммунизирующую дозу антигена регулировали величиной прививного объема вакцины. Испытывали объемы (см³): 0,25; 0,5 и 1,0. Таким образом антигены исследовали в дозах (ГАЕ): Ла-Сота – 230, 461 и 924; G7 – 134, 269 и 538.

Исследования проводили на коммерческой птице кросса «Хайсекс Браун» разных возрастных групп (1, 15, 30 и 70 суток) общим количеством 140 голов. План эксперимента был полностью аналогичен испытаниям вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюМульти» (см. раздел 3.2.3.2.1).

Результирующими показателями были логарифмические среднегрупповые оценки ($\log_2 T$). Полученные результаты представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Динамика поствакцинальной гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» соответствующим составляющим антигенам, возрастным группам птиц и иммунизирующим дозам

Даны среднегрупповые логарифмические оценки титров антител в РТГА (log ₂ T±s)						
Возраст вакцинации, суток	Прививная доза, см ³ /ГАЕ	Сутки после вакцинации				
		До вакц.	7	14	21	28
Антиген вируса НБ штамма «Ла-Сота»						
1	0,25/ 230	6,3±0,3	5,3±0,1	6,5±0,2	7,1±0,2	8,4±0,2
	0,5/ 461		5,2±0,2	6,3±0,3	7,4±0,3	8,7±0,3
	Контроль		5,2±0,2	5,1±0,2	4,3±0,1	1,0±0,1
15	0,25/ 230	5,8±0,3	6,1±0,3	5,6±0,2	8,0±0,2	9,3±0,2
	0,5/ 461		6,2±0,2	5,5±0,1	7,9±0,2	9,4±0,3
	Контроль		5,7±0,2	4,6±0,2	4,3±0,2	1,1±0,3
30	0,25/ 230	5,5±0,2	5,4±0,3	6,2±0,2	6,4±0,3	7,2±0,1
	0,5/ 461		5,8±0,2	6,5±0,1	7,8±0,1	9,4±0,2
	1,0/ 922		6,1±0,4	6,0±0,2	7,9±0,2	9,3±0,3
	Контроль		6,1±0,3	4,6±0,2	4,1±0,3	2,6±0,3
70	0,25/ 230	5,0±0,3	5,8±0,2	5,4±0,2	6,6±0,2	6,6±0,2
	0,5/ 461		5,3±0,2	5,6±0,3	8,4±0,2	9,2±0,2
	1,0/ 922		5,9±0,4	5,8±0,2	8,3±0,2	9,1±0,2
	Контроль		5,4±0,2	4,1±0,3	3,3±0,3	1,5±0,3
Антиген вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ G7»						
1	0,25/134	4,4±0,3	5,3±0,1	3,6±0,2	6,6±0,2	7,6±0,3
	0,5/ 269		5,2±0,2	3,3±0,3	7,2±0,2	8,4±0,2
	Контроль		3,8±0,2	3,1±0,2	2,5±0,1	1,0±0,3
15	0,25/134	3,6±0,4	6,1±0,3	4,3±0,1	6,6±0,2	7,5±0,3
	0,5/ 269		6,2±0,2	4,5±0,2	6,7±0,1	7,3±0,1
	Контроль		3,7±0,4	2,6±0,2	2,3±0,2	0,8±0,5
30	0,25/134	3,5±0,6	5,4±0,3	4,5±0,2	5,0±0,2	7,2±0,1
	0,5/ 269		5,8±0,2	4,2±0,2	6,6±0,2	9,4±0,2
	1,0/ 538		6,1±0,4	4,7±0,2	6,9±0,2	9,3±0,3
	Контроль		3,1±0,4	3,8±0,2	2,1±0,3	1,4±0,3
70	0,25/134	3,8±0,3	5,8±0,2	4,6±0,1	5,2±0,3	6,4±0,3
	0,5/ 269		5,3±0,2	5,0±0,1	6,7±0,1	7,0±0,1
	1,0/ 538		5,9±0,4	5,2±0,3	7,5±0,1	7,1±0,2
	Контроль		3,4±0,2	2,3±0,5	1,8±0,3	0,5±0,3

Данные таблицы 34 демонстрируют следующее:

- коммерческие птицы, которые были использованы в эксперименте, до вакцинации обладали гуморальным иммунитетом против НБ различной напряженности, который, очевидно, не оказал влияния на развитие поствакцинальной иммунной реакции. Это означало, что антигенное действие вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», по обеим составляющим валентностям, не должно зависеть от напряженности предшествующего (например, трансовариального) иммунитета, против НБ;

- для всех заданных условий (тип антигена, прививные дозы и возрастная группа птиц) наибольшая напряженность поствакцинального иммунитета соответствовала 28 суткам после вакцинации, т. е. величины $\log_2 T_{28}$ были максимальными. В подавляющем большинстве значения $\log_2 T_{21}$ и $\log_2 T_{28}$, установленные для данных условий, статистически ($p < 0,05$) различались, т. е. развитие поствакцинальной иммунной реакции продолжалось в течение всего срока наблюдений;

- практически для всех условий величина антигена в прививной дозе положительно влияла на уровень иммунного ответа птицы. Относительное увеличение значений $\log_2 T$, было более выражено между дозами, содержащимися в инъекционных объемах 0,25 и 0,5 см³, чем между дозами в объемах 0,5 и 1,0 см³;

- для антигена «Ла-Сота» поствакцинальный протективный титр антител к вирусу НБ ($5,0 \log_2$) имел место, начиная с 7 суток после вакцинации (возможно в совокупности с предшествующими антителами). При этом, для антигена «ВНИИЗЖ G7», при большинстве заданных условий, достижение указанной величины наступало через 14 суток после прививки;

Результаты, представленные в таблице 39, демонстрировали, что вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», при всех испытанных условиях, через 14 суток после прививки создавала у птиц гуморальный иммунитет против НБ на протективном уровне. Однако, учитывая себестоимость препарата, «средние» концентрации антигенов в составе вакцины, функционально, были оптимальными.

А именно, (ГАЕ/0,5 см³): «Ла-Сота» – 461; G7 – 261. При этом устойчивые протективные титры антител к обоим антигенам следует ожидать в интервале от 14 до 21 суток после вакцинации. При применении вакцины для возрастных групп 1-15 суток прививного объема 0,25 см³ достаточно для защиты птицы.

Оценка продолжительности поствакцинального гуморального иммунитета после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Использовали образец вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», содержащий антигены штаммов НБ: «Ла-Сота» и G7. Концентрация указанных антигенов в водной фракции эмульсионной вакцины составляла (ГАЕ/0,5 см³): «Ла-Сота» - 461 и G7 – 261. Эксперимент проводили на птицах кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 30 суток в количестве 30 голов, которых разделили на опытную (20 голов) и контрольную (10 голов) группы. Опытной группе птиц вакцину вводили внутримышечно, в область груди, в объеме 0,5 см³. Контрольную группу не вакцинировали.

В обеих группах, с заданной периодичностью, через (сутки): 28, 90, 180, 270 и 360 отбирали пробы сыворотки крови для исследования в РТГА, где определяли титры антител к вирусу НБ с антигенами «Ла-Сота» и G7. Полученные результаты в графическом виде представлены на рисунке 16.

Приведенные на рисунке 16 графики демонстрируют, что в интервале от 28 до 180 суток (6 мес.) после иммунизации среднегрупповые титры антител, установленные для обоих антигенов, соответствовали фазе стабилизации иммунного ответа птиц. При этом на 180-е сутки значения $\log_2 T$ (9,2 – Ла-Сота и 8,4 – G7) существенно превышали величину, обеспечивающую протективный эффект против НБ ($\log_2 T_{\text{prot}} = 5,0$)

Далее, в интервале 180 ÷ 360 суток происходило монотонное снижение значений титров, которое было более выражено для антигена G7. На 360-е сутки (конец испытаний) оценки $\log_2 T$ составили: 8,4 – Ла-Сота и 7,1 – G7. Однако, оба

указанных значения были достоверно ($p < 0,05$) выше величины протективного титра.

Оценки титров антител в контрольной группе за период эксперимента не достигали положительных величин в РТГА с антигенами НБ ($\log_2 T < 2,0$). Значения стандартных отклонений по выборкам $\log_2 T$ в опытных группах находились в границах диапазона $(0,17 \div 0,29) \log_2$.

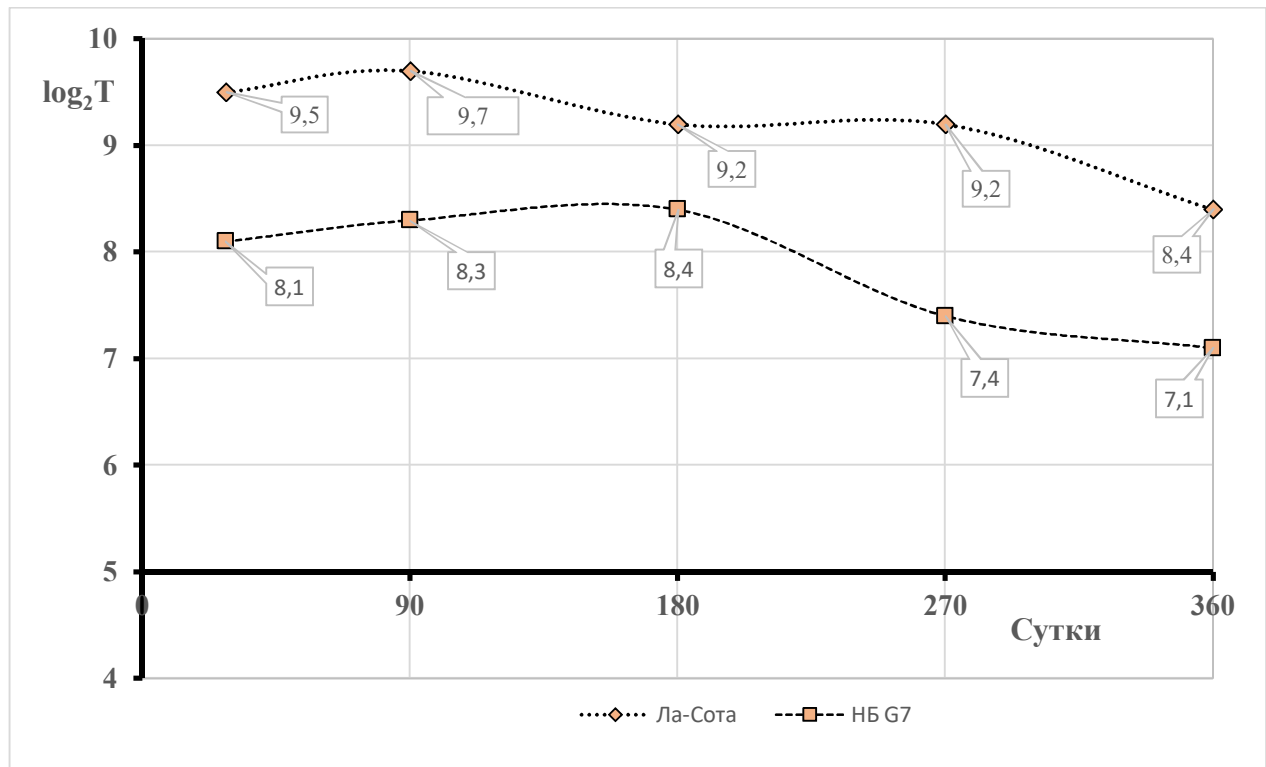


Рисунок 16 - Средние логарифмические титры антител ($\log_2 T$), установленные в РТГА соответственно антигенам НБ Ла-Сота и НБ G7, а также - времени после иммунизации птиц (Сут) вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти». Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке $\log_2 T_{\text{prot}} = 5$, которая соответствует границе протективного титра антител к вирусу НБ.

Исследовали возможность прогноза антигенного действия вакцины вне эмпирического диапазона и определения ожидаемого времени сохранения титра антител до протективного уровня. Для антигена G7 (как менее активного) изучали зависимость между величиной $\log_2 T$ и сутками после иммунизации. В диапазоне $90 \div 360$ суток строили модель регрессии $\log_2 T$ по суткам. Установили, что наиболее адекватной ($R^2 = 0,920$) оказалась модель вида: $Y = (-6,402)x^2 + 26,642x - 19,287$, где: $Y = \log_2 T$; $x = \lg(\text{Сут})$. Эмпирическое стандартное отклонение Y по линии регрессии

составило величину $\pm S_{XY} \approx 0,23(\log_2)$. Модель была использована для вычисления ожидаемого времени сохранения величины протективного титра по нижней границе условного доверительного интервала регрессии ($p \approx 0,05$) вида: $Y - 2S_{XY}$. Полученные результаты в графическом виде представлены на рисунке 17.

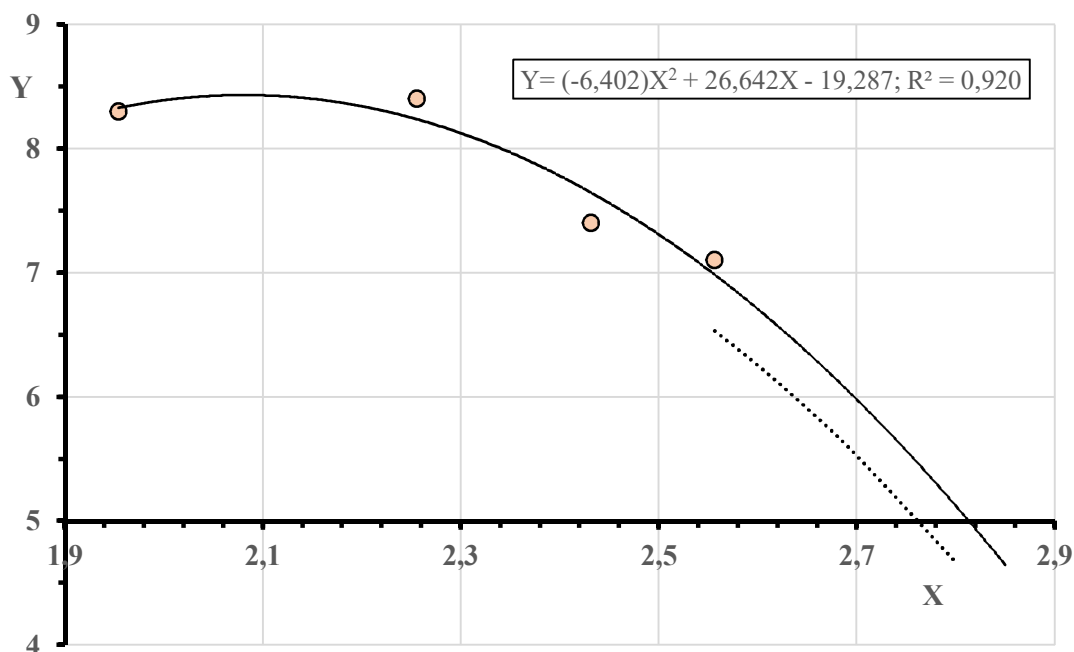


Рисунок 17 - Зависимость величины средних логарифмических титров поствакцинальных антител ($Y = \log_2 T$) к вирусу НБ от времени ($X = \lg Cyt$) после иммунизации птиц вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» по антигену G7.

Показаны эмпирические значения титров $Y = \log_2 T$ (о) и линия их ожидаемой регрессии по уравнению $Y = (-6,402)X^2 + 26,642X - 19,287$, которое имеет коэффициент адекватности $R^2 = 0,920$. Пунктиром представлен фрагмент нижней границы условного доверительного интервала регрессии ($p \approx 0,05$) вида: $Y - 2S$, где S – стандартное отклонение.

Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке $Y = \log_2 T = 5$, которая соответствует величине протективного титра антител к вирусу НБ.

Рисунок 17 демонстрирует, что пересечение нижней границы условного доверительного интервала регрессии Y с горизонтальной осью координат происходит в точке $X \approx 2,75 \lg$. Это означает, что, в соответствии с принятыми условиями, ожидаемое время сохранения величины поствакцинального протективного титра антител ($\log_2 T_{\text{prot}} = 5$) по антигену G7 произойдет через $10^{2,75} \approx$

562 Сут, или, приближенно, через 18,7 месяца от даты иммунизации. Здесь следует подчеркнуть, что полученное значение является формальным, поскольку находится вне диапазона реальных измерений и не учитывает статистической неопределенности самой модели, однако, в качестве показателя тенденции может быть учтено.

Определение безвредности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

В исследовании использовали птиц кросса «Хайсекс Браун» 1, 30 и 70-суточного возраста в количестве 60 голов. Птицу разделили на шесть опытных групп по 10 голов в каждой.

Птицам, распределённым на три возрастных группы (1, 30 и 70 суток), каждая из которых была разделена на две подгруппы для подкожного и внутримышечного введения вводили образец вакцины против ньюкаслской болезни инактивированной эмульсионной экспериментальной серии 010322 от 03.2022 г в двукратном прививном объёме – 1,0 см³ для цыплят в возрасте 30 и 70 суток, цыплятам в возрасте 1 сутки – в объёме 0,5 см³ в две точки введения. В течение 21 суток за ними проводили клинические наблюдения на предмет выявления изменений в общем состоянии (угнетение, отказ от корма, диарея) и наличия припухлостей в местах введения вакцины.

По истечении срока наблюдений провели диагностический убой птиц и патологоанатомический осмотр точек введения препарата и окружающих тканей на наличие в них патологоанатомических изменений (гиперемия, отёки, некрозы, экссудация, инкапсуляции, присутствие изменённой или неизменённой эмульсии). Вакцину считали ареактогенной и безвредной, если не наблюдали описанные прижизненные или посмертные явления (таблица 35). Оценку реактогенного воздействия вакцины на ткани проводили по следующим критериям:

- лёгкие поражения: побледнение тканей, окружающих место инъекции, на площади до 1 см в диаметре, отсутствие признаков воспаления;

- средние поражения: зона воспалительной реакции тканей, проявляющаяся их отёчностью, побледнением или гиперемией имеет размеры от 1 до 2 см в диаметре, присутствие диффузно расположенной вакцины;

- сильные поражения: очаг воспаления тканей с вовлечением глубоких и поверхностных мышц и образованием гранулём составляет в диаметре от 3 см до 4 см, вакцина вытекает на разрезе или присутствует в тканях в виде белого творожистого вещества.

Таблица 35 - Результаты патологоанатомического осмотра птиц разных возрастов, привитых инактивированной вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» различными способами

Группа птиц	Возраст, сут.	Способ введения	Степень поражения тканей, % от группы			
			Нет поражений	Лёгкая	Средняя	Тяжёлая
№1	1	подкожно	100	0	0	0
№2		внутримышечно	100	0	0	0
№3	30	подкожно	100	0	0	0
№4		внутримышечно	100	0	0	0
№5	70	подкожно	100	0	0	0
№6		внутримышечно	100	0	0	0

Клинические наблюдения за птицами, привитыми двукратным объёмом инактивированной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» различными способами, не выявили каких-либо изменений в поведении и общем состоянии – птицы были активными, снижения аппетита не было.

Патологоанатомический осмотр мест введения вакцины также не выявил каких-либо патизменений в тканях в области инъекции.

Сделали заключение, что вакцина против ньюкаслской болезни инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», ареактогенна и безвредна для птиц возрастных групп 1, 30 и 70 суток как при подкожном, так и при внутримышечном введении.

3.2.3.3.2 Клинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Клинические испытания вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» в производственных условиях проводили на площадке АО «Птицефабрика Роскар». Использовали птиц ремонтного молодняка родительского стада кросса «Ross-308» 135-суточного возраста в количестве 15 тысяч голов, и промышленных кур-несушек кросса «Хайсекс» в возрасте 60 суток в количестве 185 тысяч голов. Условия содержания и кормления на птицефабрике соответствовали зоотехническим нормативам и нормам кормления для каждой возрастной группы птиц.

Птице внутримышечно вводили инактивированную вакцину «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» в прививном объёме 0,5 см³ согласно проекту инструкции. Для оценки ареактогенности и безвредности за привитыми птицами в течение 21 суток вели клинические наблюдения на предмет выявления изменений в общем состоянии (угнетение, отказ от корма, диарея) и наличия припухлостей в местах введения вакцины. Для оценки антигенной активности вакцины у 40 голов привитой птицы (по 20 голов от каждого цеха) отбирали пробы крови до иммунизации и через 28 суток после иммунизации, которые исследовали на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» на наличие антител к вирусу НБ согласно инструкции по применению соответствующего набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Результаты проведенных исследований показали, что на протяжении 28 суток после вакцинации у привитых птиц не наблюдали каких-либо изменений в поведении и в клиническом состоянии – куры были активны, снижение аппетита не регистрировали. Для оценки ареактогенности вакцины проводили осмотр мест введения препарата птице. Осмотр проводили в каждом птичнике, не менее, чем у 25 голов, привитых вакциной. При этом каких-либо патологических изменений тканей в области инъекции ни у одной птицы выявлено не было. Таким образом, было сделано заключение, что вакцина ареактогенна и безвредна для птиц.

Напряжённость иммунитета у птиц исследовали через 28 суток после вакцинации. Вакцинацию считали успешной, если после вакцинации не менее чем у 80% привитых цыплят титр антител составлял к вирусу НБ не ниже $5 \log_2$ в РТГА. По результатам проведенных исследований напряжённость иммунитета составляла не менее 99% (таблицы 36-37).

Таблица 36 - Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни штамм «Ла-Сота» в сыворотках крови птиц, привитых вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Цех №	Количество проб сывороток в РТГА соответственно их разведениям											
	Кол-во	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	$\log_2 T \pm s$
35 д/в	20	0	3	10	5	2	0	0	0	0	0	$5,30 \pm 0,19$
35 п/в	20	0	0	0	5	8	5	1	1	0	0	$7,25 \pm 0,24$
14/4 д/в	20	0	2	8	4	4	2	0	0	0	0	$5,80 \pm 0,27$
14/4 п/в	20	0	0	0	0	1	6	4	4	5	0	$9,30 \pm 0,29$

Примечание: д/в – до вакцинации, п/в – после вакцинации.

Таблица 37 - Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни штамм «ВНИИЗЖ G7» в сыворотках крови птиц, привитых вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Цех №	Количество проб сывороток в РТГА соответственно их разведениям											
	Кол-во	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	$\log_2 T \pm s$
35 д/в	20	6	2	6	6	0	0	0	0	0	0	$4,6 \pm 0,27$
35 п/в	20	0	0	0	1	3	1	7	8	0	0	$8,90 \pm 0,28$
14/4 д/в	20	6	4	6	4	0	0	0	0	0	0	$4,40 \pm 0,25$
14/4 п/в	20	0	0	0	0	1	3	7	7	2	0	$9,30 \pm 0,23$

Примечание: д/в – до вакцинации, п/в – после вакцинации.

Было установлено, что на 28-е сутки после прививки в организме птицы вырабатывается напряженный специфический иммунитет ко всем штаммам вируса НБ, входящих в состав вакцины. Так, средний титр антител к вирусу НБ из штамма «Ла-Сота» в сыворотке крови птицы, содержащейся в птичнике №35, через 28 суток после вакцинации составил $7,25 \log_2$, а в птичнике №14/4 – $9,3 \log_2$. При этом до вакцинации титр фоновых антител находился в рамках $5,3-5,8 \log_2$. К вирусу НБ

штамма «ВНИИЗЖ G7» титр антител у привитых птиц из птичника №35 составлял $8,9 \log_2$, в птичнике №14/4 – $9,3 \log_2$.

Результаты серологических исследований привитых стад птицы показали высокие уровни антител к вирусу НБ двух штаммов, входящих в состав вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти».

Проведенные эксперименты с серией препарата позволили сделать заключение, что вакцина против ньюкаслской болезни инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» является безвредным и иммуногенным препаратом.

В результате проведенных доклинических и клинических исследований был сформирован комплект регистрационного досье СТО 00495527-0483-2024 «Вакцина против ньюкаслской болезни (G7 и «Ла-Сота») инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» и был зарегистрирован вышеуказанный препарат 19.02.2024 г.

3.2.4 Разработка живой вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн»

3.2.4.1 Изучение иммуногенности штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ против изолятов ВНБ субгенотипа VII L

Параллельно с разработкой инактивированных вакцин из вируса ньюкаслской болезни генотипа VII L проводился поиск кандидата штамма для живой вакцины. Изолят вируса ньюкаслской болезни был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из образцов клинического материала, полученных от инфицированных цыплят-бройлеров Кемеровской области РФ. Вирус был адаптирован к развивающимся СПФ-эмбрионам кур. Индекс интрацеребральной патогенности (ICPI) вируса составил величину 0,075, что в соответствии с принятой классификацией [8], позволяло отнести штамм к лентогенным вариантам. Вирус был депонирован как штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн», обладающий наследуемым природно-ослабленным фенотипом. В экспериментах использовали вирусный

материал «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в виде восстановленной из лиофилизата суспензии, имеющей инфекционный титр $9,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Опыты ставили на цыплятах яичных пород, полученных из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства и на цыплятах, выведенных из СПФ-яиц в возрасте 10 суток. Вирусный материал штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вводили в заданных дозах перорально с помощью пипетки-дозатора в объеме $1,0 \text{ см}^3$.

Для контрольного заражения использовали вирулентный изолят «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ VII генотипа. Вирусный материал вводили внутримышечно в область бедра в дозе $6,0 \lg \text{ЭИД}_{50}$ в объеме $0,5 \text{ см}^3$.

Для изучения тропизма вируса использовали ОТ-ПЦР. Тестируемые штаммы «Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сравнивали по разнице накопления генома вируса в тканях, относящихся к респираторной системе и ткани кишечника. С этой целью сформировали две группы цыплят по 25 голов, которых содержали в отдельных боксах. Одну группу привили вирусным материалом штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в дозе $6,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$, вторую, в такой же дозе - штаммом «Ла-Сота». Через трое суток после прививки и, далее каждые сутки, в каждой группе, в случайном порядке отбирали по три птицы, у которых после эвтаназии эктомировали образцы тканей респираторной системы ($2/3$ нижнего участка трахеи и $1/5$ верхних участков легких с крупными бронхами), а также - образцы ткани кишечника (20 мм от начала 12-перстной кишки). Соответственно штамму вируса, времени получения и типу ткани образцы объединяли и хранили до исследования в замороженном виде.

В ОТ-ПЦР все образцы тканей анализировали параллельно. Для каждого образца определяли значение C_t , которое в обратной пропорции отражало количество генетического материала вируса. Далее, для данного штамма, на данном интервале времени, вычисляли разность вида $d = C_{t1} - C_{t2}$, где: C_{t1} - оценка, установленная для образца тканей респираторной системы; C_{t2} - тоже для ткани кишечника. Величину d считали показателем относительной адаптированности вируса. При $d > 0$ вирус демонстрировал больший аффинитет к ткани кишечника. Если значение $d < 0$, то вирус имел большую адаптированность к тканям

респираторной системы птицы. Полученные результаты исследований представлены в таблице 38.

Таблица 38 - Результаты исследования тропизма штаммов «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и «Ла-Сота» вируса НБ в организме иммунизированных цыплят с использованием данных ПЦР

Оценки пороговых циклов амплификации (Ct) соответственно штамму, времени после прививки вирусом (Cyt) и виду ткани (1 - ткани респираторной системы; 2 - ткань кишечника). Приведено значение d - показателя относительной адаптированности вируса.						
Cyt	«НБ-Эн»			«Ла-Сота»		
	Ct ₁	Ct ₂	d = Ct ₁ -Ct ₂	Ct ₁	Ct ₂	d = Ct ₁ -Ct ₂
3	30,20*	33,05	-2,85	29,01	36,43	-7,42
4	31,02	31,22	-0,20	29,97	32,92	-2,95
5	34,12	29,21	4,91	29,08	31,70	-2,62
6	33,02	29,26	3,76	26,70	33,13	-6,43
7	34,50	29,85	4,65	28,78	36,76	-7,98
8	35,00	32,15	2,85	29,18	35,93	-6,75
9	35,37	33,55	1,82	31,13	36,43	-5,30

* - исследована смесь образцов данного вида тканей от трех цыплят.

Из данных таблицы 38 следует, что в группе «НБ-Эн» для пяти из семи изученных образцов значения d были положительные, т.е. после четырех суток после прививки концентрация вирусного генома в ткани кишечника была выше, чем в тканях респираторной системы. При этом выборка аналогичных показателей в группе «Ла-Сота» имела все отрицательные значения, т.е. этот вариант вируса имел явный аффинитет к тканям респираторной системы.

Провели анализ существенности различий средних тенденций в групповых выборках d-показателей. Использовали ранговый метод Миллера [85]. Установили, что различия выборок имеют высокий уровень значимости ($p < 0,005$).

При изучении антигенного действия вируса штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» исследовали динамику гуморальной иммунной реакции птицы на различные дозы вируса. С этой целью сформировали четыре группы птиц по 14 голов, которых содержали в изолированных боксах. Три группы последовательно привили вирусным материалом штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в дозах: 3,5; 4,5 и 5,5 (lg ЭИД₅₀). Четвертую группу не прививали и содержали в качестве контроля.

Эксперимент продолжали 28 суток. Каждые семь суток в каждой группе в случайном порядке от 10 птиц получали образцы сывороток крови, которые исследовали в РТГА. Определяли титры антител к вирусу НБ и, соответственно заданным интервалам, в каждой группе вычисляли средние логарифмические оценки ($\log_2 T_s$). В завершении эксперимента соответственно испытанным дозам вируса провели анализ зависимости значений $\log_2 T$ от времени после иммунизации (сут). Использовали метод наименьших квадратов, позволяющий определить наиболее вероятное положение линии регрессии зависимого параметра [80]. Полученные результаты представлены в виде графика на рисунке 14.

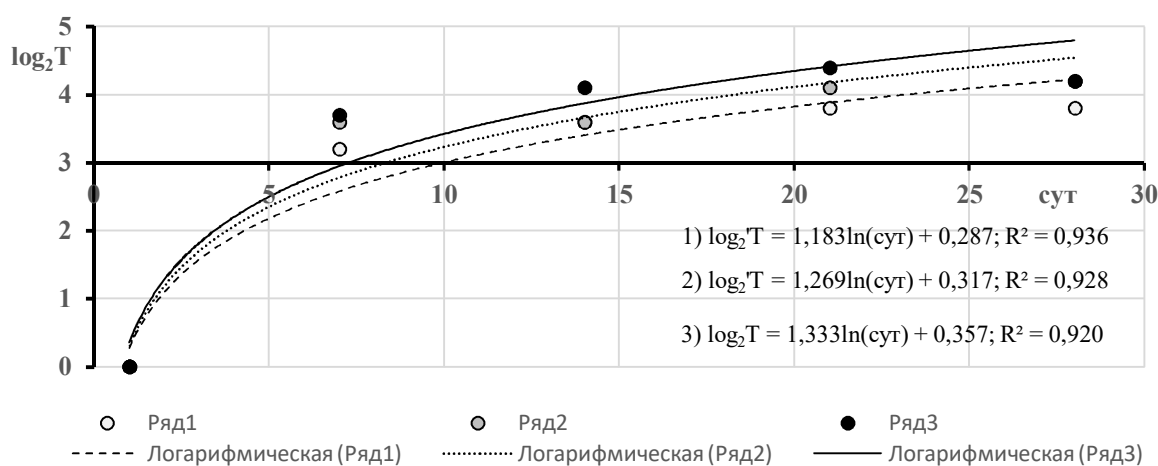


Рис. 14 - Зависимость титра антител к вирусу НБ ($\log_2 T_s$) от времени после прививки штаммом «ВНИИЗЖ НБ-Эн» (сут.) соответственно испытанным прививным дозам. Даны средние ($n=10$) логарифмические значения титров антител, установленные в группах после испытания заданных доз вируса ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 3,5 (ряд 1); 4,5 (ряд 2); 5,5 (ряд 3). Приведены соответствующие регрессионные уравнения (где T - прогнозируемая величина титра для заданного интервала, сут) и коэффициенты адекватности уравнений (R^2). Показаны линии регрессий.

Из данных, приведенных на рисунке 14, следует, что интенсивность иммунной реакции в организме птицы в определенной степени зависела от воздействующей дозы вируса. Установленные регрессионные коэффициенты в группах «3,5», «4,5» и «5,5» составили возрастающий ряд: 1,183, 1,269 и 1,333 соответственно. В биологическом смысле это означало, что более высокая прививная доза индуцировала большую скорость развития иммунного ответа. Отметим, что за период от 7 до 28 суток во всех вакцинированных группах доля

птиц, имеющих оценку $\log_2 T_s \geq 3$, составляла не менее 8/10. В контрольной группе положительных значений титров не наблюдали.

Для проведения исследования протективного эффекта иммунитета после вакцинации вирусом ньюкаслской болезни штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в эксперименте участвовало семь групп птиц по 14 голов в каждой, которых содержали в отдельных боксах. Три опытных группы цыплят были привиты вирусом НБ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в дозах ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 3,5, 4,5 и 5,5. Три группы считали контролем протективного эффекта вакцины и птиц привили вакциной из штамма «Ла-Сота» в дозах ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 6,7 (доза указанная в инструкции по применению данного препарата), 5,7 и 4,7. Одну группу цыплят содержали в качестве отрицательного контроля. Через 21 сутки после вакцинации во всех группах провели заражение вирулентным штаммом вируса НБ генотипа VII L. В течение десяти суток оценивали клиническое состояние птиц, подвергнутых заражению. Определяли количество клинически больных и погибших птиц. Указанные величины суммировали и вычисляли текущую оценку патогенного действия вируса как сумму клинических патологий (протективный индекс Pr). Полученные результаты исследований приведены в таблице 39.

Таблица 39 - Протективное действие вакцинных штаммов «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и «Ла-Сота» вируса НБ соответственно испытанных прививных доз (D, $\lg \text{ЭИД}_{50}$) на цыплятах, имеющих материнский иммунитет

Приведены: величина прививной дозы (D, $\lg \text{ЭИД}_{50}$), количество птиц в подопытной группе (n); показатель клинических патологий ($C = (\sum c)/n$, где $\sum c$ – количество больных и павших птиц; n – число птиц в группе до заражения); показатель протективного эффекта иммунитета ($Pr = (C_0 - C_1)/C_0$, где: C_0 - оценка клинических патологий в контроле; C_1 - тоже в опыте).					
Иммунизирующий вирус НБ	D	n	$\sum c^*$	C	Pr
Штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн»	5,5	14	1	0,07	0,93
	4,5	14	3	0,21	0,77
	3,5	14	3	0,21	0,77
Штамм «Ла-Сота»	6,7	14	1	0,07	0,93
	5,7	14	4	0,29	0,69
	4,7	14	4	0,29	0,69
Контроль	-	14	13	0,93	-

Примечание: * - данные получены в течение 10 суток после заражения;

Представленные в таблице 39 результаты показали, что вирус штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» способен создать в организме птицы протективный иммунитет против НБ. При этом достаточная напряженность иммунитета (защита более 90% птиц) в опыте может быть обеспечена прививной дозой 5,5 lg ЭИД₅₀.

Для чистоты эксперимента опыт по определению протективного эффекта иммунитета после прививки вирусом ньюкаслской болезни штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в сравнении с традиционным штаммом «Ла-Сота» был так же проведен на СПФ цыплятах. Данные представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Протективное действие вакцинных штаммов «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и «Ла-Сота» вируса НБ соответственно испытанных прививных доз (D, lg ЭИД₅₀) на СПФ цыплятах

Вакцинный штамм	D	n*	$\sum c^{\#}$	$C^{\#\#} = (\sum c)/n$	$Pr^{\#\#\#} = (C_0 - C_1)/C_0$
«ВНИИЗЖ НБ-Эн»	6,5	16	8	0,50	0,50
	5,5	16	8	0,50	0,50
	4,5	16	14	0,88	0,71
	3,5	16	16	1,00	0,12
«Ла-Сота»	6,7	16	15	0,94	0,06
Контроль	-	16	16	1,00	н/о

Примечания:

- * - количество птиц в группе;
- # - накопленное в течение эксперимента число клинически больных и павших птиц;
- ## - клинический индекс;
- ### - протективный индекс, где: C₀ - клинический индекс в контрольной группе; C₁ - тоже в вакцинированной группе.

По данным представленным в таблице 40 можно сделать заключение, что протективный эффект после прививки вируса «ВНИИЗЖ НБ-Эн» СПФ цыплятам в дозах 6,5 и 5,5 lg ЭИД₅₀ был одинаков и достаточно высокий – защита птиц при контрольном заражении вирусом НБ генотипа VII составила 50%. Аналогичный показатель после иммунизации СПФ цыплят штаммом «Ла-Сота» вируса НБ в дозе 6,7 lg ЭИД₅₀ был всего 6%.

Результаты, полученные в ходе исследований иммунобиологических свойств везелогенного штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн», позволили сделать ряд заключений:

- вирус изучаемого штамма обладает тропизмом как к тканям респираторной системы птицы, так и к ткани кишечника. Преимущественный аффинитет вируса установлен для кишечной ткани, в которой накопление вирусного генома существенно выше ($p < 0,005$), чем в тканях респираторной системы;

- при пероральном поступлении в организм птицы в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀ исследуемый вирус способен индуцировать в организме птицы активный гуморальный иммунный ответ. Через 15 сут после прививки титр антител к вирусу НБ составил величину 4 log₂, или 1:16, что согласуется с рекомендациями ВОЗЖ для живых вакцин;

- через 21 сутки после пероральной иммунизации изучаемым вариантом вируса протективная эффективность иммунитета против высоковирулентного вируса НБ генотипа VII соответствовала оценке 0,93, (или 93%) у товарных цыплят имеющих материнский иммунитет и 0,5 (или 50%) для СПФ цыплят. Данный показатель соответствует рекомендациям ВОЗЖ в отношении результатов испытания протективной функции живых вакцин против НБ.

3.2.4.2 Депонирование штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни

В 2022 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» исследовали изолят вируса, выделенный в восточном регионе РФ от цыплят-бройлеров с клинически стертой формой НБ. При этом вирус обладал выраженным тропизмом к клеткам эпителия кишечника.

Контроль стерильности штамма. При испытании на подтверждение отсутствия контаминации штамма бактериальной, грибной микрофлорой и микоплазмами микробиологическими методами использовали пять флаконов со штаммом вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн», которые исследовали в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Метод контроля стерильности». В результате исследований установлено, что штамм вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» не контаминирован бактериями, грибами и микоплазмами.

Контроль отсутствия контаминации посторонними вирусами и микоплазмами (работа проведена совместно с сотрудниками референтной лаборатории вирусных болезней птиц). Результаты ПЦР установлено, что штамм вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» не контаминирован вирусами ССЯ-76, ИББ, МПВИ, ГП, ИБК, ИЛТ, ИЭМ, анемии цыплят, ВБМ, оспы, лейкоза, реовирусом, микоплазмами (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*).

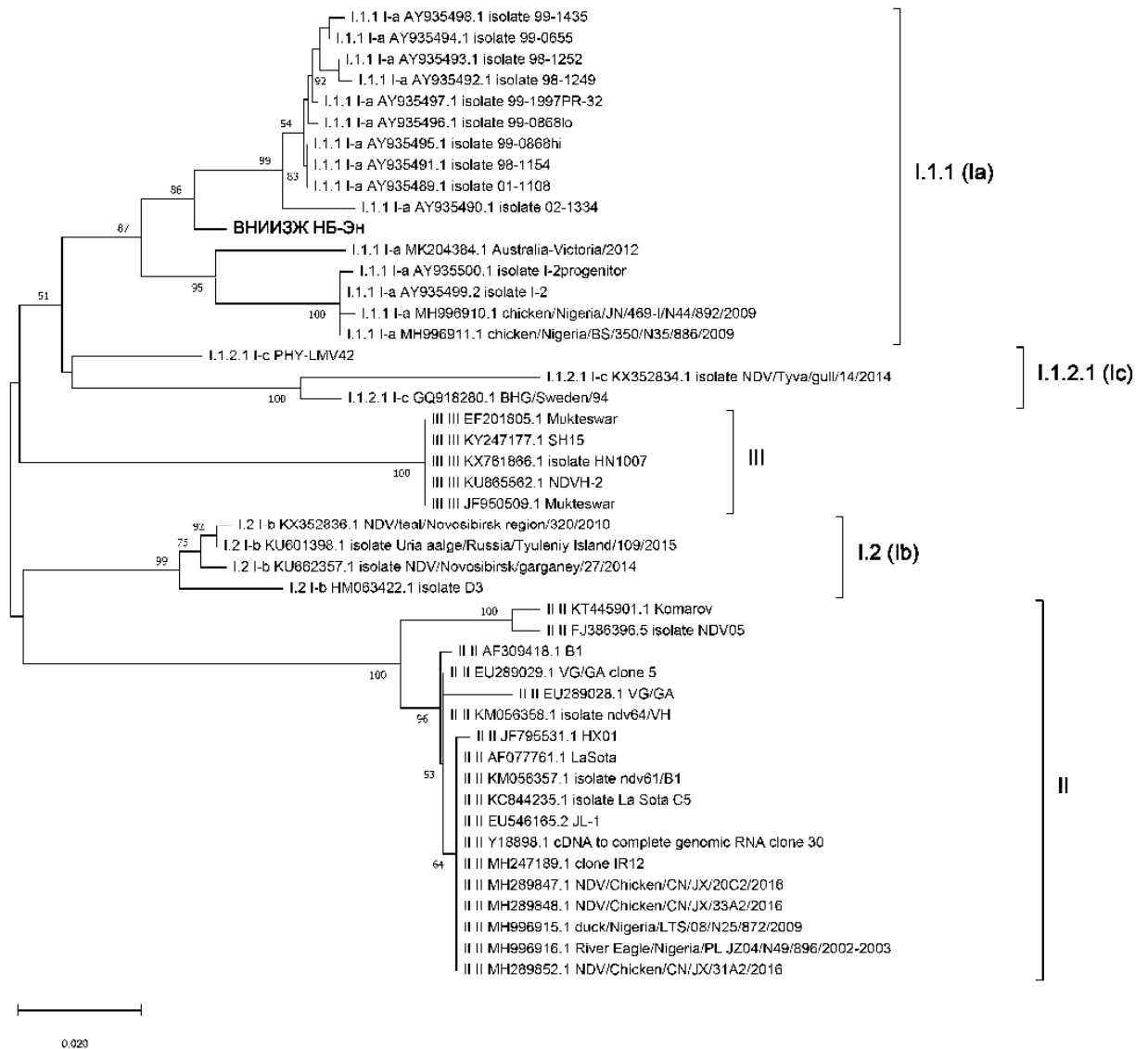


Рисунок 18 - Филогенетическое древо изолятов ВНБ генотипов I, II, III (нуклеотиды 142-596). Дендрограмма получена методом наибольшего правдоподобия (Maximum Likelihood) при использовании модели НКУ (Kumar S. et al., 2018). Проверка устойчивости филогении проводилась методом «бутстреп» (500 повторностей). Анализ проводили с помощью программы MEGA X (10.2.6).

Кроме это, в соответствии с рекомендациями Кодекса наземных животных [526], на птице провели тестирование вакцинного штамма на «реверсию к вирулентности». Для этого сформировали группу из 25 голов цыплят 5-суточного возраста, выведенных из СПФ-яйца. Каждой птице окулярно ввели 6,5 lg ЭИД₅₀ вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн», что соответствовало десяти прививным дозам. За птицей наблюдали в течение 21 суток. Согласно использованной методики «возврат к вирулентности» у штамма исключали при условии, если ни у одной из птиц за время наблюдений проявлений клинических признаков отмечено не было. При этом все птицы оставались живыми.

Таблица 41 - Оценка индекса интрацеребральной патогенности (ICPI) для вакцинного штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ после пяти последовательных пассажей в развивающихся СПФ-эмбрионах кур, полученная на суточных цыплятах, выведенных из СПФ-яиц

Клиническое состояние птицы	Количество голов цыплят соответственно их клиническому состоянию и дню наблюдений								Итого баллов (Р)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Здоровые	10	10	10	10	10	9	7	6	0
Заболевшие	0	0	0	0	0	0	1	2	3×1=3
Погибшие	0	0	0	0	0	1	2	2	5×2=10
Обработка данных:									
ICPI= $\sum(0+3+10)/80=0,16$									

Латентный период клинического проявления инфекции составил пять суток, после которого в течение последующих трех суток заболевших и погибших цыплят было зафиксировано четыре головы.

Полученное значение удовлетворительно согласовалось с ранее показателем $ICPI=0,075$, установленным до проведения пассажей, и не выходило за границы норматива ($ICPI \leq 0,2$) согласно СТО 00495527-0446-2022.

Таблица 42 - Инфекционная и гемагглютинирующая активность вакцинного штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ до и после пяти последовательных пассажей в развивающихся СПФ-эмбрионах кур

Активность ГПМ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ соответственно пассажу (R)			
Инфекционная активность, $\lg ЭИД_{50}/\text{см}^3$		Гемагглютинирующая активность, ГАЕ	
R=0	R=5	R=0	R=5
$9,29 \pm 0,29$	$9,25 \pm 0,25$	1:512	1:1026

Результаты, приведенные в таблице 42, показывают отсутствие статистической разницы оценок инфекционной и гемагглютинирующей активности в вирусных материалах до и после проведения пассажей.

При проведении теста на «реверсию к вирулентности» вакцинного штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» было установлено, что 10-кратная доза вируса при окулярной прививке ни у одного из 25 подопытных цыплят не вызвала клинических признаков генерализованной инфекции. Репродукция вакцинного вируса сопровождалась легкими серозными кратковременными конъюнктивитами, которые наблюдали через 72 ч. после прививки у 20% подопытных птиц. Продолжительность конъюнктивитов составляла не более 7 суток. Сохранность подопытных птиц за 21 сутки составила 100%.

В пассажах штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сохранял наследуемый природно-ослабленный фенотип и в соответствии с принятой классификацией его отнесли к лентогенным вариантам вируса НБ [92]. Штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни был задепонирован в ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» (*Справка №*

437-деп /22-71 о депонировании штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни (производственного) 08.02.2022 г.). На основе данного штамма был разработан новый препарат – вакцина «ВНИИЗЖ НБ-Эн», которая успешно прошла доклинические исследования и клинические испытания в птицеводческих хозяйствах.

3.2.4.3 Доклинические исследования вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» живой сухой

Доклинические исследования проводили на следующих экспериментальных сериях живой сухой вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн»: 010322 (дата выпуска 03.2022 г.), 020323 (дата выпуска 03.2022 г.), 030422 (дата выпуска 04.2022 г.), 040522 (дата выпуска 05.2022 г.).

Доклинические исследования выполняли на однодневных цыплятах-бройлерах кросса «Ross-308», цыплятах яичного кросса «Декалб уайт» в возрасте 10-21-суток из коммерческого хозяйства, благополучного по вирусным болезням птиц, а также цыплятах, выведенных из СПФ-яйца ((фирма VALO BioMedia GmbH, Sachsenring 11, 27711 Osterholz-Scharmbeck, Germany). Формирование опытных и контрольных групп осуществляли случайным образом, не менее чем по десять голов в группе. Количество подопытных групп в каждом из опытов рассчитывали индивидуально, исходя из потребности изучения различных вариантов вакцины или исследуемых показателей.

Подбор прививной дозы и изучению формирования гуморального иммунного ответа у цыплят после применения различных доз вакцинного вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн»

Серонегативных в вирусу НБ цыплят разделили на четыре группы: три опытных и контрольную. Проводили иммунизацию опытных цыплят: группу №1 – в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀/гол; группу №2 – 4,5 lg ЭИД₅₀/гол; группу №3 – 3,5 lg ЭИД₅₀/гол. Приготовленные суспензии принудительно выпаивали цыплятам в объеме 1 см³. Группа №4 (контроль) в продолжение всего эксперимента оставалась интактной.

Эксперимент продолжали 28 суток. Через 7, 14, 24 и 28 суток от всех цыплят опытных групп отбирали кровь для исследований сывороток в РТГА для определения титров антител. Исследовали напряженность гуморального иммунитета птиц после прививки различными дозами вакцинного вируса штамма «ВНИИЗЖ НБ–Эн». Полученные результаты представлены в таблице 43.

Таблица 43 - Напряженность гуморального иммунитета у кур после прививки различными дозами вакцинного вируса НБ штамм «ВНИИЗЖ НБ–Эн»

Оценки титров антител к вирусу НБ в РТГА в сыворотках крови, соответственно испытанных прививных доз вакцины (D, lg) и времени после вакцинации (сут)														
D	Сут.	n*	Число проб соответственно установленных значений титров											log ₂ **
			0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
–#	0	10	2	4	4									1,20±0,25
3,5	7	10	4	2	2	1	1							1,30±0,45
	14	10	2		1	3	2	2						2,90±0,57
	21	10				2	2	3	3					4,70±0,37
	28	10				2	2	3	1	1	1			5,00±0,52
4,5	7	10	5	3	1				1					1,10±0,59
	14	10	2		1	1	3	1	2					3,40±0,69
	21	10					6	2	1	1				4,70±0,33
	28	10				3	1	2	3	1				4,80±0,47
5,5	7	10	3	6	1									0,80±0,20
	14	10	1	8					1					1,40±0,52
	21	10				1	2	3	3		1			5,20±0,44
	28	10			1		3	2	2	1			1	5,30±0,68
K##	7	10	6	4										0,44±0,16
	14	10	2	5	3									1,10±0,23
	21	10	3	2	5									1,20±0,29
	28	10		7	3									1,30±0,15

Примечания:

- * - указано количество исследованных проб сывороток;
- ** - приведена средняя логарифмическая величина по данной строке
- # - пробы сывороток до вакцинации;
- ## - контрольная группа (не вакцинированные птицы).

Данные таблицы 43 использовали для нахождения оптимальной величины прививной дозы вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн». В качестве оценки иммунизирующего действия препарата использовали величину титра антител к вирусу НБ, которая характеризовала напряженность поствакцинального гуморального иммунитета птиц. Приняли, что приближенная средняя по группе оценка титра, равная или превышающая величину $\log_2 T = 5$, будет свидетельствовать о протективном эффекте вакцины [112].

Фактическую динамику развития гуморального ответа птиц на различные иммунизирующие дозы вакцины представили в виде графика на рисунке 16.

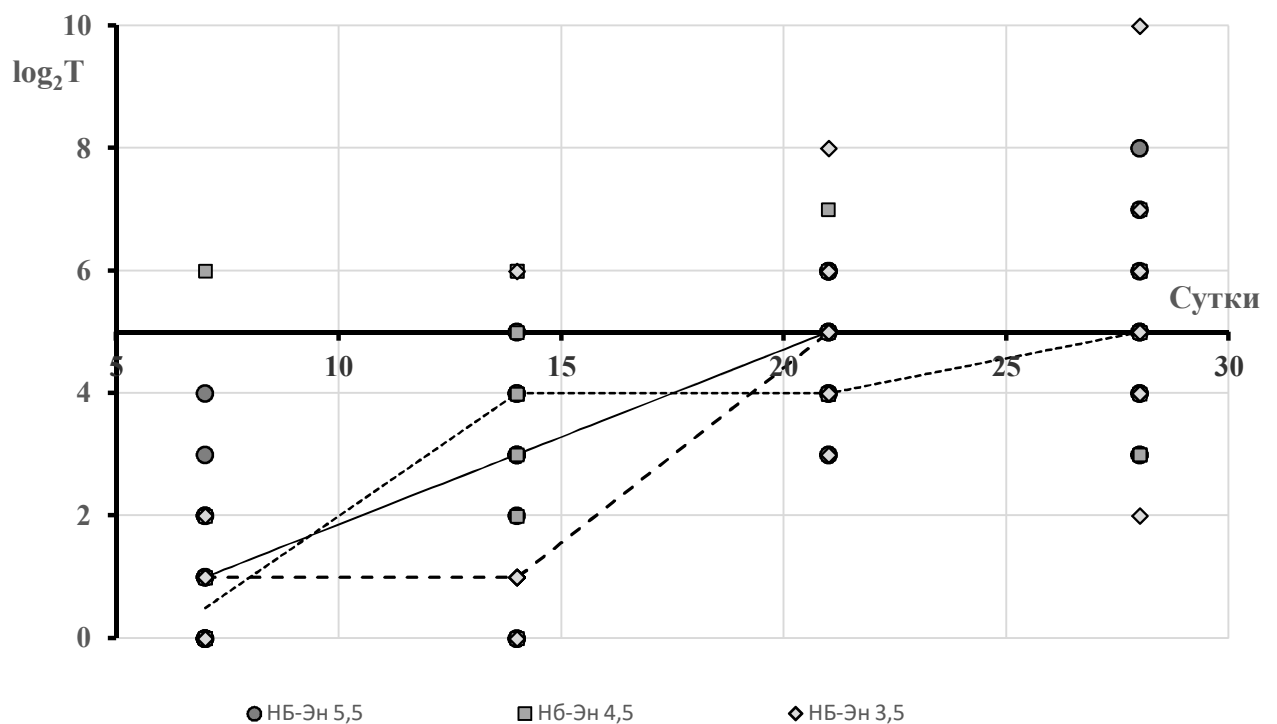


Рисунок 16 - Динамика гуморального иммунитета цыплят после прививки различными дозами вакцинного вируса штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Показаны оценки титров антител к вирусу НБ в РТГА, соответственно времени после вакцинации (сут.) и испытанных доз вакцинного вируса штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 5,5; 4,5 3,5. Линиями соединены медианы групповых выборок титров соответственно дозам. Ось ординат пересечена в точке, соответствующей принятому пороговому титру ($\log_2 T = 5$).

На графике приведены все первичные оценки титров (ось ординат) соответственно времени их установления (ось абсцисс). При этом ось ординат пересечена в точке принятого порогового титра ($\log_2 T = 5$), что позволяет наблюдать все эмпирические титры равные или превышающие указанную величину. Для иллюстрации развития групповых тенденций использованы соответствующие медианы.

Из данных графика, представленного на рисунке 16 следует, что все испытанные дозы ($\lg \text{ЭИД}_{50}$) вакцинного вируса штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» индуцировали иммунную реакцию птиц. Однако динамика иммунного ответа имела определенные отличия. Наиболее активно проявила себя доза 5,5 $\lg$, которая по медианным оценкам имела линейный по времени прирост значений титров и к 21 суткам обеспечила достижение пороговой величины $\log_2 T = 5$. Доза 3,5 $\lg$ также достигла к 21 суткам порогового титра, но процесс иммуногенеза был явно скачкообразный. Медиана титров в группе, где испытали дозу 4,5 $\lg$, показала соответствие пороговому титру только к 28 суткам.

Выбор оптимального способа введения живой вакцины против НБ из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» по индукции антител к вирусу ньюкаслской болезни

Серонегативных к вирусу НБ цыплят в случайном порядке разделили на четыре группы: три опытных и контрольную.

Из образцов экспериментальной серии вакцины готовили лекарственную форму (суспензию) для соответствующего способа иммунизации. Независимо от способа применения препарата в одной прививной дозе содержалось 5,5 $\lg \text{ЭИД}_{50}$ штамма ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ. Опытную группу №1 иммунизировали выпойкой вакцины в объеме 1 см^3 ; группу №2 – окулярно (0,1 см^3), группу №3 – спрей-методом по 5 $\text{см}^3/\text{гол}$. Группа №4 (контроль) в продолжение всего эксперимента оставалась интактной. Эксперимент продолжали 21 сутки. Через 21 сут от всех цыплят опытных групп отобрали кровь для исследований сывороток в РТГА для определения титров антител.

Полученные первичные данные переводили в логарифмическую размерность, для каждой группы находили средние значения и их стандартные ошибки. Далее проводили сравнение среднегрупповых значений.

Иммунизированные различными способами группы цыплят дозой вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» $5,5 \lg \text{ ЭИД}_{50}/\text{гол}$ через 21 сутки после прививки показали следующее: во всех подопытных группах однократная прививка серонегативных цыплят 10-суточного возраста была эффективной. При этом средний логарифмический титр антигемагглютинирующих антител в РТГА в группах №1—3 составил $4,9 \pm 0,28$; $5,4 \pm 0,29$ и $4,7 \pm 0,22$. Полученные данные указывают, что без учета статистической неопределенности при окулярной прививке индукция специфических антител идет интенсивнее.

Для определения достоверности различий в иммунном отклике цыплят на прививку вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» различными способами провели сравнение среднегрупповых значений с учетом их стандартных ошибок. Было установлено, что различия между данными величинами были лишь формальными. Покажем это на примере сравнения титров групп с окулярным способом применения вакцины и спрей-методом, в которых средние величины показали максимальное и минимальное значения. Так, при сравнении коэффициента $t = |T_{\text{ок}} - T_{\text{спрей}}| / \sqrt{(m_{\text{ок}}^2 - m_{\text{спрей}}^2)}$ с табличным коэффициентом Стьюдента t_p , соответственно заданного значения вероятности ошибки прогноза ($p=0,05$) и числа степеней свободы $v=n_1+n_2-2$ было установлено, что $t=1,92 < t_p=2,02$.

Оценка иммуногенности вакцины против НБ из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» живой сухой

Эксперимент проводили на статистически серонегативном поголовье: положительный показатель в РТГА составил 1/10 от исследованных образцов сывороток, т.е. 90% птиц были серонегативными. При этом средняя оценка титра антител к НБ исследованной выборки остальных проб составила $0,9 \pm 0,18 \lg_2$. Далее цыплят от товарных кур случайном порядке разделили на пять групп по 10 голов: три опытных и две контрольных. Из экспериментальной серии вакцины

приготовили образцы препарата для иммунизации выпойкой. Приготовили три образца вакцины с дозами: 5,5; 4,5 и 3,5 lg ЭИД₅₀ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ, а также один образец из коммерческой серии вакцины против НБ из штамма «Ла-Сота», в одной прививной дозе которого содержалось 6,7 lg ЭИД₅₀.

Опытные группу №1 иммунизировали в дозе - в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀, содержащейся в объеме 1 см³, группу №2 группу - в дозе 4,5 lg ЭИД₅₀ и №3 - в дозе 3,5 lg ЭИД₅₀, соответственно. Опытную группу №4 иммунизировали пероральным способом вакциной из штамма «Ла-Сота» в дозе 6,7 lg ЭИД₅₀, содержащейся в объеме 1 см³ (положительный контроль). В группе №5 (отрицательный контроль) цыплятам аналогичным способом выпоили стерильный физиологический раствор. В продолжение всего эксперимента птица данной группы оставалась интактной.

Через 21 сутки после вакцинации у всех подопытных групп, включая контрольные, отобрали кровь для исследований сывороток в РТГА на наличие антител к вирусу НБ (таблица 44).

Таблица 44 - Напряженность гуморального иммунитета кур после прививок различных доз вакцинного вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и вакцины «ВНИИЗЖ Ла-Сота» в одной прививной дозе

Оценки титров антител к вирусу НБ в РТГА в сыворотках крови, соответственно испытанных прививных доз вакцины (D, lg) и времени после вакцинации (сут.)														
Сут. п/в*	№ группы	D, lg	Число проб соответственно установленных значений титров антител в РТГА											
			Кол-во проб	0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	(T±s)**, log ₂
0	-	0	10	2	7	1								0,9±0,18
21	1	5,5						1	6	2	1			5,3±0,26
	2	4,5					2	4	2	2				4,4±0,34
	3	3,5					5	3		1		1		4,1±0,53
	4	6,7					1	3	2	1	3			5,2±0,47
	5	0			3	6	1							1,8±0,20

Примечание:

* - суток после вакцинации;

** - средний логарифмический титр по группе и его стандартная ошибка

Данные таблицы 44 наглядно демонстрируют, что штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн» при меньшей величине иммунизирующей дозы относительно штамма «Ла-Сота» ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 5,5 и 6,7, соответственно, индуцировал практически равный титр сывороточных антител ($\log_2$): $5,3 \pm 0,26$ и $5,2 \pm 0,47$, соответственно. Меньшие испытанные дозы штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» обуславливали статистически меньшие значения титров.

Далее провели заражение цыплят вирулентным штаммом «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ VII генотипа путем внутримышечной инъекции дозой $6,0 \pm 0,3 \lg \text{ЭИД}_{50}$ в объеме $1,0 \text{ см}^3$.

После контрольного заражения наблюдение за цыплятами продолжали в течение 14 сут и учитывали случаи заболевания и их гибели (таблица 45). Об иммуногенности вакцины, испытанной в различных прививных дозах, судили по величине показателя эффективности вакцинации (Pr), который вычисляли по формуле: $Pr = (C_0 - C_1) / C_0$, где C_0 - величина, равная отношению числа погибших птиц в группе отрицательного контроля к общему числу птиц в группе отрицательного контроля; C_1 – величина, равная отношению числа погибших птиц в опытной группе к общему числу птиц.

Таблица 45 - Результаты контрольного заражения цыплят через 21 сутки после иммунизации различными дозами штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» ВНБ и прививной дозой вакцины «ВНИИЗЖ Ла-Сота»

№ группы	Вакцинный штамм	D, $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{гол}$	Гол	Количество случаев заболевания, в т.ч. погибших	Pr
1	«ВНИИЗЖ НБ-Эн»	5,5	10	2	0,8
2		4,5	10	4	0,6
3		3,5	10	4	0,6
4 (контроль+)	«Ла-Сота»	6,7	10	3	0,7
5 (контроль-)	-	н/в	10	10	н/о

Таблица 45 показывает результаты контрольного заражения цыплят вирусом НБ VII генотипа штамма «ВНИИЗЖ G7» через 21 сутки после иммунизации различными дозами штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и прививной дозой вакцины «ВНИИЗЖ Ла-Сота». Представленные данные демонстрируют, что использованный высоковирулентный агент обусловил абсолютную гибель в группе не привитых птиц (№5) и 30% летальности в группе, привитой коммерческой вакциной против НБ из штамма «Ла-Сота». При этом, наибольшая испытанная иммунизирующая доза 5,5 lg ЭИД₅₀ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» обеспечила 80% защиты. Меньшие дозы испытываемого штамма демонстрировали меньшую защиту.

Определение безвредности вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сухой живой

Эксперимент проводили на серонегативных цыплятах 10-суточного возраста, выведенных из СПФ-яиц. Цыплят разделили на две группы по 10 голов: опытную и контрольную. Из образца экспериментальной серии вакцины приготовили суспензию для интраназального введения, с активностью 6,5 lg ЭИД₅₀ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ (10-кратная доза).

Проводили иммунизацию опытной группы цыплят интраназальным способом в объеме 0,1 см³. Контрольной птице в таком же объеме тем же способом инокулировали физиологический раствор.

Клиническое наблюдение проводили за всей птицей в течение 10 суток. Безвредность оценивали по отсутствию проявлений каких-либо клинических признаков болезни Ньюкасла.

Были получены следующие результаты: в сыворотках крови цыплят перед прививкой вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» антител к вирусу ньюкаслской болезни ни в одной из проб не обнаружено, т.е. птица была серонегативна.

Птица опытной группы за время наблюдений оставалась активной, снижение аппетита не наблюдали. Какие-либо проявления ньюкаслской болезни или другие патологические признаки отсутствовали. При вскрытии патологоанатомических изменений отмечено не было. То есть, опытная группа птиц не отличалась от контрольной. Таким образом, вакцина из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» была безвредной в 10-кратной дозе при применении на 10-суточных цыплятах.

Изучение контактной передачи вакцинного вируса от птиц, привитых препаратом «ВНИИЗЖ НБ-Эн», при их совместном содержании с непривитыми птицами

Для эксперимента использовали 30 цыплят. Образовали две группы птиц: опытную (№ 1 - 20 голов) и контрольную (№2 - 10 голов), которых содержали отдельно. Опытную группу иммунизировали экспериментальной серией вакцины, контрольную - использовали в качестве реципиентов для последующей постановки на контакт.

Для прививки опытной группы птиц готовили вакцину для окулярного применения. В одной окулярной дозе содержалось $5,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,1 \text{ см}^3$ вакцинного вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн». В группе №1 препарат вносили на конъюнктиву нижнего века ($0,1 \text{ см}^3$). Все вакцинированные птицы были промаркированы. В группе №2 цыплятам аналогичным способом закапали стерильный физиологический раствор (плацебо).

Через трое суток после вакцинации, группы птиц объединили для дальнейшего совместного содержания.

Через 14 и 21 суток после объединения групп, от всех цыплят отбирали пробы крови для исследований сывороток в РТГА для определения титров антител к вирусу НБ и сравнивали результаты, которые представлены в таблице 46.

Таблица 46 - Титры антител к вирусу НБ в РТГА в сыворотках крови, соответственно времени (сут) после постановки на контакт иммунизированных птиц вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и невакцинированных птиц

Сут.	Группа	Число проб соответственно установленным значениям титров антител в РТГА											
		n*	0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	T±s, log ₂ **
0[#]	-	10	10										0,00
14	1	20	1		2	2	5	7	2		1		4,25±0,38
	2	10	7		2	1							0,8±0,42
21	1	20		1	1	1	5	5	3	3		1	4,95±0,41
	2	10	3	1		2	2	1	1				2,6±0,7

Примечания:

* - указано количество исследованных проб сывороток;

** - приведена средняя логарифмическая величина и ее стандартная ошибка;

- пробы сывороток до вакцинации.

Из результатов таблицы 46 следует, что использованная в эксперименте птица была серонегативна в отношении вируса НБ. На этом основании результаты проведенных испытаний считали объективными. Приняли, что иммунной является птица, у которой титр антител к вирусу НБ был равен или превосходил показатель 1:8 (т.е. $\log_2 T \geq 3$), а также, что приближенная средняя по группе оценка титра, равная или превышающая величину $5 \log_2$, будет свидетельствовать о протективном эффекте вакцины.

На 14 и 21 сутки эксперимента вакцинированная птица в группе №1 (n=20) показала наличие 85% иммунных особей, при этом иммунная прослойка имела средние оценки титров ($\log_2$) $4,76 \pm 0,29$ и $5,12 \pm 0,30$, соответственно. Статистическая разница между указанными величинами отсутствовала ($|4,76 - 5,12| / \sqrt{(0,29^2 + 0,30^2)} < t_p = 1,96$), что показывает статистическое соответствие данных оценок протективному показателю.

Далее исследовали связь между напряженностью гуморального иммунитета в группах вакцинированных и не вакцинированных птиц и временем совместного

содержания. Полученные результаты представлены на рисунке 17 в виде диаграммы.

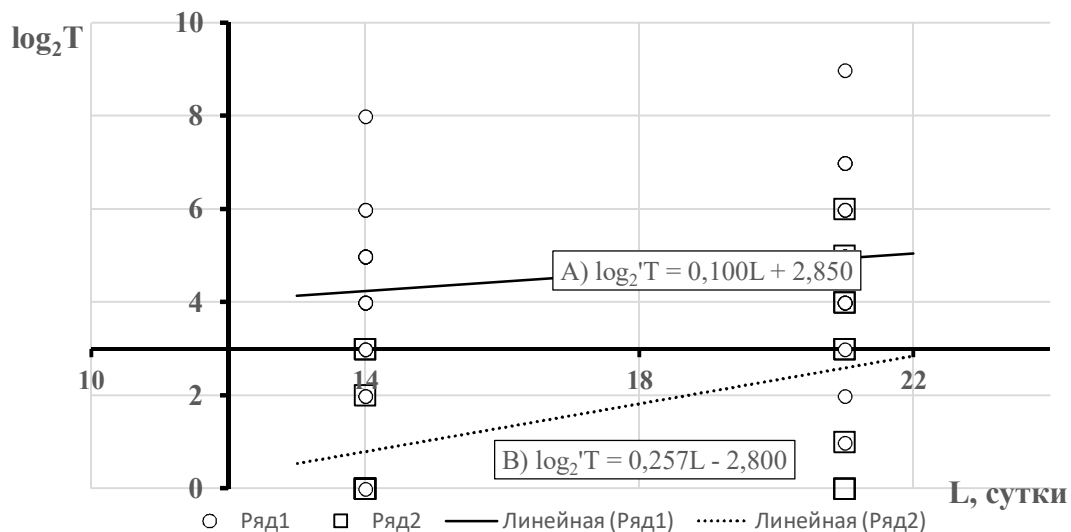


Рисунок 17 - Динамика гуморальной иммунной реакции вакцинированных и не вакцинированных птиц, находящихся на контакте при совместном содержании

Показаны оценки титров антител к вирусу НБ в РТГА ($\log_2 T$) в сыворотках крови иммунизированных (Ряд 1) и контактирующих (Ряд 2) птиц, соответственно времени после вакцинации (L, сутки). Ось ординат пересечена в точке $\log_2 T = 3$, соответствующей величине положительного титра в РТГА.

Приведены регрессионные уравнения и линии регрессии, построенные на основании показателей титров антител иммунизированных птиц (А) и контактирующих птиц (В), где $\log_2' T$ - ожидаемая величина титра для заданного времени после вакцинации (L, сутки).

Приведенный в уравнении А на рисунке 17 регрессионный коэффициент 0,100 имел стандартную ошибку $\pm 0,081$ и не был статистически значим (т.к. $t = 0,1/0,081 < t_p = 2,11$), что, свидетельствовало об отсутствии тенденции к дальнейшему росту средних показателей титров антител в группе №1 на данном временном интервале. В биологическом смысле это указывало на фазу стабилизации иммунной реакции в организме цыплят.

Коэффициенты вариации значений титров, характеризующие степень однородности поствакцинального иммунитета, в группе №1 на 14 и 21 сутки (с учетом неиммунных птиц) составили величины $1,71/4,25 = 0,40$ и $1,85/4,95 = 0,37$.

Контактирующая птица из группы №2 (n=10) на 14 сутки содержала долю иммунной прослойки 20% и на 21 сутки - 60%. Соответствующие средние величины титров составили ($\log_2$) $3,00 \pm 0,00$ и $4,17 \pm 0,61$.

Регрессионный коэффициент 0,257 из уравнения В был статистически значим, т.к. имел стандартную ошибку $\pm 0,117$ ($t=257/0,117 > t_p=2,11$), что отражало рост средних значений титров (т.е. на данном временном интервале в этой группе происходило развитие иммунной реакции).

При объединении всех показателей титров антител обеих групп (искусственная модель неоднородной группы) коэффициенты вариации на 14 и 21 сутки составили величины $2,27/3,10=0,74$ (при 37% неиммунной прослойки) и $2,25/4,17=0,54$ (при 20% неиммунной прослойки), соответственно.

Изучение иммуногенности вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» после прививки спрей-методом

До проведения эксперимента у пяти цыплят каждого возраста отобрали кровь для подтверждения отсутствия в сыворотках антител к вирусу НБ. Сыворотки исследовали в РТГА.

Далее цыплят разделили на четыре группы следующим образом: группа №1 – суточные цыплята в количестве 20 голов (опыт); группа № 2 – 14-суточные цыплята в количестве 20 голов (опыт); группа № 3 – суточные цыплята в количестве 20 голов (контроль); группа № 4 – 14-суточные цыплята в количестве 20 голов (контроль).

Из образцов экспериментальной серии вакцины приготовили лекарственную форму (суспензию). В одной прививной дозе содержалось $5,5 \lg$ ЭИД₅₀ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ.

Опытные группы (№1 и №2) иммунизировали спрей-методом по $5 \text{ см}^3/\text{гол.}$ Группы №3 и №4 (контроль) оставили не вакцинированными.

Через 21 сутки после вакцинации у опытных и контрольных групп отобрали кровь для исследований сывороток в РТГА на наличие антител к вирусу НБ. Были получены следующие результаты (таблица 49).

Таблица 49 – Титр антител к вирусу НБ в РТГА до и после прививки вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» цыплят в возрасте 1 и 14 суток спрей-методом

Сут п/в*	Группа	Число проб соответственно установленных значений титров антител в РТГА										
		Кол-во проб	0	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	(T±s)**, log ₂
0 сут.		10	10									0,00
21 сут.	1 (опыт)	20			3	9	5	2	1			3,45±0,23
21 сут.	2 (опыт)	20				10	5	3	1	1		3,9±0,26
21 сут.	3 (контроль)	20	19	1								0,00
21 сут.	3 (контроль)	20	19	1								0,05±0,05

Примечание:

* - суток после вакцинации;

** - средний логарифмический титр по группе и его стандартная ошибка

Из таблицы 49 следует, что эксперимент проводили на серонегативном поголовье. Через 21 сутки у всех опытных групп цыплят присутствовала выраженная иммунная реакция на прививку. Среднелогарифмический титр в группе №1 составил (3,45±0,23) log₂; в группе №2 - 3,9±0,26.

Далее провели заражение всех групп вирулентным штаммом «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ VII генотипа путем внутримышечной инъекции дозой (6,0±0,3) lg ЭИД₅₀ в объеме 1,0 см³.

После контрольного заражения наблюдение за цыплятами продолжали 14 суток и учитывали случаи заболевания, в т.ч. и их гибели (таблица 50). Об иммуногенности вакцины, испытанной в различных прививных дозах, судили по величине показателя эффективности вакцинации (Pr), который вычисляли по формуле: выраженного в %: $Pr = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100\%$, где C₀ - величина, равная отношению числа погибших птиц в группе отрицательного контроля к общему

числу птиц в группе отрицательного контроля; C_1 – величина, равная отношению числа погибших птиц в опытной группе к общему числу птиц в опытной группе.

Таблица 50 – Проектное действие вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» на 1- и 14-суточных цыплятах при контрольном заражении через 21 суток после прививки спрей-методом

№ группы	Голов	Количество случаев заболевания, в т.ч. погибших	Pr
1 (опыт)	20	9	0,55
2 (опыт)	20	6	0,70
3 (контроль-)	20	0	-
4 (контроль)	20	20	-

Таблица 50 демонстрирует результаты контрольного заражения цыплят вирусом НБ VII генотипа штамма «ВНИИЗЖ G7» через 21 сутки после иммунизации. Из таблицы следует, что использованный высоковирулентный агент обусловил абсолютную гибель в контрольных группах не привитых птиц обоих возрастов (№3 и №4). В опытных группах за период наблюдений накопленные клинические патологии, включая гибель птиц, составили для цыплят, вакцинированных в возрасте 1-х суток (группа №1) - 9 из 20 голов, вакцинированных в возрасте 14-ти суток (группа №2) – 6 из 20 голов. Таким образом показатели эффективности вакцины имели величины $Pr=(1-0,45)/1 \times 100=55\%$ и $Pr=(1-0,3)/1 \times 100=70\%$, для групп №1 и 2, соответственно.

Изучение иммуногенности вакцины против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» привитой интраназально

Серонегативных к вирусу НБ цыплят в случайном порядке разделили на две группы по 20 голов: опытную и контрольную.

Из образцов экспериментальной серии вакцины приготовили лекарственную форму (суспензию). В одной прививной дозе содержалось 5,5 lg ЭИД₅₀ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса НБ.

Опытную группу иммунизировали вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» интраназально в прививном объеме 0,1 см³. Группу №2 (контроль) не вакцинировали.

Через 21 сутки после вакцинации у опытной и контрольной групп отобрали кровь для исследований сывороток в РТГА на наличие антител к вирусу НБ (таблица 51), и далее провели заражение вирулентным штаммом «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ VII генотипа путем внутримышечной инъекции в дозе (6,0±0,3) lg ЭИД₅₀ в объеме 1,0 см³.

Таблица 51 – Титр антител к вирусу НБ в РТГА до и после прививки вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» 14-суточным цыплятам интраназально

Сут. п/в*	Группа	Число проб соответственно установленных значений титров антител в РТГА								
		Кол-во проб	0	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	(T±s)**, log ₂
0		5	5							0,00
21 сут.	1 (опыт)	20		3	7	6	2	2		4,65±0,26
21 сут.	2 (контроль)	20	20							0,00

Примечание:

* - суток после вакцинации;

** - средний логарифмический титр по группе и его стандартная ошибка

Из данных таблицы 51 следует, что эксперимент проводили на серонегативном поголовье. Через 21 сутки у всех иммунизированных цыплят присутствовала выраженная иммунная реакция на прививку. Среднелогарифмический титр составил (4,65±0,26) log₂.

После контрольного заражения в течение 14 суток за цыплятами установили наблюдение. Регистрировали клинически признаки НБ или гибель птицы (таблица 52). Об иммуногенности вакцины, испытанной в различных прививных дозах, судили по величине показателя эффективности вакцинации Pr.

Таблица 52 - Протективное действие вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» на 14-суточных цыплятах при контрольном заражении через 21 суток после интраназальной прививки

№ группы	Голов	Количество случаев заболевания, в т.ч. погибших	Протективный индекс, Pr
1 (опыт)	20	4	0,8
2 (контроль)	20	20	-

Из таблицы 52 следует, что использованный высоковирулентный агент обусловил абсолютную гибель в группе непривитых птиц (№2). В опытной группе за период наблюдений заболело 4 из 20 голов. Таким образом показатель эффективности вакцины имел величину $E=(1-0,2)/1 \times 100=80\%$.

3.2.4.4 Клинические испытания вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» живой сухой

Клинические испытания вакцины против болезни Ньюкасла из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» проводили в производственных условиях на птицефабриках ГК «Черкизово» АО «Куриное царство» (АО «КЦ») и ГАП «Ресурс» на экспериментальной серии вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» № 010423.

В АО «КЦ» Узловская птицефабрика, бройлерный цех «Узловская» Тульской области клинические испытания проводили на цыплятах-бройлерах кросса «Ross-308» в количестве 1,0 млн. голов. Клинические испытания в АО «КЦ» Курский филиал, бройлерный цех №3 проводили на цыплятах-бройлерах кросса «Ross-308» в количестве 1 000 015 голов.

Испытания в ООО «Ставропольский бройлер» проводили на цыплятах-бройлерах кросса «Ross-308». Прививаемое поголовье в филиале «Благодарненский» площадке «Бурлацкая» составило 1600,0 тыс. гол, в подразделении «Овощное» -1200 тыс. гол, в обособленном подразделении «Баевское» - 353,0 тыс.гол. Условия содержания и кормления цыплят на всех производственных площадках, где проходили клинические испытания вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн», соответствовали зоогигиеническим нормативам для данной возрастной группы.

***Испытания вакцины против ньюкаслской болезни из штамма
«ВНИИЗЖ НБ-Эн» в условиях птицеводства АО «КЦ» Узловская
птицефабрика, бройлерном цехе «Узловская»***

Иммунизация цыплят в количестве одного миллиона голов в хозяйстве была проведена успешно, каких-либо поствакцинальных реакций у птицы не наблюдали. В течение периода наблюдений, продолжавшегося 10 суток, вся иммунизированная птица оставалась живой, без каких-либо отклонений от нормы. Отказа от корма у цыплят не наблюдали, угнетение у птицы отсутствовало. Признаков ньюкаслской болезни у вакцинированной птицы не наблюдали, патологоанатомическое вскрытие не требовалось. За период наблюдений производственные показатели в группе иммунизированного вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» поголовья не отличались от данных по хозяйству.

***Испытания вакцины против ньюкаслской болезни из штамма
«ВНИИЗЖ НБ-Эн» в условиях птицеводства
АО «КЦ» Курский филиал, бройлерном цехе №3***

Оценка безвредности и эффективности вакцины «ВНИИЗЖ-НБ-Эн». После проведенной прививки вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» цыплятам бройлерам в возрасте 0 суток и 9 суток в количестве 1 000 015 голов каких-либо поствакцинальных осложнений не отмечено. Иммунизированная птица оставалась активной, угнетения и отказа от корма не наблюдали. Признаки болезни Ньюкасла у привитой птицы отсутствовали. За период наблюдений привесы цыплят не снизились, а значит производственно-экономические показатели в хозяйстве оставались в пределах нормы по нормативам кросса.

***Испытания вакцины против ньюкаслской болезни из штамма
«ВНИИЗЖ НБ-Эн» в ООО «Ставропольский бройлер»***

Вакцина «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в филиале «Благодарненский» площадке «Бурлацкая» ООО «Ставропольский бройлер» применялась спрей-методом на 1-суточных цыплятах бройлерах; в подразделении «Овощное» - на 11-суточных

цыплятах-бройлерах интраокулярно; в обособленном подразделении «Баевское» - на 23-суточных цыплятах-бройлерах выпойкой.

За время содержания птицы каких-либо побочных явлений от применения вакцины и осложнений выявлено не было.

Согласно плановым работам на производственных площадках ООО «Ставропольский бройлер» после применения вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» проводили серомониторинг НБ, результаты которого представлены в таблице 53.

Таблица 53 – Титры антител к ВНБ в сыворотках крови иммунизированных бройлеров вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» на производственных площадках «Бурлацкая» (I), «Овощная» (II) и «Баевское» (III) в ООО «Ставропольский бройлер»

Значения титров антител к вирусу НБ, установленных в РТГА в пробах сывороток соответственно производственным площадкам (Пл) и корпусам (К)										
Пл	К	n*	Количество образцов соответственно величине титра							$\log_2('T \pm 2S)^{***}$
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
I	н\у**	18			1	9	8			4,38±1,18
II	5	18				9	4	5		5,78±1,76
	11	18			7	1	8	2		5,28±2,25
	13	18		1	4	5	5	3	1	5,28±2,36
	22	18		1	1	2	9	5	1	5,89±2,16
	3	18		1	1	8	4	4	1	5,50±2,20
III	4	18			4	5	2	7		5,06±3,39
	6	18				6	6	5	1	5,06±1,88

Примечания: * - количество исследованных образцов;

** - номер корпуса не указан;

*** - средний логарифмический титр (T) и два стандартных отклонения (2S), соответствует величине доверительного интервала для $p \approx 0,05$.

Из данных таблицы 53 следует, что на всех производственных площадках птицы имели гуморальный иммунитет против НБ. Анализ полученных результатов показал, что распределения выборочных значений логарифмических титров в корпусах, в большинстве случаев, было близко к нормальному. Отношения вида S/T находились в границах (0,14 ÷ 0,34). На этом основании средние значения

титров считали пригодными для характеристики средней напряженности гуморального иммунного ответа по корпусам.

Во всех корпусах средняя оценка титра антител была выше нижней границы показателя напряженности поствакцинального гуморального иммунитета против НБ (1:16 или $4,0 \log_2$), рекомендованного ВОЗЖ [526]. Это означает, что примененный в использованной схеме вакцинации препарат был антигенно активен. Если принять, что порядок применения вакцины и условия содержания птицы в корпусах идентичны, то из 144 исследованных проб 85,4% имели оценки титра, соответствующие приемлемому уровню.

Исследовали возможное влияние применения вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» на эффективность производственного процесса. В таблице 54 представлены технологические показатели выращивания бройлеров, установленные в двух турах: до и после применения вакцины.

Таблица 54 - Влияние вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» на эффективность процесса выращивания цыплят-бройлеров на производственных площадках «Бурлацкая», «Овощная» и «Баевская» предприятия ООО «Ставропольский бройлер»

Значения производственных показателей (x) соответственно площадкам до (x_0) и после (x_1) применения вакцины, а также оценка разности значений $z = x_1 - x_0$.									
Показатель	Бурлацкая			Овощная			Баевская		
	x_0	x_1	$z=x_1-x_0$	x_0	x_1	$z=x_1-x_0$	x_0	x_1	$z=x_1-x_0$
Ср/суточный привес, г	59,5	58,5	-1,0	60,8	65,2	4,4	60	60	0
Средний вес головы (W), кг	2,206	2,111	-0,095	2,192	2,529	0,337	2,175	2,152	-0,023
Конверсия корма (FCR)	1,56	1,52	-0,040	1,49	1,52	0,03	1,5	1,48	-0,02
Сохранность (Saf), %	93,4	95,2	1,8	95,1	95,6	0,5	95,4	95,9	0,5
ЕРЕФ*	363	374	0,363	395	416	50,409	404	393	2,931

Примечание: * - European Efficiency Productivity Factor (Европейский индекс производительности) – оценка эффективности производства мяса бройлеров $EPEF = ((Saf \times W) / (L \times FCR)) \times 100$, где: Saf – сохранность, %; W – средний вес головы, кг; L – период содержания, сут ($L=38$); FCR – конверсия корма.

Из данных таблицы 54 следует, что применение вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» по большинству зачетных показателей, характеризующих эффективность процесса выращивания цыплят-бройлеров, в среднем по производственным площадкам, оказало положительное влияние. А именно, средние значения разностей z («до и после») составили:

Ср/суточный привес, г: $(-1,0+4,4+0,0)/3=1,133$;

Ср/вес головы, кг: $(-0,095+0,337-0,023)/3=0,219$;

Конверсия корма: $(-0,040+0,03-0,02)/3=-0,010$;

Сохранность, %: $(1,8+0,5+0,5)/3=0,933$;

ЕРЕФ: $(0,363+50,409+2,931)/3=17,901$.

Из рассмотренных средних оценок после применения вакцины только показатель конверсии корма оказался в отрицательной области (-0,010 пункта), тогда как интегральная оценка ЕРЕФ (Европейский индекс производительности) возросла на 17,901 пункта.

По совокупности полученных результатов клинические испытания вакцины на основе штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» подтвердили ее безвредность и антигенную активность

Результаты проведенных доклинических исследований и клинических испытаний показали, что вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» при соблюдении технологии изготовления, условий хранения и Инструкции по применению показала себя качественным препаратом, который можно безопасно и с высокой эффективностью использовать для профилактики ньюкаслской болезни.

На основании проведенных научных исследований по разработке живой вакцины против болезни Ньюкасла, доклинических и клинических испытаний было разработано регистрационное досье и «Вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сухая живая» была зарегистрирована 16.10.2023 г.

3.3 Вакцинопрофилактика высокопатогенного гриппа птиц H5

3.3.1 Изучение иммуногенности вакцин из высокопатогенного и низкопатогенного гриппа птиц H5

В настоящее время в мире наблюдается распространение ВГП, вызванного вирусом типа А подтипа H5. Считается, что этот подтип является одним из наиболее опасных в плане возникновения пандемий. При сравнении выделенных изолятов вируса гриппа птиц обнаруживается чрезвычайно высокая их генетическая и антигенная вариабельность. Это обстоятельство вынуждает вести постоянный поиск новых изолятов вируса гриппа птиц, пригодных для изготовления диагностических и вакцинных препаратов [275; 279; 299; 388; 486]. Поэтому на протяжении нескольких лет научные сотрудники ФГБУ «ВНИИЗЖ» вели поиск изолятов кандидатов низкопатогенного гриппа птиц H5N1 для производства вакцин против высокопатогенного гриппа.

В 2021 г. сотрудниками референтной лаборатории диагностики вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» был выделен вирусный изолят A/wildduck/YaNAO/956-12 из проб патологического материала от дикой утки, отобранного на территории Ямало-Ненецкого Автономного Округа Российской Федерации. По результатам молекулярных исследований было установлено, что это низковирулентный изолят вируса гриппа птиц подтипа H5 и дано рабочее название «Ямал».

Было проведено сравнение иммуногенности образцов инактивированных вакцин из НГП H5 изолята «Ямал» с полученными ранее производственным ВГП H5N1 штамм «Приморский» против актуальных высоковирулентных вариантов вируса гриппа птиц подтипа H5.

Для изготовления антигенов использовали осветленные вирусные материалы штаммов ВГП H5 штамм «Приморский» и НГП H5 изолят «Ямал», полученные после культивирования в развивающихся куриных эмбрионах, инактивированные аминоэтилэтиленимином (0,25%) в течение 24 ч при температуре 22 °С. На основе вирусных антигенов и масляного адъюванта готовили эмульсионные вакцины.

Каждый антиген был приготовлен в нескольких разведениях. В качестве масляного адъюванта использовали Montanid ISA 70 (SEPPIC, Франция) в соотношении антигенсодержащей фазы и масла 30:70 (по весу). При приготовлении вакцин активный компонент (антиген) объединяли с масляным адъювантом и эмульгировали на высокоскоростном лабораторном эмульсоре Silverson (Великобритания). В результате были получены образцы эмульсионной вакцины с заданной концентрацией антигена.

В эксперименте использовали цыплят яичного кросса «Ломан браун» в возрасте 4 недель, серонегативных к вирусу гриппа птиц, из хозяйства, благополучного по острым инфекционным болезням. Каждый образец вакцины (с заданной концентрацией антигена) был введен отдельной группе птиц внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$ в область бедра.

Для оценки напряженности поствакцинального гуморального иммунитета через 28 сут после вакцинации у иммунизированных и контрольных птиц отбирали пробы крови для получения сывороток, в которых с применением РТГА определяли титр антител к вирусу гриппа.

При оценке протективного эффекта вакцин через 28 сут после иммунизации цыплят всех групп заражали и регистрировали клиническое состояние птиц и летальное действие вируса. При заражении птиц вирус ВГП в дозе не менее $6,0 \text{ lg ЭИД}_{50}$ вводили вакцинированным и контрольным птицам внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$ в область бедра.

Оценивали иммунологические свойства двух инактивированных вакцин:

- вакцина на основе антигена вируса НГП Н5 изолят «Ямал». Инфекционная активность вирусного материала до инаktivации составляла $9,6 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Инактивированный материал содержал $10 \log_2 \text{ ГАЕ}/0,1 \text{ см}^3$. Испытывали образцы, имеющие относительную концентрацию антигена (D): 1; 25; 50 и 100;

- вакцина на основе антигена вируса ВГП Н5 штамма «Приморский». Инфекционная активность вирусного материала до инаktivации составляла $9,2 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Инактивированный материал содержал $8 \log_2 \text{ ГАЕ}/0,1 \text{ см}^3$. Испытывали образцы, подготовленные по аналогии с вакциной НП.

Провели два эксперимента (I, II), в которых исследовали три комбинации вирусов-пробойников и вакцин с разными прививными дозами антигенов.

Эксперимент I. Образцами препарата на основе НГП H5N1 штамма «Ямал», имеющими заданное содержание антигена (D), иммунизировали четыре группы птиц по 20 голов. Параллельно, в качестве контроля вируса-пробойника, содержали группу не вакцинированных птиц (n=10). Через 28 суток после вакцинации у всех птиц произвели отбор проб крови и провели контрольное заражение вирусом ВГП H5N1 штамма «Приморский» в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀ (вирус-пробойник). В течение десяти суток после контрольного заражения ежедневно проводили клинический осмотр птиц. В каждой группе регистрировали клиническое проявление гриппа, гибель заболевших особей и определяли показатели иммунной защиты - протективные индексы (Pr) и соответствующие им линейные эквиваленты: $Y = \lg(\text{Pr}/(1-\text{Pr}))$. Полученные результаты представлены в таблице 55.

Таблица 55 – Протективный эффект вакцины на основе вирусного антигена НГП H5N1 штамм «Ямал» (Ag_{Jm}) при заражении вирусом ВГП H5N1 штамм «Приморский» (V_{Pr})

Протективные индексы и их линейные эквиваленты, установленные соответственно испытанным прививным дозам иммунизирующего антигена в препарате			
Разведение антигена (D)	ГAE в дозе (A)*	Индекс защиты (P)**	Эквивалент индекса $Y = \lg(\text{Pr}/(1 - \text{Pr}))$
1	1740,80	20/20 (Pr ₁ = 0,99) [#]	1,996
1/25	69,63	17/20 (Pr = 0,85)	0,753
1/50	34,82	14/20 (Pr = 0,70)	0,368
1/100	17,41	7/20 (Pr ₀ = 0,35)	-0,269
Контроль	—	0/10 (н/о***)	н/о

Примечания:

- * - $A = 1,7A_0/D$, где A_0 – содержание ГAE / 0,1 см³ цельном антигенном материале; D – разведение материала;
- ** - $\text{Pr} = \sum e/n$, где $\sum e$ – число защищенных (клинически здоровых) вакцинированных птиц на конец опыта; n – общее число птиц в данной группе;
- *** - не определяли
- # - условная оценка $\text{Pr}_1 = (1 - 1/5n)$;

Данные таблицы 55 использовали для изучения связи между величиной иммунизирующей дозы антигена и протективным эффектом вакцины в комбинации V_{Pr}/Ag_{Jm} . Для приближения искомой зависимости к линейному виду исследовали регрессию эквивалентов протективных индексов f по $\lg D$. Была построена регрессионная модель, позволяющая прогнозировать ожидаемую величину протективного эффекта (долю защищенных птиц) для заданной прививной дозы антигена. Соответствующие результаты в графическом виде приведены на рисунке 20.

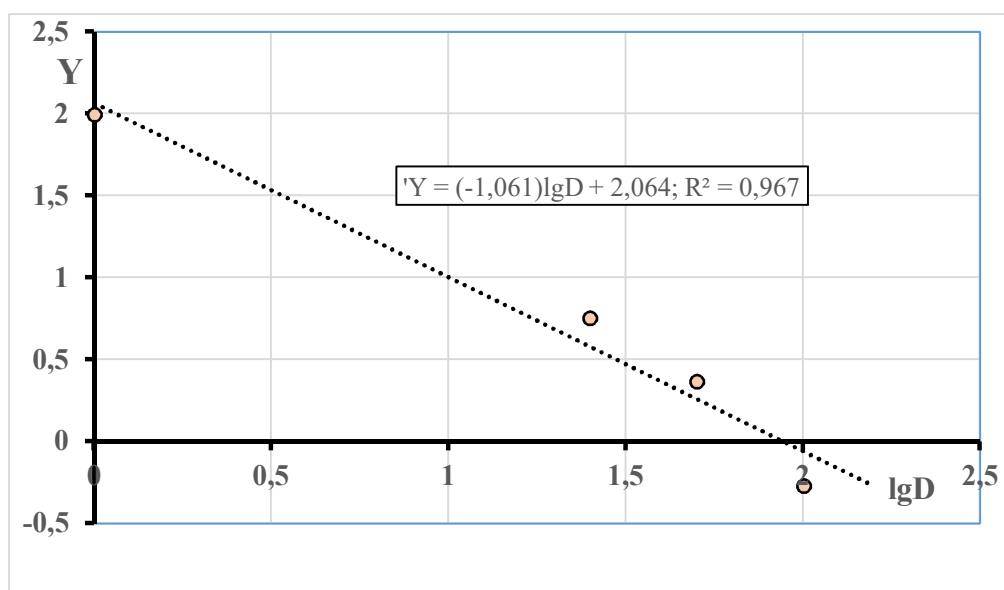


Рисунок 20 - Зависимость между прививной дозой ($\lg D$) антигена НГП H5N1 штамма «Ямал» (Ag_{Jm}) и эквивалентом индекса защиты вакцины (f) против ВГП H5N1 штамма «Приморский» (V_{Pr}). Для комбинации V_{Pr}/Ag_{Jm} показаны: первичные данные ($\circ$), регрессионное уравнение вида $Y = (-1,061)\lg D + 2,064$ (где Y – прогнозируемая величина для заданного $\lg D$); $R^2 = 0,967$ – оценка адекватности построенной модели. Горизонтальная ось графика пересечена в точке $f = 0$, соответствующей коэффициенту $Pr = 0,5$, т. е. в точке 50% -го эффекта защиты вакцинированной птицы.

Данные, представленные на рисунке 20 демонстрируют, что построенная модель имела высокий уровень адекватности ($R^2 = 0,967$), и это позволило использовать ее для дальнейших операций по исследованию влияния дозы антигена на протективную функцию вакцины против гриппа птиц.

Эксперимент II. Иммунизировали четыре группы птиц по девять голов образцами вакцины, содержащими, по аналогии с экспериментом I, заданные дозы

антигена НГП Н5N1 штамма «Ямал». Кроме этого иммунизировали четыре группы птиц по десять голов образцами вакцины, содержащими в таких же разведениях антиген ВГП Н5N8 штамма «КЧР». Параллельно, в качестве контролей штаммов-пробойников, содержали группы не вакцинированных птиц (n=10). Через 28 суток после вакцинации у всех птиц произвели отбор проб крови и провели контрольное заражение вирусом ВГП Н5N8 штамма «КЧР» в дозе 6,7 lg ЭИД₅₀. Дальнейшие процедуры выполняли по аналогии с экспериментом I.

Результаты, полученные в эксперименте II, соответственно испытанным комбинациям «контрольный вирус/вакцинный антиген» в виде индексов защиты и их линейных эквивалентов, объединены в таблице 56.

Таблица 56 - Протективный эффект вакцин на основе вирусных антигенов НГП Н5N1 штамма «Ямал» (Ag_{Jm}) и ВГП Н5N1 штамма «Приморский» (Ag_{Pr}) при контрольном заражении птиц вирусом ВГП Н5N8 штамм «КЧР» (V_K)

Протективные индексы и их линейные эквиваленты, установленные соответственно испытанным комбинациям «V/Ag» и прививным дозам антигена*				
Комбинация	Разведение антигена (прививная доза, D)	ГAE в дозе (A)	Индекс защиты (Pr)	Эквивалент индекса $Y = \log (Pr / (1 - Pr))$
V _K /Ag _{Jm}	1	1740,80	9/9 (Pr = 0,98)	1,690
	1/25	69,63	9/9 (Pr = 0,98)	1,690
	1/50	34,82	6/9 (Pr = 0,67)	0,308
	1/100	17,41	5/9 (Pr = 0,56)	0,105
Контроль	-	-	0/10 (н/о)	н/о
V _K /Ag _{Pr}	1	870,40	10/10 (Pr = 0,98)	1,690
	1/25	34,82	8/10 (Pr = 0,80)	0,602
	1/50	17,41	4/10 (Pr = 0,40)	-0,176
	1/100	8,70	2/10 (Pr = 0,2)	-0,602
Контроль	-	-	0/10 (н/о)	н/о

* - Примечания даны в таблице 55.

По аналогии с экспериментом I, данные таблицы 56 использовали для изучения зависимости между эквивалентами протективных индексов (f) и

логарифмическими величинами прививных доз антигена (lgD). Для обоих испытанных комбинаций «V/Ag» были построены соответствующие регрессионные модели, которые совместно с первичными данными приведены на рисунке 21.

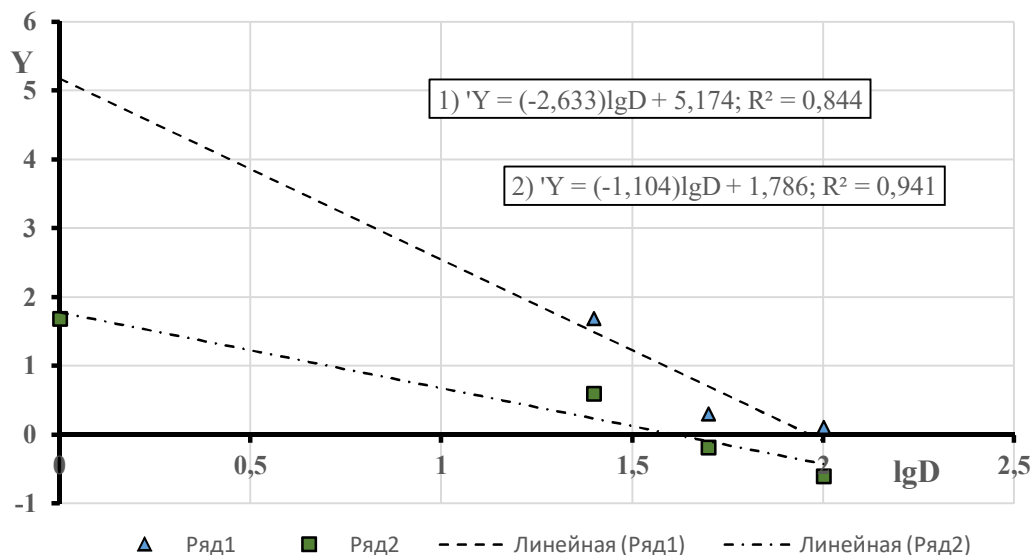


Рисунок 21 - Зависимость между прививными дозами антигенов (lg D) и эквивалентами протективных индексов вакцин (Y), установленная по результатам контрольного заражения птиц вирусом ВГП подтипа H5N8 штамма «КЧР» (V_K), иммунизированных вакцинами на основе вирусных антигенов НГП H5N1 штамма «Ямал» (Ag_{Jm}) и ВГП H5N1 штамма «Приморский» (Ag_{Pr}). Соответственно комбинациям V/Ag показаны первичные данные, регрессионные уравнения (где 'Y – прогнозируемое значение эквивалента индекса для заданного lgD) и коэффициенты адекватности моделей (R^2):

- V_K/Ag_{Jm} (Δ , ряд 1): $Y = (-2,633)lgD + 5,174$; $R^2=0,844$;

- V_K/Ag_{Pr} ($\square$, ряд 2): $Y = (-1,104)lgD + 1,786$; $R^2=0,941$.

Горизонтальная ось пересечена в точке $Y = 0$, соответствующей $Pr = 0,5$ (т. е. в точке защиты 50%).

Данные на рисунке 21 показывают, что регрессионные модели, построенные для комбинаций V_K/Ag_{Jm} и V_K/Ag_{Pr} , имели вполне приемлемые коэффициенты адекватности (R^2 : 0,844 и 0,941, соответственно), что, в свою очередь, позволило использовать указанные уравнения для дальнейшего анализа иммунологических свойств тестируемых вакцин.

На следующем этапе исследований определяли «протективный потенциал» вакцинных препаратов в виде оценок PD_{50} . Указанная оценка для заданной комбинации V/Ag характеризует концентрацию антигена, которая в прививном объеме вакцины способна обеспечить защиту 50% вакцинированных птиц (т. е. $Pr = 0,5$, что соответствует линейному эквиваленту $Y_{0,5} = 0$). Значение PD_{50} численно соответствует величине разведения цельного антигена в вакцине, при котором условие $P = 0,5$ выполняется.

Для вычислений PD_{50} использовали регрессионные уравнения, построенные для всех испытанных комбинаций V/Ag, приведенные на рисунках 20 и 21. Расчет искомой величины выполняли по формуле.

$$\lg PD_{50} = b/(-k),$$

где: b – свободный член регрессионного уравнения (ордината линии регрессии); k – регрессионный коэффициент.

Статистическую неопределенность показателя $\lg PD_{50}$ [Прозоровский В.Б., 2007] в виде стандартной ошибки измерения ($\pm s$) вычисляли, используя формулу:

$$s = (\lg D_{84} - \lg D_{16})/(2\sqrt{n}),$$

где: $\lg D_{84} = (b - 0,72)/(-k)$; $\lg D_{16} = (b + 0,72)/(-k)$.

Определяли прогнозируемую концентрацию ГАЕ антигена, которая в прививном объеме вакцины, в заданной комбинации V/Ag, обеспечивает 95% защиты вакцинированной птицы (т. е. $P=0,95$). Расчет выполняли по формуле:

$$A_{95} = 1,7A_0/D_{95},$$

где A_0 – содержание ГАЕ/0,1 см³ в цельном антигенном материале; $\lg D_{95} = (b - 1,279)/(-k)$.

Для вычисления показателей $\lg PD_{50 \pm s}$ и A_{95} , установленных соответственно всем испытанным комбинациям V/Ag, использовали первичные данные из таблиц

55 и 56, а также уравнения, показанные на рисунках 20 и 21. Полученные результаты приведены в таблице 57.

Таблица 57 - Показатели $\lg PD_{50 \pm s}$ и $\log_2 A_{95}$, характеризующие иммунологические свойства вакцин на основе вирусных антигенов НГП H5N1 штамм «Ямал» (Ag_{Jm}) и ВГП H5N1 штамм «Приморский» (Ag_{Pr}), установленные соответственно испытанным комбинациям V/Ag*

Комбинация	$\lg PD_{50 \{ \pm lgs \}}$	$PD_{50} \{ PD_{50} / 10^s \div PD_{50} \times 10^s \}^{**}$	$\log_2 A_{95}$
V_{Pr}/Ag_{Jm}	$2,064/1,061 = 1,945 \{0,339\}$	$88,1 \{40,3 \div 192,4\}$	8,31
V_K/Ag_{Jm}	$5,174/2,633 = 1,965 \{0,158\}$	$92,3 \{64,1 \div 132,7\}$	5,85
V_K/Ag_{Pr}	$1,786/1,104 = 1,617 \{0,360\}$	$41,4 \{18,1 \div 94,8\}$	8,24

Примечание: *- показана оценка D_{50} и ее отклонения в границах стандартной ошибки измерения.

При анализе данных приведенных в таблице 57 следует, что установленные в эксперименте в заданных комбинациях V/Ag оценки PD_{50} формально были не одинаковы. Например, вакцина на основе антигена штамма «Ямал» против вируса штамма «КЧР» (V_K/Ag_{Jm}) имела показатель $PD_{50} = 92,3$, при этом препарат на основе антигена штамма «Приморский» против указанного вируса (V_K/Ag_{Pr}) показал более чем в два раза меньшую оценку $PD_{50} = 41,4$. Вакцина на основе антигена «Ямал» против вируса штамма «Приморский» (V_{Pr}/Ag_{Jm}) имела показатель $PD_{50} = 88,1$. Однако, учитывая значения стандартных ошибок полученных эмпирических оценок PD_{50} , судить о различиях протективных потенциалов тестируемых препаратов допустимо только в тенденции, поскольку на уровне $p \leq 0,05$ рассмотренные показатели не имели статистических различий.

Также, в виде тенденции, следует отметить, что для достижения 95% защиты вакцинированных птиц, гемагглютинирина вируса низкопатогенного гриппа штамма «Ямал» против высокопатогенного гриппа штамма «КЧР» (V_K/Ag_{Jm}) требовалось в 5,5 раза меньше, чем в комбинации V_{Pr}/Ag_{Jm} ($8,31 - 5,85 = 2,46 (\log_2)$; $2^{2,46} = 5,5$). Аналогичные показатели в комбинациях V_{Pr}/Ag_{Jm} и V_K/Ag_{Pr} были близкими.

Таким образом, можно заключить, что вакцины на основе антигенов НГП по иммуногенности не уступают, а даже превосходят препараты на основе антигенов ВГП, а также являются более технологичными в аспекте производства.

Проводили анализ связи между протективной функцией и напряженностью поствакцинального гуморального иммунитета против гриппа птиц. Исследовали зависимость величины эквивалентов показателей протективного эффекта (Y) от значений $\log_2 T$, установленных в группах птиц, иммунизированных заданными дозами антигенов. Полученные результаты представлены в таблице 58.

Таблица 58 – Титр антител к вирусу ГП Н5 в сыворотках крови птиц, привитых вакцинами на основе антигенов вируса НГП Н5N1 штамм «Ямал» и антигена вируса ВГП Н5N1 штамм «Приморский»

Средние логарифмические титры антител ($\log_2 T$), установленные в РТГА с гомологичными антигенами и эквиваленты индексов защиты (Y) соответственно испытанным прививным дозам (D) иммунизирующего антигена			
Антиген	D	$\log_2 T \pm s^*$	Y^{**}
НГП Н5N1 штамм «Ямал»	1	$10,1 \pm 0,4$	1,996
	1/25	$6,9 \pm 0,4$	-0,368
	1/50	$6,7 \pm 0,5$	-0,477
	1/100	$3,9 \pm 0,6$	-1,996
	1	$9,6 \pm 0,5$	1,690
	1/25	$7,9 \pm 0,6$	0,308
	1/50	$6,2 \pm 0,4$	-0,308
	1/100	$5,6 \pm 0,4$	-0,908
ВГП Н5N1 штамм «Приморский»	1	$9,8 \pm 0,4$	1,690
	1/25	$6,5 \pm 0,5$	0,000
	1/50	$5,6 \pm 0,5$	-0,176
	1/100	$5,2 \pm 0,5$	-0,954

Примечания:

* - стандартное отклонение среднего значения;

** - $Y = \log (P/(1 - P))$, где P – значение индекса защиты ($P = pr/n$; pr – количество защищенных (выживших) особей; n – общее число птиц в данной группе).

Изучали связь между показателями гуморальной иммунной реакции ($\log_2 T$) вакцинированных и эквивалентами индексов защиты (f). Для построения модели связи в системе « $\log_2 T - f$ » использовали регрессионный метод. Полученные результаты приведены на рисунке 22.

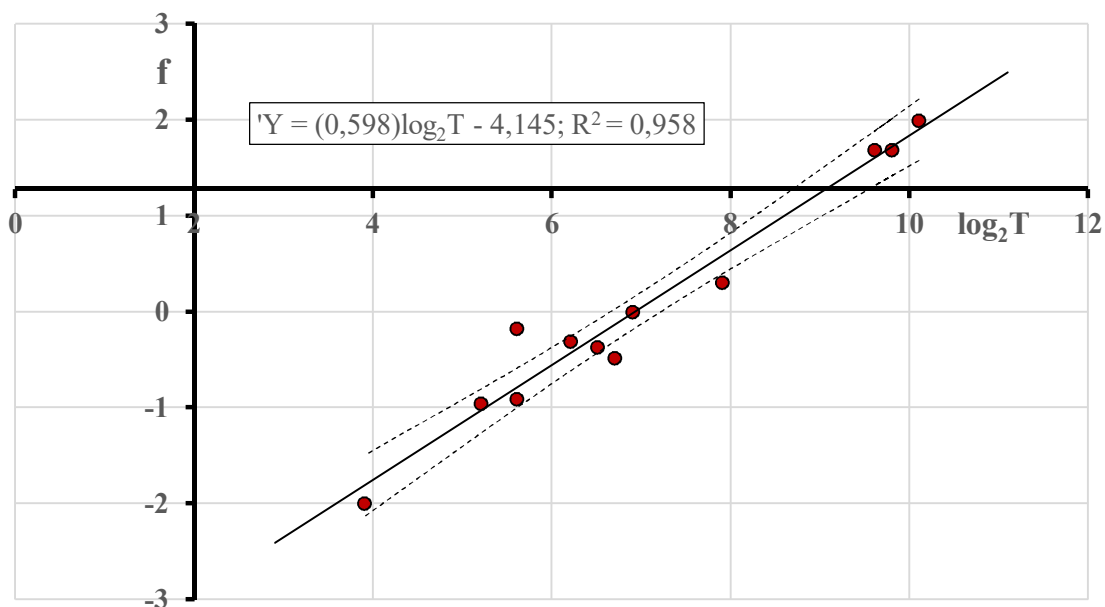


Рисунок 22 - Зависимость между средним логарифмическим титром антител ($\log_2 T$) и эквивалентом индекса защиты (Y) у птиц, иммунизированных птиц, привитых вакцинами на основе антигена вируса НГП Н5N1 штамма «Ямал» и на основе антигена вируса ВГП Н5N1 штамма «Приморский». Ось ординат пересечена в точке $Y = 1,279$, соответствующей $P = 0,95$ (т. е. 95% защиты). Приведено регрессионное уравнение вида $Y = (0,598) \log_2 T - 4,145$, где Y – ожидаемая величина эквивалента для заданного $\log_2 T$. Пунктиром показаны границы доверительного интервала ($p = 0,05$) регрессии.

Приведенное уравнение вида $fY = (0,598) \log_2 T - 4,145$ позволило определить прогнозируемый титр антител, при котором ожидаемая защита вакцинированной птицы достигнет 95% ($Y_{95} = 1,279$). Искомое значение составило $\log_2 T_{95} = (4,145 + 1,279)/0,598 = 9,07$, или $T = 538$. Границы доверительного интервала ($p = 0,05$) указанной оценки составили $8,67 \leq \log_2 T_{95} \leq 9,60$, или $407 \leq T_{95} \leq 776$.

Таким образом, антиген вируса низкопатогенного гриппа птиц штамма «Ямал» подтипа Н5N1 в составе инаktivированной эмульгированной вакцины способен индуцировать выработку напряженного иммунитета у кур против

высокопатогенного гриппа птиц. На основании результатов, полученных в ходе проведенных исследований, были сделаны следующие выводы:

- инактивированная вакцина на основе антигена вируса НГП H5N1 штамма «Ямал» способна вызывать дозозависимый перекрестный иммунитет против вируса ВГП H5N1 штамма «Приморский». Прививной объем вакцины содержит 88,1 PD₅₀. Для защиты 95% вакцинированной птицы прививная доза антигена должна составлять не менее 317 ГАЕ;

- инактивированная вакцина на основе антигена вируса НГП H5N1 штамма «Ямал» способна вызывать дозозависимый перекрестный иммунитет против вируса ВГП H5N8 штамма «КЧР». Прививной объем вакцины содержит 92,3 PD₅₀. Для защиты 95% вакцинированной птицы прививная доза антигена должна составлять не менее 57,68 ГАЕ;

- инактивированная вакцина на основе антигена вируса ВГП H5N1 штамма «Приморский» способна вызывать дозозависимый перекрестный иммунитет против вируса ВГП H5N8 штамма «КЧР». Прививной объем вакцины содержит 41,4 PD₅₀. Для защиты 95% вакцинированной птицы прививная доза антигена должна составлять не менее 302,33 ГАЕ;

- протективный эффект испытанных инактивированных вакцин связан с напряженностью гуморального иммунитета птицы. Прогнозируемый титр антител, при котором ожидаемая защита вакцинированной птицы достигнет 95%, составил $T_{95} = 538$. Границы доверительного интервала ($p = 0,05$) указанной оценки имели вид $407 \leq T_{95} \leq 776$. Показатель T_{95} может быть полезен для опосредованной оценки напряженности поствакцинального иммунитета.

В дальнейшем вакцина из низкопатогенного вируса гриппа птиц получила рабочее название «АвиФлуВак» и была исследована параллельно с коммерческим препаратом против ВГП «Флу Протект Н5», который рассматривали как положительный контроль.

В качестве тест-объектов использовали товарных цыплят, серонегативных к вирусу гриппа птиц. Вакцины испытывали в 1/5 и в цельной прививных дозах. Определяли и сравнивали следующие показатели:

- поствакцинальный титр антител к вирусу ГП через 21 сутки после иммунизации;
- протективный коэффициент в остром опыте (процент защищенных вакцинированных птиц после контрольного заражения вирусом ВГП через 21 сутки после иммунизации);
- титр инфекционного вируса ВГП в ротоглоточных и клоакальных пробах в остром опыте в динамике (через заданные интервалы времени в течение 14 суток после контрольного заражения);
- коэффициент прироста титра антител к вирусу ГП в остром опыте (показатель соотношения величин поствакцинального титра и титра, установленного через 14 суток после контрольного).

Вакцины вводили подкожно в дорсальную часть верхней трети шеи, в объемах 0,1 см³ (1/5 дозы) и 0,5 см³ (1 доза). Птиц группы К (контроль) не вакцинировали.

Для контрольного заражения использовали штамм A/chicken/Stavropol/2077-6/21 H5N1 вируса ВГП подтипа H5. Заражение птиц проводили через 21 сут после вакцинации в дозе более 6 lg ЭИД₅₀ методом выпойки в объеме 1,0 см³. Наблюдения клинического состояния зараженной птицы продолжали в течение 14 сут.

В каждой группе птиц, до вакцинации (0 сут), через 21 сутки после вакцинации и через 14 суток после контрольного заражения (кроме группы К), отбирали пробы крови для исследований сывороток в РТГА. Использовали диагностические наборы для выявления антител к вирусу ГП в РТГА производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Реакцию проводили с антигеном вируса ГП H5, прилагаемому к набору (Ag-«Стандарт»), а также с антигеном вируса ГП H5 штамма «Ямал» (Ag-«Ямал»).

Через сутки после контрольного заражения в каждой группе птиц, в случайном порядке, у шести голов производили отбор образцов (ротоглоточных и клоакальных мазков) для исследования в ПЦР.

Соответственно тестируемым препаратам и заданным прививным дозам, через 21 сутки после вакцинации, исследовали напряженность гуморального иммунитета птиц. В РТГА с антигенами «Стандарт» и «Ямал» определяли титры антител к вирусу ГП. Полученные результаты приведены в таблице 59.

Таблица 59 - Титры* антител к вирусу гриппа птиц H5, установленные через 21 суток после вакцинации соответственно испытанной вакцины, прививной дозы (D) и использованного в РТГА антигена (Ag)

Вакцина	1/5D		1D	
	Ag «Стандарт»	Ag «Ямал»	Ag «Стандарт»	Ag «Ямал»
Флу Протект H5	3,0±0,4**	4,5±0,3	4,2±0,3	6,0±0,5
АвиФлуВак	3,7±0,5	7,2±0,2	4,1±0,3	8,9±0,3

Примечания: * - средние логарифмические значения титров ($\log_2$);

** - дана средняя оценка (n=12) и стандартное отклонение средней.

Из данных представленных в таблице 59 следует, что:

- антиген «Ямал» во всех случаях обусловил достоверно большую чувствительность РТГА. Разность соответствующих значений титров ($\log_2$) для препарата «Флу Протект H5» находилась в диапазоне $(1,5 \pm 0,5) \div (1,8 \pm 0,6)$, для «АвиФлуВак» - $(3,5 \pm 0,5) \div (4,8 \pm 0,4)$. В арифметической размерности чувствительность реакции различалась, приближенно, от 3 до 28 раз. Очевидно, что наблюдаемое явление было обусловлено различиями структуры гемагглютинина стандартного антигена и антигена шт. «Ямал»;

- для обоих препаратов гуморальный иммунный ответ, очевидно, был положительно зависим от прививной дозы. По результатам реакции с антигеном «Ямал» возрастание титра антител ($\log_2$) с повышением дозы для препарата «Флу Протект H5» составило $1,5 \pm 0,6$, для «АвиФлуВак» аналогичный показатель был равен $1,7 \pm 0,4$. Обе оценки были достоверны. Это означало, что для обеих вакцин

увеличение прививной дозы в пять раз соответствовало приближенно трехкратному возрастанию титра антител;

- антигенная активность вакцины «АвиФлуВак» в трех из четырех позиций сравнения была выше относительно вакцины «Флу Протект Н5». По результатам реакции с антигеном «Ямал» разность значений титров ($\log_2$) для 1/5 дозы и цельной вакцины составила $2,7 \pm 0,4$ и $2,9 \pm 0,6$, соответственно. Обе оценки были достоверны. Таким образом по антигенной активности препарат «АвиФлуВак», в зависимости от прививной дозы, превосходил коммерческий аналог в 6,5 и 7,5 раза.

В опыте оценивали протективное действие вакцин «Флу Протект Н5» и «АвиФлуВак». Через 21 сутки после вакцинации всех птиц подвергли контрольному заражению. В течение 14 суток, ежедневно во всех группах проводили клинический осмотр. Регистрировали клинические признаки гриппа или гибель птицы. Специфичность гибели подтверждали патологоанатомическим исследованием. Соответственно группам птиц определяли протективные коэффициенты Pr. Полученные результаты представлены в таблице 60.

Таблица 60 - Протективное действие вакцин против высокопатогенного гриппа после контрольного заражения иммунизированных птиц

Протективные коэффициенты (Pr)*, установленные соответственно использованных прививных доз (D) вакцин		
Вакцина	1/5D	1D
Флу Протект Н5	1	1
АвиФлуВак	1	1
Контроль вируса**	0	

Примечания: * - $Pr = \Sigma e/n$, где: Σe - число защищенных птиц на конец опыта после контрольного заражения); n - количество птиц в данной группе;

** - невакцинированные птицы.

Данные таблицы 60 демонстрируют, что независимо от величины прививной дозы все вакцинированные птицы были защищены при контрольном заражении вирусом ВГП Н5, т.е. оба испытанных препарата обладали выраженным протективным действием. При этом невакцинированные цыплята пали в интервале 4-5 сут после заражения с признаками острого проявления болезни: синюшность гребня, бородок и лап, конъюнктивит, отёк подчелюстного пространства,

повышенная саливация, растяжение зоба, кровенаполненность серозных оболочек железистого желудка, кишечника и сердца, кровоизлияния на слизистой железистого желудка, прямой кишки.

Исследовали вирусвыделение у птиц после заражения высоковирулентным вирусом ГП. Через сутки после инфицирования в каждой группе в случайном порядке у шести голов ($n=6$) производили отбор образцов (ротоглоточных и клоакальных мазков) для исследования в ПЦР. В тестируемых образцах определяли пороговые циклы амплификации (C_t). Отбор образцов проводили в течение 10 суток. Полученные результаты приведены в таблице 61.

Таблица 61 - Результаты детекции генома вируса ВГП, установленные в ОТ-ПЦР-РВ в образцах ротоглоточных мазков, взятых у иммунизированных птиц после контрольного заражения

Значения пороговых циклов амплификации (Ct) соответственно испытанной вакцины, прививной дозы (D) и времени отбора образцов(Сут).					
Сут	Вакцина				Контроль
	Флу Протект Н5		АвиФлуВак		
	1/5D	1D	1/5D	1D	
1	2	3	4	5	6
1	31,46	33,15	36,55	38,41	36,74
	30,05	36,18	36,19	36,37	25,88
	33,76	35,32	35,78	38,69	26,17
	33,16	34,20	31,96	31,09	32,12
	33,33	39,00	29,73	37,15	34,66
	34,09	35,51	34,16	36,12	21,15
M _(u⁻÷u⁺)	33,25 (30,05÷33,76)*	35,32 (33,15÷36,18)	34,97 (29,73÷36,19)	36,76 (31,09÷38,41)	30,13 (25,88÷34,66)
3	35,51	34,29	31,00	35,28	28,92
	32,30	34,03	35,07	38,77	23,94
	33,20	35,86	34,81	32,36	19,15
	39,00	34,54	31,47	33,89	21,66
	33,27	32,21	30,16	38,12	22,00
	35,36	35,86	34,22	36,19	28,14
M _(u⁻÷u⁺)	34,32 (32,30÷35,51)	34,42 (32,21÷35,86)	34,35 (32,21÷35,86)	35,74 (32,36÷38,12)	21,83 (19,15÷23,94)

1	2	3	4	5	6
5	33,18	36,93	38,00	39,00	-/-
	33,46	33,65	38,59	38,12	-/-
	34,47	33,22	39,00**	36,27	-/-
	34,57	35,10	36,53	36,19	-/-
	32,35	37,35	38,57	39,00	-/-
	34,55	33,23	37,84	37,18	-/-
$M_{(u^- \div u^+)}$	33,97 (32,35÷34,55)	34,38 (33,22÷36,93)	38,29 (36,53÷38,59)	38,31 (36,27÷39,00)	
7	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	37,12	39,00	37,11	39,00	-/-
	38,62	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	37,32	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	38,31	38,12	39,00	39,00	-/-
$M_{(u^- \div u^+)}$	38,81 (37,12÷39,00)	39,00 (37,32÷39,00)	39,00 (37,11÷39,00)	39,00	
9	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
M	39,00	39,00	39,00	39,00	

Примечания: * - указаны границы доверительных интервалов медиан ($p=0,05$)

Анализ данных таблицы 61 проводили при соблюдении следующих условий:

– величина St имеет обратную зависимость от исходной концентрации вирусного генома в тестируемом образце;

– при сопоставлении выборок оценки St в порядке их получения (положения по строкам в таблице) рассматривали как парные значения. Показателем различий

пары однократных измерений (например, оценок C_{t1} и C_{t2}) служила величина разности ($d = C_{t1} - C_{t2}$). Результатом сравнения двух выборок являлся средняя разность ($\bar{d} = \sum d_i/n$) и ее стандартная ошибка ($\pm s$). Для проверки существенности различий средних тенденций в выборках использовали неравенство вида $\bar{d}/s \geq t_p$, где t_p - коэффициент Стьюдента.

Из данных таблицы 61 следует, что:

- использованный для искусственного заражения вирус ВГП был способен к репродукции в ротоглотке птицы и накапливаться в экскретах на слизистых оболочках. В контрольной группе от первых до третьих суток после инфицирования, к моменту гибели птицы, экскреция вируса существенно возросла ($\bar{d}=7,74\pm 3,03$; $p < 0,05$);

- у вакцинированных птиц во всех позициях сравнения с контролем оценки P_t на первые сутки после инфицирования не имели существенных различий, тогда как на третьи сутки п/и P_t значительно отличались от контрольных ($p < 0,05$);

- концентрация вирусного генома в пробах от вакцинированных птиц в процессе наблюдений снижалась. Продолжительность экскреции возбудителя у птиц, иммунизированных препаратом «Флу Протект Н5» для обеих испытанных доз составила не менее семи сут п/и, аналогичный показатель у препарата «АвиФлуВак» для 1/5D также равнялся семи суткам, а для 1D – пяти суткам после заражения;

- у обоих препаратов связь между величиной прививной дозы вакцины и накоплением вирусного генома в ротоглоточной области после заражения была выражена слабо: при сравнении выборок P_t между группами 1/5D и 1D ни в одной из позиций существенных различий не установлено;

- при сравнении иммунологического действия одинаковых доз тестируемых препаратов, существенно большая активность ($p < 0,05$) была зафиксирована у вакцины «АвиФлуВак» на пятые сутки после заражения. В сравнении с препаратом «Флу Протект Н5» для 1/5D и 1D средние разности оценок P_t были достоверны и составили значения $\bar{d}=4,33\pm 0,61$ и $\bar{d}=2,71\pm 0,54$, соответственно.

На основании данных таблицы 61 определяли ожидаемую величину титра инфекционного вируса ВГП ($T, \lg \text{ЭИД}_{50}/0,1\text{см}^3$) в образцах ротоглоточного экскрета птиц после искусственного заражения. Использовали эмпирическую модель связи параметров P_t и T , которая для данного метода постановки ПЦР имела вид: $T = (-0,163)P_t + 7,847$. Полученные результаты представлены на рисунке 23.

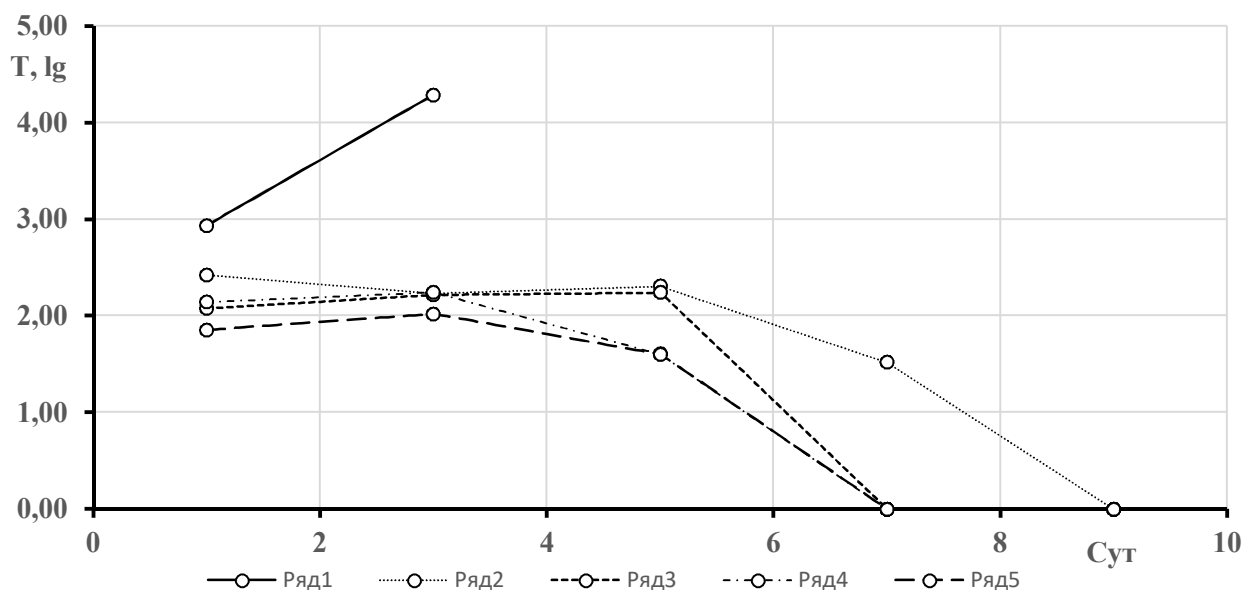


Рисунок 23 - Прогнозируемые величины титра инфекционного вируса ВГП ($T, \lg \text{ЭИД}_{50}/0,1\text{см}^3$) в ротоглоточных мазках вакцинированных птиц после искусственного заражения, рассчитанные по результатам ПЦР соответственно времени после инфицирования (Сут.), использованного препарата и прививной дозе (D). Вычисления выполнены по уравнению $T = (-0,163)P_t + 7,847$, где P_t – медианы групповых выборок пороговых циклов (см. таблицу 3). Приведены оценки, установленные для следующих групп: контроля (1); «Флу Протект Н5» 1/5D (2); «Флу Протект Н5» 1D (3); «АвиФлуВак» 1/5D (4); «АвиФлуВак» 1D (5).

Диаграмма на рисунке 23 демонстрирует следующее:

– контрольная группа птиц в течение трех суток после контрольного заражения (до наступления 100% летального эффекта) показала прогрессирующее развитие инфекционного процесса, который характеризовался накоплением в ротоглоточных экскретах инфекционного вируса высокопатогенного гриппа птиц в значениях до $4,29 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,1\text{см}^3$;

– в группах вакцинированных птиц до пяти суток после инфицирования концентрация инфекционного вируса гриппа птиц не поднималась больше уровня $2,3 \lg \text{ЭИД}_{50}/0,1\text{см}^3$, и в последующие 3 – 4 суток сокращалась до предела обнаружения. Таким образом, тестируемые вакцинные препараты против гриппа птиц были способны ограничивать накопление вируса более чем на два порядка относительно контроля.

Результаты исследования в ПЦР клоакальных образцов после контрольного заражения вирусом высокопатогенного гриппа птиц были слабо информативны. В контрольной группе птиц накопление вирусного генома на первые и третьи сутки после инфицирования характеризовалось медианными оценками 36,75 ($36,12 \div 39,00$) и 35,44 ($34,15 \div 39,00$), соответственно. При этом положительными по выборкам ($P_t < 39$) были три из шести и четыре из шести исследованных проб соответственно. При парном сопоставлении статистической разницы между показателями данных выборок не установлено.

В группе птиц, вакцинированных препаратом «Флу Протект Н5» 1/5D на первые сутки после контрольного заражения медиана St -значений составила величину 37,00 ($32,51 \div 39,00$), при этом только три из шести исследованных проб были положительными. Далее, на протяжении всего эксперимента, в клоакальных образцах от всех вакцинированных птиц геном вируса ВГП выявлен не был.

Через 14 суток после контрольного заражения провели ретроспективный анализ распространения вируса высокопатогенного гриппа птиц в организме вакцинированных птиц. Оценивали степень антигенной презентации иммунной системе. В подопытных группах птиц определяли логарифмические коэффициенты прироста титров антител. Полученные результаты исследований приведены в таблице 62.

Рекомендуемый ВОЗЖ уровень поствакцинального гуморального иммунитета, соответствующий титру антител в границах 5 - 7 ($\log_2$), для вакцины «Флу Протект Н5» был достигнут при использовании цельной прививной дозы ($6,0 \pm 0,5$), для препарата «АвиФлуВак» - при использовании 1/5 и цельной дозы ($7,2 \pm 0,2$ и $8,9 \pm 0,3$).

Таблица 62 - Титр антител к вирусу ГП в группах вакцинированных цыплят после контрольного заражения

Средние величины титров антител, установленные у птиц через 14 сут после контрольного заражения ($\log_2 T_1^*$) соответственно испытанным вакцинам и прививным дозам (D), а также коэффициенты прироста титров вида $k = \log_2 T_1 - \log_2 T_0$, где T_0 - титр антител перед заражением**; T_1 - титр антител после заражения				
Вакцина	D	$\log_2 T_1$	$k = \log_2 T_1 - \log_2 T_0$	2^k
Флу Протект Н5	1/5	6,4±0,7	$k = (6,4 \pm 0,7) - (4,5 \pm 0,3) =$ 1,9±0,8[#]	4,7 (2,1 - 6,5) ^{##}
	1	6,9±0,3	$k = (6,9 \pm 0,3) - (6,0 \pm 0,5) =$ 0,9±0,6	1,9 (1,2 - 2,8)
АвиФлуВак	1/5	8,2±0,4	$k = (8,2 \pm 0,4) - (7,2 \pm 0,2) =$ 1,0±0,5	2,0 (1,4 - 2,8)
	1	9,0±0,4	$k = (9,0 \pm 0,4) - (8,9 \pm 0,3) =$ 0,9±0,5	1,9 (1,3 - 2,6)

Примечания:

- * - величина титра в РТГА с антигеном «Ямал»;
- ** - данные из таблицы 59 (через 21 сут после вакцинации);
- # - жирным шрифтом выделена статистически значимая величина;
- ## - в скобках указаны границы диапазона стандартного отклонения коэффициента.

Данные таблицы 62 позволили считать, что незначительный, но достоверный прирост ($p < 0,05$) концентрации антител к вирусу ГП ($k = 1,9 \pm 0,8$) наблюдали только в группе, вакцинированной 1/5 дозы препарата «Флу Протект Н5». В остальных группах коэффициенты прироста статистической значимости не имели.

Однако, сопоставляя данные таблиц 61 и 62, следует отметить, что установленный в проведенном эксперименте абсолютный протективный эффект вакцин ($Pr=1$) соответствовал меньшим поствакцинальным титрам РТГА, чем нижняя граница диапазона рекомендованного ВОЗЖ. Это обстоятельство позволяет предположить, что защитная функция иммунитета против ГП может обусловлена не только гуморальным фактором.

Препарат «АвиФлуВак», примененный в 1/5 прививной дозы, на третьи сутки после контрольного заражения, по сравнению с невакцинированной птицей, редуцировал более двух порядков вируса в оральных массах, а на седьмые сутки полностью блокировал вирусвыделение. Отсутствие прироста титра антител после искусственного заражения птиц, вакцинированных препаратом «АвиФлуВак», испытанного в 1/5 и в цельной дозах, свидетельствует о предотвращении генерализации вирусной инфекции в организме птицы.

Результаты проведенных исследований по изучению иммуногенных свойств экспериментальной вакцины из низкопатогенного гриппа птиц H5 для профилактики высокопатогенного гриппа послужили основанием для последующей разработки и регистрации вакцины с коммерческим названием «АвиФлуВак».

3.3.2 Депонирование штамма «Ямал» вируса гриппа птиц подтипа H5

Вирусный изолят A/wildduck/YaNAO/956-12, послуживший источником для получения штамма «Ямал», был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г. из проб патологического материала от дикой утки, отобранного на территории Ямало-Ненецкого АО Российской Федерации.

Для получения штамма «Ямал» вируса гриппа птиц, обладающего оптимальными биотехнологическими свойствами, использовали метод предельных разведений на СПФ-эмбрионах кур. Штамм «Ямал» низкопатогенного вируса гриппа птиц А подтипа H5N1 имел стабильные биотехнологические свойства и был пригоден для использования при проведении лабораторных исследований и изготовления диагностических препаратов и препаратов специфической профилактики данного заболевания. Штамм ВГП был адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур. Вирус был способен вызывать гибель эмбрионов кур в течение 48-96 ч. инкубации при температуре $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

При проведении филогенетического анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена НА участка 837-1097 н.о. было установлено, что она идентична последовательности вируса гриппа птиц

A/wildduck/YaNAO/956-12, а сайт разрезания – RETR - характерен для низкопатогенного вируса гриппа птиц. Результаты нуклеотидного секвенирования исходного и пассированного на куриных эмбрионах в течение пяти пассажей вируса гриппа штамма «Ямал» представлены в таблице 63.

Таблица 63 - Нуклеотидная последовательность фрагмента гена НА вируса гриппа А штамма Ямал подтипа Н5 в составе вирусных суспензий

Вирусный материал	Нуклеотидная последовательность
Исходный	102030405060 Ямал GGTAACSTGCAACACCAAGTGTCAAACSTCCAATGGGTGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCT 708090100110120 Ямал CACAACATACACCCSTCTCACCATTGGGGAATGCCCAAAATACGTGAAATCAGATAGATTA 130140150160170180 Ямал GTCCSTGCGACTGGACTCAGGAATGTCCCTCAAAGAGAGACAAGAGGACTATTGGGGCT 190200 Ямал ATAGCAGGCTTTATAGAAGGAGGGTGGCA
Пассированный (5 раз)	102030405060 Ямал GGTAACSTGCAACACCAAGTGTCAAACSTCCAATGGGTGCGATAAACTCTAGCATGCCATTCT 708090100110120 Ямал CACAACATACACCCSTCTCACCATTGGGGAATGCCCAAAATACGTGAAATCAGATAGATTA 130140150160170180 Ямал GTCCSTGCGACTGGACTCAGGAATGTCCCTCAAAGAGAGACAAGAGGACTATTGGGGCT 190200 Ямал ATAGCAGGCTTTATAGAAGGAGGGTGGCA

На рисунке 23 представлена дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения штамма «Ямал» подтипа Н5 с эпизоотическими и вакцинными штаммами вируса гриппа птиц подтипа Н5. Дендрограмма основана на сравнении нуклеотидных последовательностей участка гена гемагглютинирина. Показано, что исследуемый штамм «Ямал» относится к ветви низкопатогенных вирусов гриппа птиц подтипа Н5.

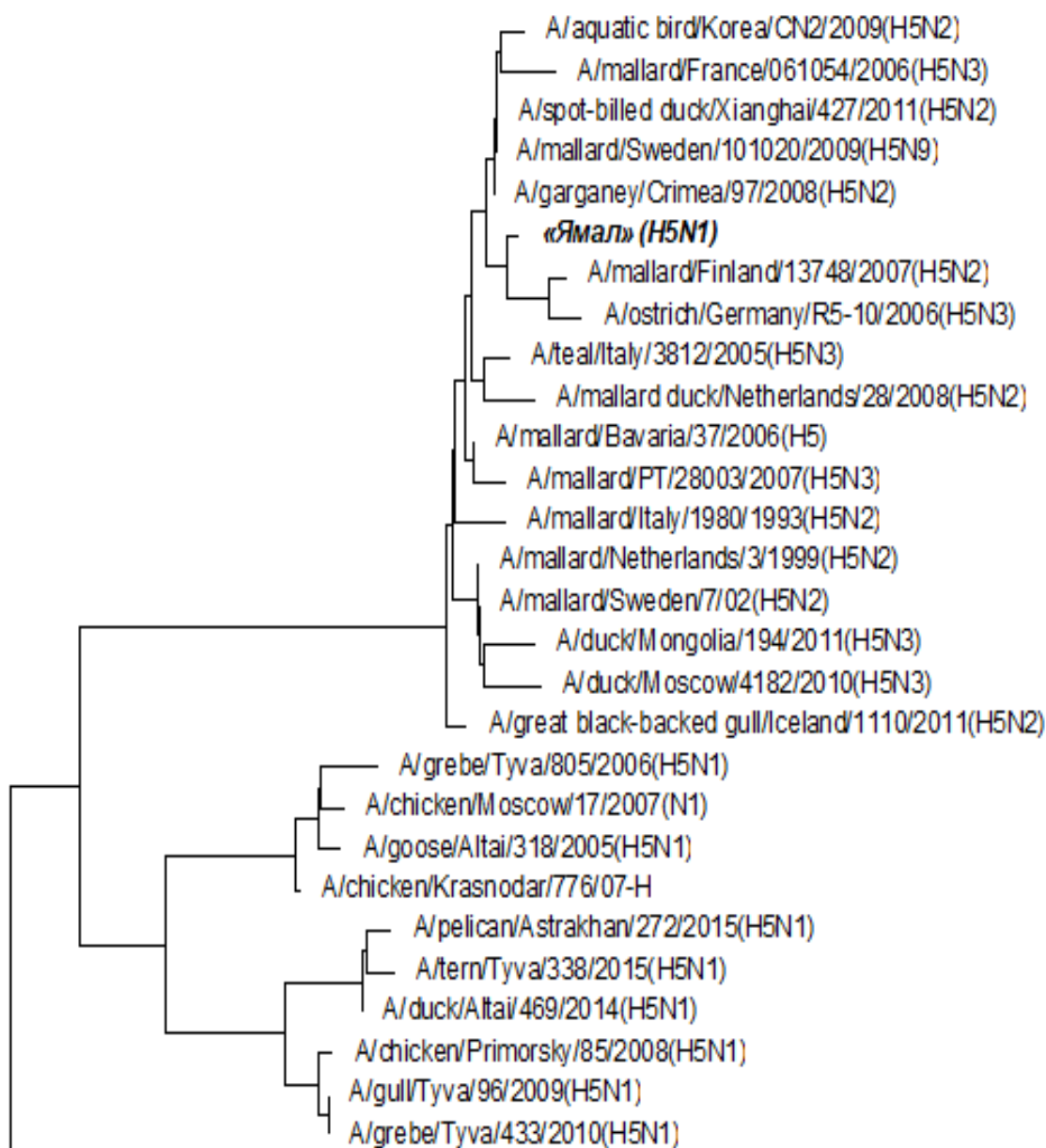


Рисунок 23- Штамм «Ямал» вируса гриппа птиц рода *Alphainfluenzavirus* вида *Influenza A virus* подтипа H5N1 для изготовления биопрепаратов для специфической профилактики гриппа птиц типа А подтипа H5

Штамм «Ямал» вируса гриппа птиц относится к семейству Orthomyxoviridae, роду Alphainfluenzavirus, виду Influenza A virus, подтипу H5N1 и обладает морфологическими признаками, характерными для низкопатогенного вируса гриппа типа А.

Подтип H5 вируса гриппа штамма «Ямал» был идентифицирован методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и нуклеотидного секвенирования (таблица

63), а также в РТГА со специфическими референс сыворотками к вирусу гриппа птиц. Данные результатов РТГА представлены в таблице 64.

Таблица 64 - Определение типовой специфичности по гемагглютинирующему штамму «Ямал» вируса гриппа птиц А в РТГА

Специфические сыворотки к вирусу ГП	Титр с гомологичным антигеном		Титр с испытуемым штаммом «Ямал»
	отрицательный контроль	положительный контроль	
H1N1, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H2N3, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:256)	отр.
H3N8, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:512)	отр.
H4N8, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H5N1, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:512)	пол. (1:256).
H6N2, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:256)	отр.
H7N1, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:512)	отр.
H8N4, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H9N2, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H10N1, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:512)	отр.
H11N6, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H12N5, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:256)	отр.
H13N6, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:256)	отр.
H14N5, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H15N9, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.
H16N3, IZSVe (Италия)	отр.	пол. (1:128)	отр.

Согласно данным, представленным в таблице 64, гемагглютинирующая активность вируса штамма «Ямал» подавляется специфической сывороткой к вирусу гриппа птиц подтипа H5N1 («IZSVe», Италия), что подтверждает принадлежность штамма «Ямал» низкопатогенного вируса гриппа птиц к подтипу H5. Активность сыворотки подтипа H5 в РТГА составила $8 \log_2$, активность других сывороток была ниже $4 \log_2$.

Согласно результатам серологических исследований вирус штамм «Ямал» был отнесен к вирусу гриппа птиц подтипа H5N1.

По своим антигенным свойствам штамм «Ямал» низкопатогенного вируса гриппа птиц относится к семейству Orthomyxoviridae, роду Alphainfluenzavirus, виду Influenza A virus, типу A, подтипу H5N1.

Для определения патогенности вируса гриппа штамма «Ямал» был поставлен опыт на птице яичного кросса с целью определения внутривенного индекса патогенности. Результаты исследования приведены в таблице 65.

Таблица 65 - Определение внутривенного индекса патогенности штамма «Ямал» вируса гриппа птиц А подтипа H5N1

Клиническое состояние птицы	Количество голов цыплят соответственно их клиническому состоянию и дню наблюдений								Итого баллов (Р)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Здоровые	10	10	10	10	9	9	8	8	0
Больные	0	0	0	0	1	1	2	2	$6 \times 1 = 6$
Тяжело больные	0	0	0	0	0	0	0	0	$0 \times 2 = 0$
Погибшие	0	0	0	0	0	0	0	0	$0 \times 3 = 0$
Обработка данных: $IVPI = \sum(0+6+0+0)/100 = 0,06$									

В ходе опыта у некоторых птиц отмечалось угнетение, кратковременный отказ от воды и корма, однако клинических признаков гриппа птиц ни у одной особи отмечено не было. Индекс внутривенной патогенности для вируса гриппа штамм «Ямал» составил 0,06, то есть данный штамм низкопатогенный.

Оптимальными условиями культивирования штамма «Ямал» подтипа H5N1 низкопатогенного вируса гриппа А являются следующие:

- система культивирования - развивающиеся эмбрионы кур в возрасте 9-11 суток;
- метод заражения - инокуляция при помощи шприца в аллантоисную полость;
- продолжительность культивирования вируса в куриных эмбрионах составляет 48-96 ч.

При культивировании вирус гриппа птиц штамм «Ямал» накапливается в титре не менее $8,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (таблица 66) и сохраняет исходные характеристики

при пассировании в чувствительных биологических системах в течение не менее пяти пассажей (срок наблюдения).

Таблица 66 - Инфекционная активность вирусосодержащего материала штамма «Ямал» вируса гриппа птиц H5

Вирусный материал	Инфекционная активность, lg ЭИД₅₀/см³	Гемагглютинирующая активность, log₂
Исходный	8,2±0,3	9,0±0,5
Пассированный (5 раз)	8,4±0,4	8,7±0,4

Инактивированный вирус индуцирует антитела, выявляемые методами реакции торможения гемагглютинирующей активности. Так, через 28 суток после однократной иммунизации цыплят инактивированной цельной вакциной из штамма «Ямал» вируса гриппа птиц А подтипа H5N1 в прививном объеме 0,5 см³ средний титр антител по группе к НА, обеспечивающим реакцию торможения гемагглютинации, составил 11,2±0,3 log₂.

Штамм «Ямал» вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1 был депонирован 24 сентября 2021 г. во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ» под регистрационным номером: №366 – деп/21-28– ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

3.3.3 Разработка инактивированной вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак»

3.3.3.1 Доклинические исследования вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак» инактивированной эмульсионной

Доклинические исследования вакцины проводили в соответствии с Приказом Минсельхоза России №101 от 06.03.2018 г. «Правила проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения» чтобы оценить эффективность и безопасность нового

препарата «Вакцина против гриппа птиц H5 инактивированная эмульсионная «АвиФлуВак»».

В рамках поставленной цели требовалось решить следующие задачи: оценить напряженность гуморального иммунитета после применения вакцины «АвиФлуВак»; определить оптимальный способ введения вакцины; подобрать наиболее приемлемый объем введения препарата; оценить безвредность и ареактогенность препарата для птицы; изучить формирование гуморального иммунного ответа и длительность иммунитета у птиц на прививку вакцины «АвиФлуВак»; изучить стабильность эмульсии в вакцине; определить срок годности препарата.

Оценка напряженности гуморального иммунитета после применения вакцины против гриппа птиц H5 инактивированной «АвиФлуВак»

Для проведения эксперимента был сконструирован образец вакцины против гриппа птиц H5 с коммерческим названием «АвиФлуВак». Вакцину изготавливали из экстраэмбриональной жидкости эмбрионов кур, инфицированных вирусом гриппа А подтипа H5N1 штамм «Ямал», инактивированной димером аминоэтилэтиленмина, с добавлением масляного адьюванта Montanide ISA 70 VG в соотношении 30÷70. Вирусный материал штамма «Ямал», использованный для составления вакцины, имел следующие количественные характеристики: 9,6 lg ЭИД₅₀ инфекционная активность и 10 log₂ гемагглютинирующая активность.

Для опыта было сформировано две группы птиц, из которых одна была иммунизирована экспериментальным образцом вакцины «АвиФлуВак» в объеме 0,5 см³ внутримышечно (группа №1). Вторая группа (контроль) оставалась интактной (группа №2).

До прививки и через 28 суток после иммунизации от птиц отбирали пробы крови для исследований сывороток в РТГА на присутствие антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5. Определяли среднегрупповые значения титров антител к вирусу ГП H5 в РТГА на 28 сутки после вакцинации. Полученные результаты

исследования представлены в таблице 67.

Таблица 67 - Активность сывороток крови цыплят иммунизированных вакциной «АвиФлуВак» в РТГА к вирусу ГП Н5

№ сыворотки п/п	Титр сывороточных антител (Т, log ₂) к вирусу гриппа птиц (Н5) у цыплят подопытных групп, до и после прививки		
	До вакцинации	После вакцинации	
		Группа №1	Группа №2 (контроль)
1	-*	8	-
2	-	10	-
3	-	9	-
4	-	10	-
5	-	9	-
6	-	10	-
7	-	9	-
8	-	9	-
9	-	10	-
10	-	12	-
"T±s**	-	9,6±0,34	-

Примечание: * - титры антител не обнаружены;

** - указано среднее значение и стандартная ошибка.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что через 28 суток у 100% цыплят опытной группы сформировался напряженный иммунитет к вирусу гриппа птиц Н5. Среднегрупповое значение титра составило величину $9,6 \pm 0,34 \log_2$. При этом группа контроля (№2) так и осталась серонегативной.

Обоснование способа введения вакцины против гриппа Н5 «АвиФлуВак»

В исследовании использовали цыплят суточного возраста в количестве 25 голов и 30-суточного возраста - 25 голов. Цыплят разделили на группы: четыре опытных (по две группы каждого возраста) по 10 голов и две контрольные по пять голов каждого возраста.

Птицу суточного возраста групп № 1 и №2 подвергали иммунизации экспериментальным образцом вакцины в одной прививной дозе в объеме 0,5 см³. Цыплят группы №1 прививали внутримышечно, в грудную мышцу, однократно, а цыплят группы №2 также однократно подкожно, в область средней трети шеи. Птицу 30-суточного возраста прививали: группу №3 подкожно, группу №4 внутримышечно. Группы № 5 и №6 в продолжение всего эксперимента оставались интактными (контроль).

До прививки и через 28 суток после иммунизации от птиц отбирали пробы крови для исследований сывороток в РТГА на присутствие антител к вирусу гриппа птиц подтипа Н5. В результате проведенного эксперимента было установлено, что до проведения иммунизации и после 28 суток после начала опыта в контрольных группах в образцах сывороток крови антитела отсутствовали.

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 68.

Таблица 68 - Активность сывороток крови цыплят в РТГА на наличие антител к вирусу ГП (Н5) после прививки различными способами вакциной «АвиФлуВак»

Т, log ₂ до вакци- нации	Титр сывороточных антител (Т, log ₂) к вирусу гриппа птиц (Н5) у цыплят после прививки вакцины соответственно возрасту и способу введения					
	№ 1	№2	№ 3	№ 4	Контроль	
	1 сут., в/м	1 сут., п/к	30 сут., в/м	30 сут., п/к	№ 5 1 сут.	№ 6 30 сут.
-*	8	7	8	9	-	-
-	9	10	9	8	-	-
-	10	8	12	9	-	-
-	10	11	10	8	-	-
-	11	7	10	9	-	-
-	10	9	9	10		
-	10	8	9	9		
-	11	8	10	9		
-	10	9	10	10		
-	8	10	9	9		
T±s**	9,7±0,34	8,7±0,42	9,6±0,34	9,0±0,21	-	-

Примечание: * - титры антител не обнаружены.

По данным, представленным в таблице 68 видно, что титры антител в РТГА были выше минимальной положительной реакции. В группах №1 и №3 при применении вакцины внутримышечно титры антител составили в среднем $9,7 \pm 0,34$ и $9,6 \pm 0,34 \log_2$, соответственно. В группах №2 и №4, где был применен подкожный способ введения, титры антител оказались немного ниже и составили $8,7 \pm 0,42$ и $9,0 \pm 0,21 \log_2$, соответственно. Однако, установленные различия были лишь формальными, поскольку средние значения титров соответственно возрастных групп и способа введения вакцины были статистически тождественны ($p \geq 0,05$).

В ходе опыта было установлено, что в опытных группах через 28 суток после иммунизации вакциной «АвиФлуВак» у всех цыплят сформировался напряженный гуморальный иммунитет.

По результатам анализа данных таблицы 68, пришли к выводу, что подкожный и внутримышечный способ введения вакцины «АвиФлуВак» являются равнозначными.

Обоснование инъекционного объема введения препарата «АвиФлуВак»

В исследовании использовали цыплят суточного возраста в количестве 20 голов, 15-суточного возраста - 20 голов и 30-суточного возраста - 20 голов.

Цыплят каждой возрастной группы разделили на две группы по 10 голов. Группы цыплят суточного возраста групп №1 и №2 прививали однократно, внутримышечно в область груди в объеме 0,2 и 0,5 см³, соответственно. Группы цыплят 15-суточного возраста групп №3 и №4 прививали однократно, внутримышечно в область груди в объеме 0,2 и 0,5 см³, соответственно. Группы цыплят 30-суточного возраста групп №5 и №6 прививали однократно, внутримышечно в область груди в объеме 0,5 и 1,0 см³. Птица всех возрастных групп до проведения эксперимента была серонегативной.

Через 28 суток после иммунизации от птиц всех подопытных групп отбирали пробы крови для исследований сывороток в РТГА к вирусу ГП Н5. Результаты исследования сывороток после иммунизации птиц различных возрастов вакциной «АвиФлуВак» в различных объемах представлены в таблице 69.

Таблица 69 - Активность сывороток крови в РТГА к вирусу ГП (Н5) после прививки цыплят различных возрастов вакциной «АвиФлуВак» в разных объемах

Номер образца	Титр сывороточных антител (Т, log ₂) к вирусу гриппа птиц (Н5) у цыплят после прививки вакцины соответственно возрасту и объему введения					
	№ 1 1 сут., 0,2 см ³	№2 1 сут., 0,5 см ³	№ 3 15 сут., 0,2 см ³	№ 4 15 сут., 0,5 см ³	№ 5 30 сут., 0,5 см ³	№ 6 30 сут., 1 см ³
1	10	9	11	10	8	11
2	6	11	10	12	9	10
3	8	9	10	10	10	11
4	10	9	9	8	9	10
5	9	10	10	10	10	10
6	8	9	11	9	9	11
7	9	10	8	10	9	11
8	9	9	10	10	12	10
9	8	9	8	10	10	11
10	9	9	10	9	10	10
T±s	8,6±0,37	9,4±0,22	9,7±0,33	9,8±0,32	9,6±0,34	10,3±0,17

Анализ данных, представленных в таблице 69, показал, что через 28 суток после прививок различных объемов вакцины «АвиФлуВак» у 100% птицы сформировался напряженный гуморальный иммунитет. Среднегрупповые титры антител для всех вводимых объемов находились в диапазоне 8,6÷10,3 log₂ (или 388<Т<1260).

Сравнение средних значений титров антител к вирусу гриппа птиц Н5 внутри групп одного возраста опытной птицы показало, что статистическая разница отсутствует (p≥0,05).

Поскольку статистической разницы между инъекционными объемами не установлено, считали уместным принять меньший объем (0,2 см³) для меньшей живой массы птицы (цыплята суточного возраста) и больший объем для большей живой массы (цыплята 15-30 суточного возраста).

**Оценка безвредности и ареактогенности инактивированной вакцины
против гриппа H5 «АвиФлуВак» для птицы**

В исследовании использовали кур кросса «Хайсекс Браун» суточного и 30-суточного возраста в количестве 60 голов. Цыплят разделили на четыре опытные группы по 10 голов в каждой. Цыплят контрольных групп разделили по пять голов.

Сформированные группы цыплят соответственно объемам и способам введения были привиты вакциной против гриппа птиц H5 инактивированной эмульсионной «АвиФлуВак». В течение 14-суток за птицей вели клинические наблюдения на предмет выявления изменений в общем состоянии (угнетение, отказ от корма, диарея) и наличия припухлостей в местах введения вакцины. Безопасность вакцины оценивали по клиническому состоянию после вакцинации, а также по результатам оценки реактогенности по результатам патологического вскрытия через 14 суток после вакцинации.

Схематично распределение птиц по группам представлено в таблице 70.

После применения вакцины в одной и двукратной прививных дозах, введенных подкожно и внутримышечно как суточным цыплятам, так и в возрасте 15-суток каких-либо отклонений в общем состоянии и поведении не выявлено. Птицы в продолжении всего эксперимента оставались активными, снижение аппетита не наблюдали.

Таблица 70 - Схема распределения подопытных птиц соответственно сформированных групп при изучении безвредности и реактогенности вакцины «АвиФлуВак»

Возраст цыплят	Опыт				Контроль			
	№ группы	2-кратная доза (0,5 см ³ , п/к)	№ группы	2- кратная доза (0,5 см ³ , в/м)	№ груп- пы	Привив. доза (0,2 см ³ , п/к)	№ груп- пы	Привив. доза (0,2 см ³ , в/м)
Суточные	1	10 гол	2	10 гол	3	5 гол	4	5 гол
30- суточные	5	10 гол	6	10 гол	7	5 гол	8	5 гол

После вынужденного диагностического убоя цыплят патологоанатомический осмотр также не выявил ни у одной из подопытных птиц каких-либо изменений в тканях в месте инъекции вакцины.

Пришли к заключению, что вакцина против гриппа птиц H5 инактивированная эмульсионная «АвиФлуВак» безвредна и ареактогенна для цыплят как суточного, так и 30-суточного возраста.

Изучение формирования гуморального иммунного ответа у птиц на прививку вакцины «АвиФлуВак»

В опыте использовали кур кросса «Хайсекс Браун» 30-суточного возраста в количестве 20 голов. Цыплят разделили по 10 голов на 2 группы: опытную и контрольную. Цыплят опытной группы иммунизировали вакциной «АвиФлуВак» экспериментальной серии. Препарат вводили внутримышечно, в грудную мышцу, однократно. Группа контроля в продолжение всего эксперимента оставалась интактной.

Через 7, 14, 21 и 28 суток после прививки от птиц обеих групп отбирали пробы сывороток крови для исследований в РТГА на присутствие антител к гриппу птиц подтипа H5. Анализ сывороток крови, отобранных от цыплят до начала эксперимента и в контрольной группе на всех временных интервалах, показал, что все пробы в РТГА к вирусу гриппа птиц подтипа H5 были отрицательными.

После проведения иммунизации вакциной «АвиФлуВак» на 7, 14, 21 и 28 сутки от всех цыплят опытной группы отбирали пробы крови для исследований в РТГА на присутствие антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5. Полученные данные представлены в таблице 71.

Было установлено, что после вакцинации птиц препаратом «АвиФлуВак» концентрация антител к вирусу гриппа птиц со временем нарастала. Средние титры антител на 7, 14, 21 и 28 сутки после иммунизации составили 1,9; 4,9; 9,0 и 9,6 log₂, соответственно.

Таблица 71 - Активность сывороток в РТГА к вирусу ГП Н5 птиц, иммунизированной вакциной «АвиФлуВак» соответственно времени после прививки

№ образца сыворотки	Титры сывороточных антител (Т, log ₂) к вирусу гриппа птиц (Н5) у цыплят опытной группы соответственно времени после прививки (сут.)			
	7	14	21	28
1	1	6	9	10
2	2	5	8	10
3	3	4	9	9
4	2	5	8	10
5	1	4	9	9
6	2	6	9	10
7	2	3	9	9
8	3	5	10	9
9	2	5	10	8
10	1	6	9	12
"Т±s"	1,9±0,23	4,9±0,31	9,0±0,21	9,6±0,34

Примечание: * - указано среднее значение и стандартная ошибка

Сравнение среднегрупповых титров, установленных на 7 и 14 сутки после прививки, достоверно отличались от аналогичного показателя на 21 сутки ($p \geq 0,1$). При этом средние величины титров, установленные на 21 и 28 сутки были статистически тождественны ($p \geq 0,05$). В биологическом смысле это означало, что период до 21 суток соответствовал активной фазе формирования гуморального иммунитета, период после 21 суток – фазе стабилизации.

Изучение стабильности эмульсии в вакцине «АвиФлуВак»

Изготовили три экспериментальных серии вакцины против гриппа птиц (Н5) инактивированной эмульсионной. Стабильность эмульсии (способность масляного адъюванта обеспечивать равновесное состояние дисперсной фазы) оценивали путем центрифугирования образцов вакцины в пробирках при 1000 g в течение 30 минут и в тесте ускоренного старения. Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования или после хранения в термостате при температуре 37°C в течение 14 суток на дне пробирки водная фракция отсутствовала, а размер

прозрачной масляной фракции в верхней части флакона или пробирки составлял не более 10% от общей высоты столба содержимого.

Результаты тестирования образцов экспериментальных серий вакцины против гриппа птиц H5 различными методами представлены в таблице 72.

Таблица 72 - Стабильность вакцины против гриппа птиц H5 инаktivированной эмульсионной «АвиФлуВак» в различных тестах

Номер серии	Показатели соотношения масляной фракции (А, %) и нормальной эмульсии (С, %), установленные соответственно методу тестирования	
	Центрифугирование (при 1000 g в течение 30 мин.)	Тест ускоренного старения (выдерживание при 37°C в течение 14 сут.)
011121	А – 2% С – 98%*	А – 6 % С – 94%*
021221	А – 2% С – 98%*	А – 3 % С – 97%*
010122	А – 2% С – 98%*	А – 4 % С – 96%*

Было установлено, что центрифугирование при 1000 g в течение 30 минут не разрушает эмульсию, образующийся тонкий слой прозрачного масла во всех испытанных образцах вакцины составлял лишь 2% от высоты столба пробирки. При этом, недопустимого образования водной фракции на дне пробирок не обнаружили. Тест ускоренного старения также не показал каких-либо необратимых изменений в структуре эмульсии. Через 14 суток экспозиции в термостате при 37°C в верхней части пробирок с испытуемыми образцами наблюдали образование кольца из прозрачного масла, который составил в среднем 4,3 %, остальной объём пробирок занимала нормальная эмульсия.

Сделали заключение, что широко используемая в ФГБУ «ВНИИЗЖ» технология производства инаktivированных эмульсионных препаратов, является приемлемой для изготовления вакцины против гриппа птиц (H5) инаktivированной эмульсионной, что позволит получить стабильную эмульсию, которая обеспечит сохранение антигенных свойств препарата.

Оценка длительности гуморального иммунитета после иммунизации вакциной «АвиФлуВак»

Цыплят иммунизировали согласно временной Инструкции по применению вакциной против гриппа птиц (H5) инактивированной эмульсионной экспериментальной серией 011121 (дата выпуска 11.2021 г.). Препарат вводили внутримышечно, однократно, в объёме 0,5 см³. Через 28, 90, 180, 240 и 270 суток от иммунизированных птиц отбирали пробы крови (n=10) для серологических исследований. Сыворотки крови исследовали в РТГА на присутствие антител к вирусу ГП подтипа H5.

На заданных интервалах времени у привитых цыплят оценивали напряженность поствакцинального гуморального иммунитета против гриппа птиц H5. Соответственно временным интервалам (j) определили средние логарифмические значения титров и их стандартные отклонения ($\log_2 T_j \pm S$):

Полученные результаты приведены в виде диаграммы на рисунке 24.

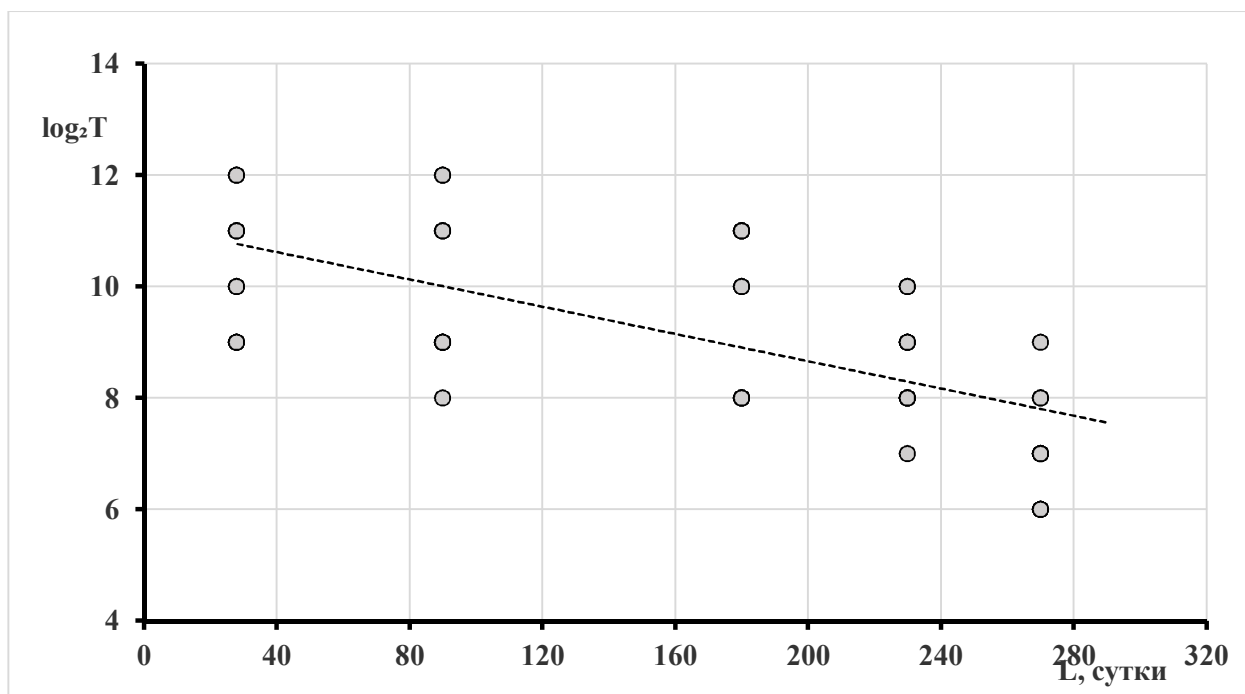


Рисунок 24 - Динамика напряженности гуморального иммунитета цыплят, привитых вакциной против гриппа птиц H5 инактивированной эмульсионной «АвиФлуВак». Логарифмические значения титров антител ($\log_2 T$) к вирусу гриппа птиц, установленные соответственно времени после вакцинации (L, сутки).

Пунктиром показана построенная по уравнению линия регрессии титров.

Установили, что динамика напряженности гуморального иммунитета цыплят, привитых вакциной «АвиФлуВак» демонстрировала определенный отрицательный тренд.

Приняли, что протективным в отношении вируса гриппа может считаться титр гемагглютинирующих антител не менее 1:128 ($7,0 \log_2$). Данную величину считали критической оценкой напряженности гуморального иммунитета. Учитывая статистическую неопределенность, считали целесообразным принять допустимую продолжительность поствакцинального периода иммунитета девять месяцев.

Обоснование срока годности вакцины «АвиФлуВак»

Использовали флаконы экспериментальных серий №№ 1, 2, 3 вакцины «АвиФлуВак» фасовкой по 200 см³ (400 доз) в пластиковых флаконах, которые содержали в период хранения в соответствии с СТО 00495527-0406 в защищенном от света месте при температуре от 2°C до 8°C.

Через заданные интервалы (3, 6, 9, 12, 18 и 24 месяцев) оценивали антигенную активность вакцины. Формировали по две группы цыплят по 10 голов (опыт и контроль). Препарат вводили в объеме 0,5 см³, однократно в грудную мышцу. Через 28 суток после прививки от всех вакцинированных и контрольных птиц отбирали пробы сывороток крови для выявления в РТГА антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5. Опыт считали зачетным, если: а) до вакцинации все птицы в контрольной и опытной группах были серонегативными; б) через 28 суток после вакцинации все птицы в контрольной группе оставались серонегативными.

Кроме этого, цыплят опытной группы использовали в оценке безвредности препарата. В течение 28 суток после прививки за птицей вели клиническое наблюдение. После отбора крови для оценки антигенной активности проводили диагностический убой птиц, отмечая наличие реакции в месте введения вакцины.

Результаты исследований представлены в таблице 73.

Таблица 73 - Оценка стабильности вакцины «АвиФлуВак» по показателю «антигенная активность» соответственно времени хранения (сут.) и испытанным сериям (№1-3)

Первичные данные титров антител (Т) к вирусу гриппа птиц (H5), установленных в РТГА в сыворотках крови птиц, иммунизированных вакциной против гриппа птиц H5, соответственно интервалу времени хранения вакцины (L, сутки).																
Результаты РТГА ($\log_2 T$)*																
L,сут	n**	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	$\log_2 T \pm s^{***}$
Серия 011121																
28	10										3	2	3	2		10,4±0,37
90	10									1	4		3	2		10,1±0,46
180	10									4		2	4			9,6±0,43
270	10									4	1	1	3	1		9,6±0,50
360	10								1	4	1	1	3			9,1±0,48
540	10								1	4	1	2	2			9,0±0,45
720	10							3	4	1	2					7,2±0,36
Серия 021221																
29	10									2	1	2	3	2		10,2±0,47
90	10									1	4		2	3		10,2±0,49
180	10									4		2	2	2		9,8±0,53
270	10									3	1	3	1	2		9,8±0,50
360	10								1	4		3	2			9,1±0,46
540	10								2	3	2	3				8,6±0,37
720	10							3	2	3	2					7,4±0,37
Серия 010122																
28	10									3	2		3	2		9,9±0,52
90	10									1	3		3	3		10,4±0,48
180	10									2	2	2	2	2		10,0±0,47
270	10								1	3	2	3	1			9,0±0,39
360	10							1	1	2	3	3				8,6±0,43
540	10							1	3	3		3				8,1±0,46
720	10							3	1	3	3					7,6±0,40

Примечания:

* - приведены оценки титров опытной группы птиц, полученные при соблюдении следующих условий а) до вакцинации все птицы в контрольной и опытной группах были серонегативными; б) через 28 суток после вакцинации все птицы в контрольной группе оставались серонегативными;

** - число исследованных проб;

*** - дано среднее логарифмическое значение и стандартная ошибка измерения.

Было установлено, что по мере возрастания времени хранения препарата «АвиФлуВак» средние логарифмические оценки поствакцинальных титров антител ($\log_2 T$) к вирусу гриппа птиц H5 в РТГА демонстрировали отрицательный тренд, т.е. антигенная активность вакцины снижалась. Полученные данные продемонстрировали, что антигенная активность вакцины «АвиФлуВак» у отдельных птиц достигает критического показателя титра антител ($\log_2 T=6,0$) через 720 суток после закладки на хранение. Однако, ориентируясь на более осторожный прогноз, считали целесообразным принять пороговый интервал сохранения вакциной антигенной функции продолжительностью не более 540 суток (т.е. 18 месяцев). На указанном интервале ожидается, что препарат будет иметь минимум двукратный запас антигенной активности относительно критического уровня.

Контроль по остальным показателям качества согласно СТО 00495527-0406 на временном интервале в 720 суток хранения также не выявил каких-либо отклонений. Все показатели оставались в норме.

Сделали заключение, что при соблюдении условий хранения срок годности вакцины «АвиФлуВак» составляет 18 месяцев.

Изучение динамики поствакцинальной иммунной реакции у цыплят против гриппа птиц H5 при иммунизации препаратом «АвиФлуВак»

Проводили изучение развития гуморальной иммунной реакции и протективной функции иммунитета у цыплят против вируса ВГП подтипа H5N1 после прививки вакциной против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак».

В опыте использовали 100 голов коммерческих цыплят, из которых 60 голов было вакцинировано препаратом «АвиФлуВак» (опыт) и 40 голов содержали интактными (контроль). Вакцину вводили всем птицам опытной группы в объеме 0,5 см³, подкожно, в дорсальную часть верхней трети шеи. Птиц контрольной группы не вакцинировали. Через интервалы 5, 10, 15, 20 и 25 суток после вакцинации отбирали 12 вакцинированных и 8 контрольных птиц, у которых определяли титр сывороточных антител к вирусу ГП и подвергали контрольному заражению. Для заражения использовали вирус ВГП штамма

A/chicken/Stavropol/2077-6/21 H5N1. Заражение проводили оральным методом в дозе 7,1 lg ЭИД₅₀ в объеме 1,0 см³.

Через заданные интервалы времени (J, сут.) после вакцинации у птиц, предназначенных для контрольного заражения из опытной и контрольной групп, отбирали образцы крови для исследования сывороток в РТГА. Соответственно интервалам получали выборки из n-числа единичных оценок титров (Т, log₂). Значение выборки объединяли в общий ранжированный ряд, в котором для оценок Т определяли ранги (h). В качестве результирующих показателей для значащих выборок определяли медианы титров (М) и средние ранги (Н). Полученные результаты приведены в таблице 74.

Таблица 74 – Титры антител к вирусу ГП в РТГА через заданные интервалы времени после вакцинации птицы «АвиФлуВак»

Установленные соответственно интервалам времени (J, сут.) в опытной (Оп) и контрольной (К) группах птиц логарифмические значения титров (Т, log ₂) и ранги этих значений (h) в объединенном ранжированном ряду всех значащих выборок.													
J													
5		10			15			20			25		
Оп	К	Оп		К	Оп		К	Оп		К	Оп		К
Т	h	Т	h	Т	Т	h	Т	Т	h	Т	Т	h	Т
↵*	↵	2	6,5	↵	8	24	↵	8	24	↵	9	32,5	↵
↵	↵	3	10,5	↵	6	18	↵	5	13,5	↵	11	43,5	↵
↵	↵	↵	2	↵	10	38,5	↵	10	38,5	↵	9	32,5	↵
↵	↵	3	10,5	↵	6	18	↵	8	24	↵	9	32,5	↵
↵	↵	1	4	↵	7	19	↵	8	24	↵	11	43,5	↵
↵	↵	2	6,5	↵	6	18	↵	10	38,5	↵	9	32,5	↵
↵	↵	↵	2	↵	8	24	↵	8	24	↵	9	32,5	↵
↵	↵	2	6,5	↵	6	18	↵	8	24	↵	8	24	↵
↵	-**	3	10,5	-	6	18	-	5	13,5	-	11	43,5	-
↵	-	2	6,5	-	10	38,5	-	10	38,5	-	9	32,5	-
↵	-	↵	2	-	6	18	-	6	18	-	11	43,5	-
↵	-	3	10,5	-	8	24	-	8	24	-	10	38,5	-
↵	↵	2 [#]		↵	6,5		↵	8		↵	9		↵
			6,5 ^{##}			23,0			25,4			36,0	

Примечания:

- *- реакция отрицательная (результат принимали равным нулю);
- ** тест не проводили;
- #- медиана выборки (М_Т);
- ##- средний ранг выборки (Н)

Из данных таблицы 74 следует, что при сравнении медиан, фаза наиболее активного развития иммунной реакции птиц соответствовала интервалу 15 суток, где прирост оценки $M=6,5 \log_2$ относительно предыдущей $M=2 \log_2$ составил 22,6 раза. Далее, каждые следующие пять суток, значения M возрастали в 2,8 и 2 раза, соответственно.

Исследовали существенность хронологических изменений напряженности гуморального иммунитета птиц. Использовали H -показатели, установленные соответственно заданным интервалам времени для четырех выборок ($k=4$) титров антител. В неповторяющихся позициях попарно сопоставляли значения H . Для каждой пары, например, H_1 и H_2 , вычисляли статистический оператор вида $q = |H_1 - H_2| / \sqrt{(k(kn+1)/12)}$, который использовали для проверки выполнимости неравенства $q \geq q_p$, где q_p - табличное значение для заданных k и p . Если приведенное неравенство на уровне $p \leq 0,05$ выполнялось (т.е. $q \geq q_p = 3,63$), то разность средних ранговых оценок считали существенной. Полученные результаты сравнения H -показателей приведены в таблице 75.

Таблица 75 - Сравнение средних ранговых показателей (H) тестируемых выборок титров антител (по данным таблицы 74)

Оценки q , установленные для данной пары значений H^*				
H	$H_{10}=6,5$	$H_{15}=23,0$	$H_{20}=25,4$	$H_{25}=36,0$
$H_{10}=6,5$		4,08	4,68	7,30
$H_{15}=23,0$			0,59	3,22
$H_{20}=25,4$				2,62

* - Например, $q_{10,15} = |6,5 - 23,0| / \sqrt{(4 \times (4 \times 12 + 1) / 12)} = | -16,5 | / 4,04 = 4,08 > q_{\{k=4; p=0,05\}} = 3,63$

Данные таблицы 75 демонстрируют, что в условиях проведенного эксперимента статистически значимые различия имел только один ранговый показатель $H=6,5$, установленный на интервале 10 суток. Относительно всех последующих оценок отмеченная величина была наименьшей. Остальные значения средних рангов во всех комбинациях были статистически равны.

На каждом временном интервале в опытной и контрольной группах оценивали клиническое состояние птиц, подвергнутых контрольному заражению. Определяли количество клинически больных (a) и погибших (b) птиц. Клиническую картину считали характерной для ГП при наличии синюшности гребня, бородак, лап и присутствии конъюнктивита. Специфичность падежа подтверждали по наличию характерных для ГП патологоанатомических признаков.

На всех интервалах каждые сутки определяли текущие показатели заболеваемости в инфицированных группах ($I_n = (\sum a)/n$, где n – число живых птиц в группе на данные сутки) и летальности $Le = \sum b/n$. Полученные результаты приведены в таблице 76.

Таблица 76 – Протективное действие вакцины «АвиФлуВак» после заражения вирусом ВГП H5N1 соответственно интервалам времени

Показатели заболеваемости (a/n)* и число погибших птиц в опытной (вакцинированной) и в контрольной группах соответственно времени после заражения (сут.)											
J, сут.											
Группа	U	5		10		15		20		25	
		a/n	b	a/n	b	a/n	b	a/n	b	a/n	b
Опыт (n=12)	1	12/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	12	3/12	0	0	0	0	-	-	-
	3	-	-	6/12	0	0	0	0	-	-	-
	4	-	-	6/11	1	2/12	0	1/12	-	-	-
	5	-	-	5/8	3	0	1	0	-	-	-
	6	-	-	2/8	0	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	2/8	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	2/8	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
In		1		0,388		0,167		0,083		0	
Le			1		0,333		0,083		0		0
Контроль (n=8)	1	8/8	0	8/8	0	6/8	0	8/8	3	8/8	0
	2	0	8	0	8	8/8	5	0	5	0	8
	3	-	-	-	-	3/3	3		0	0	0
	4	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
In		1		1		0,895		1		1	
Le			1		1		1		1		1

Примечания: * - a - количество клинически больных птиц; n – число живых птиц в группе на данные сутки.

Данные таблицы 76 использовали для проведения анализа динамики поствакцинальной иммунной реакции птиц. На каждом J-интервале эффективность вакцины (E) оценивали по показателям заболеваемости (In) и смертности (Le).

Оценки E_{In} и E_{Le} , рассчитанные по данным таблицы 76 соответственно J-интервалам, в виде диаграммы представлены на рисунке 25.

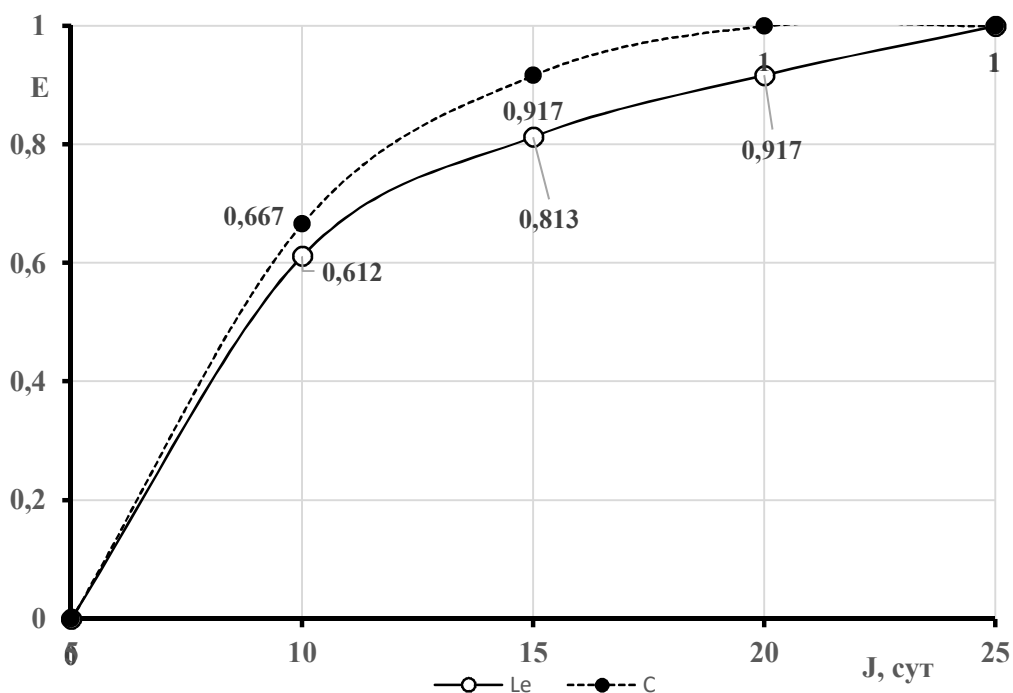


Рисунок 25 – Оценки эффективности (E) инактивированной вакцины против ГП (H5) «АвиФлуВак» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» по показателям заболеваемости (C) и смертности (Le) после контрольного заражения иммунизированных птиц вирусом высоко патогенного ГП типа А подтипа H5N1 соответственно интервалам времени (J) после иммунизации.

Приведенная на рисунке 25 диаграмма демонстрирует, что графики показателей In и Le имели положительный тренд и признаки подобия. Коэффициент линейной корреляции значений E_{In} и E_{Le} составил величину 0,998. Очевидно, что синхронное возрастание показателей отражало хронологию развития у птиц поствакцинального иммунного ответа, который к 25 сут обеспечил полную защиту от искусственного заражения.

Анализ зависимости оценок напряженности поствакцинального гуморального иммунитета и показателей эффективности вакцины. Исследовали связь между оценками $T (\log_2)$ и E (см. данные на рисунке 26).

Используя указанные величины, установленные соответственно изученным интервалам времени после вакцинации в диапазоне от 10 до 25 сут, построили регрессионные модели, которые в графическом виде представлены на рисунке 26.

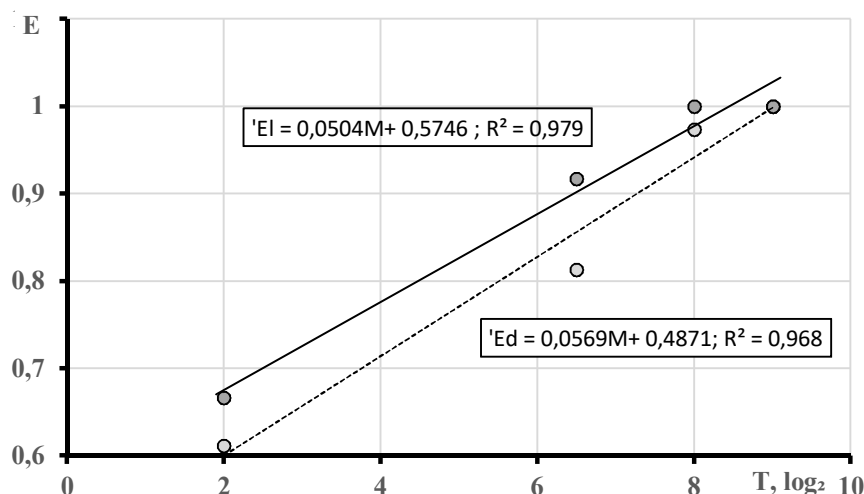


Рисунок 26 - Зависимость показателей эффективности вакцины (E) и оценок напряжённости поствакцинального гуморального иммунитета ($T, \log_2$). Показано положение показателей летальности (●) и заболеваемости (○) птиц после

искусственного заражения соответственно медианным оценкам титров антител. Даны уравнения регрессий, где 'El и 'Ed - ожидаемые показатели летальности и заболеваемости для заданного значения T , соответственно.

Построенные модели имели вид уравнений:

$$'E_{In} = 0,0569M + 0,4871,$$

где: ' E_{In} – ожидаемая эффективность вакцины по показателю заболеваемости птиц соответственно известной величине $T, \log_2$. Коэффициент адекватности модели составил величину $R^2=0,979$.

$$'E_{Le} = 0,0504M + 0,5746,$$

где: ' E_{Le} – ожидаемая эффективность вакцины по показателю летальности птиц соответственно известной величине $T, \log_2$. Коэффициент адекватности модели составил величину $R^2=0,968$.

Полученные в настоящем исследовании оценки поствакцинальных титров сывороточных антител как по динамике достижения (от 20 до 25 суток), так и по

величине ($8 - 9, \log_2$), достаточно хорошо согласуются с опубликованными данными и, даже, несколько превосходят рекомендованный ВОАН протективный титр, который должен находиться в границах от 5 до $7 \log_2$. В нормативных документах по использованию аналогичных по назначению коммерческих вакцин также фигурируют близкие величины [34]. Однако имеется препарат, где нижняя граница поствакцинального титра допускается равной $4 \log_2$ [33].

Величина показателя E находится в границах $0 \div 1$ и однонаправленно характеризует эффективность применения вакцины с использованием контрольного заражения. При этом протективный эффект препарата оценивался отдельно по показателям заболеваемости (I_n) и летальности (L_e), что позволило наблюдать соответствующую динамику иммунной реакции и время достижения значений $E > 0,99$. Однако, учитывая, что показатели E были получены на основе варьирующих переменных и, следовательно, имели статистическую погрешность, время достижения полной поствакцинальной защиты от инфекции высоко вирулентного ГП следует интерпретировать как «не ранее 25 суток после вакцинации».

Определение PD_{50} в одном иммунизирующем объеме вакцины «АвиФлуВак»

Определяли количество PD_{50} в одной иммунизирующей дозе вакцины «АвиФлуВак». В качестве контроля объекта исследования использовали экспериментальную инактивированную вакцину против гриппа птиц H5 на основе антигена ВГП подтипа H5N1 (штамм №125-ДЕП «Новосибирский»).

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 ($D = 1$).

Каждый образец вакцины с заданной концентрацией антигена был испытан на отдельной группе птиц яичного кросса Ломан Браун в возрасте 4-х недель численностью по 10 голов. Препарат вводили внутримышечно в область груди в объеме $0,5 \text{ см}^3$. Дополнительно была образована группа контроля.

Через 28 суток после вакцинации проводили контрольное заражение вирусом ВГП 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.

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 $Pr = 1 - \sum c/n$. Показатели иммунологического действия исследуемых вакцин, установленные в подопытных группах птиц, приведены в таблице 77.

Таблица 77 - Иммунологическое действие образцов инактивированных вакцин против гриппа птиц на основе антигенов НГП и ВГП вируса H5N1

Антиген	Доза антигена *D (lg D)	Титр в РТГА **log ₂ T	Клинический показатель ***C=($\sum c$)/n	Протективный индекс (Pr) Pr=1-($\sum c$)/n
НГП	1 (0,00)	6,67±0,31	0/17	1,0
	1:25 (1,40)	5,33±0,42	1/10	0,9
	1:50 (1,70)	4,33±0,45	4/10	0,6
	1:100 (2,00)	2,00±0,53	6/10	0,4
ВГП	1 (0,00)	6,33±0,29	0/10	1,0
	1:25 (1,40)	5,00±0,38	3/10	0,7
	1:50 (1,70)	2,00±0,47	7/10	0,3
	1:100 (2,00)	2,00±0,38	7/10	0,3
Контроль		0,47±0,35	10/10	0,0

Примечания:

- * - величина разведения (относительная концентрация) 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.

Исследовали связь между количеством антигена в прививном объеме (D) и оценкой индекса защиты (Pr). Для приближения зависимости параметров D и Pr к линейному виду, значения D выражали в логарифмах, а величины Pr преобразовывали в линейные эквиваленты по Берксону [7] вида $Y = \lg (Pr / (1 - Pr))$. Таким образом 50%-й протективный эффект вакцины ($Pr=0,5$) соответствовал эквиваленту $Y=0$. Для значений $Pr=1$, использовали условные оценки $Pr_1=(1 - 1/5n)$ [79]. Для построения наиболее вероятных моделей связи показателей $\lg D$ и Y применили регрессионный анализ [80]. Получили линейные регрессионные уравнения, имеющие вид: $'Y = (-1,017)\lg D + 2,016$ - для антигена НППП ($R^2 = 0,932$) и $'Y = (-1,079)\lg D + 1,706$ - для антигена ВГП ($R^2 = 0,967$), где $'Y$ - прогнозируемое значение индекса соответственно заданного $\lg D$.

Для графического представления регрессии Pr и $\lg D$ использовали обратное преобразование $'Y$ в размерность доли, по формуле $Pr = 1 - 1 / (1 + (\text{antilg } 'Y))$. Полученные результаты представлены на рисунке 27.

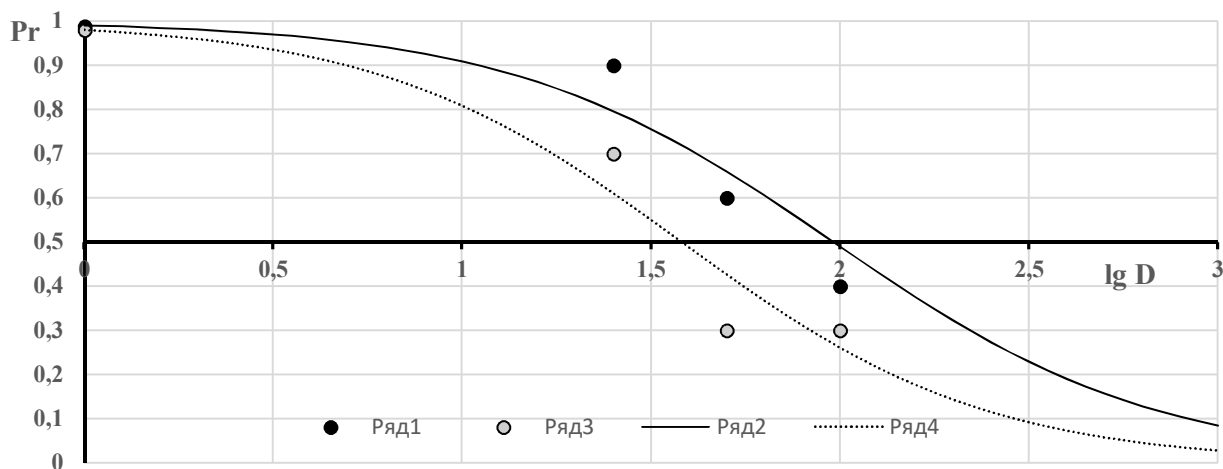


Рисунок 27 - Зависимость между испытанными дозами ($\lg D$) антигенов НГП и ВГП вируса H5N1 и индексами защиты (Pr) вакцин, изготовленных на основе данных антигенов, против вируса ВГП H5N1.

Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке $Pr=0,5$ (50% - ой защиты). Даны экспериментальные оценки индексов защиты после испытания заданных разведений антигенов НГП (Ряд 1) и ВГП (Ряд 3). Показаны: линия регрессии $'Pr$ по $\lg D$, где: $'Pr = 1 - 1 / (1 + (\text{antilg } 'Y))$; $'Y$ - прогнозируемый индекс по уравнению $'Y = (-1,017)\lg D + 2,016$ для антигена НГП (Ряд 2); то же по уравнению $'Y = (-1,079)\lg D + 1,706$ для антигена ВГП (Ряд 4)

По регрессионным уравнениям рассчитали дозы антигенов, обеспечивающих защиту 50% (PD₅₀) и 95% (PD₉₅) вакцинированных птиц. Полученные результаты приведены в таблице 78.

Таблица 78 - Прогнозируемые дозы (разведения)* вирусных антигенов НГП и ВГП в составе испытанных образцов вакцин, которые в остром опыте обусловили защиту 50% (PD₅₀) и 95% (PD₉₅) иммунизированных птиц

Антиген	lgPD ₅₀	PD ₅₀	lgPD ₉₅	PD ₉₅
НГП	$2,016/1,017 = 1,98$	96	$(2,016 - 1,279)/1,017 = 0,72$	5,2
ВГП	$1,706/1,079 = 1,58$	38	$(1,706 - 1,279)/1,079 = 0,40$	2,5

Примечание: * - рассчитаны по регрессионным уравнениям для эквивалентов: $Y_{50} = \lg(0,5/(1-0,5)) = 0$ и $Y_{95} = \lg(0,95/(1-0,95)) = 1,279$.

Из данных таблицы 78 следует, что прививной объем неразведенного антигена НГП содержал 96 PD₅₀ и 5,2 PD₉₅. Аналогичные показатели для препарата ВГП составили 38 PD₅₀ и 2,5 PD₉₅.

Исследование связи протективного эффекта и напряженности поствакцинального гуморального иммунитета. Провели анализ зависимости между величинами $\log_2 T$ и Y , установленными для испытанных прививных доз антигенов НГП и ВГП. Использовали данные таблицы 77. Полученные результаты представлены в виде диаграммы на рисунке 28.

Из данных рисунка 28 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 соответствует 95% защиты вакцинированных птиц, или индексу $Y = 1,279$. Искомые оценки составили: - для НГП величину $\log_2 T_{95} = (1,279 + 1,302)/0,441 = 5,853$, или $T_{95} \approx 58$; - для ВГП величину $\log_2 T_{95} = (1,279 + 1,275)/0,419 = 6,095$, или $T_{95} \approx 68$.

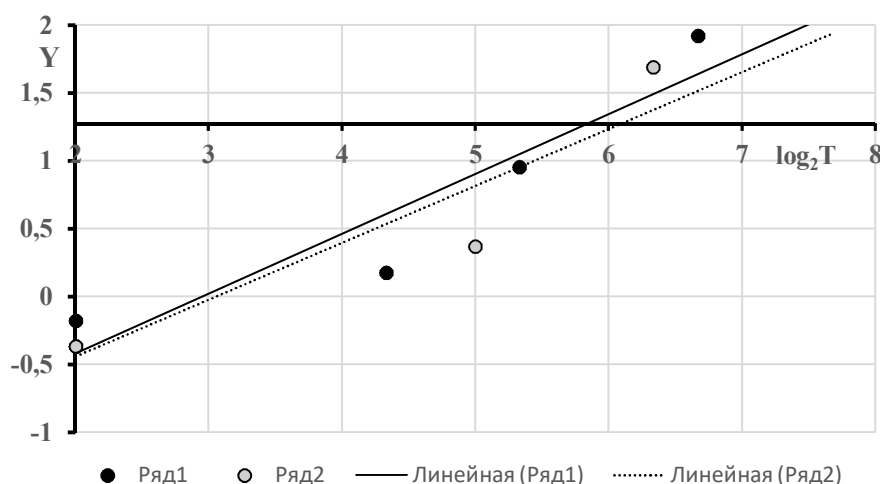


Рисунок 28 - Зависимость между величиной титра антител к вирусу гриппа ($\log_2 T$) и эквивалентом индекса защиты птиц (Y). Оси координат:

$\log_2 T$ – логарифм величины титра антител; Y – эквивалент индекса защиты, где:
 $Y = \lg(\text{Pr}/(1-\text{Pr}))$; Pr – доля вакцинированных птиц, защищенных в остром опыте от клинического проявления гриппа. Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке $Y = 1,279$, соответствующей $\text{Pr} = 0,95$ (95% защиты). Даны экспериментальные оценки индексов защиты после испытания заданных разведений антигенов НГП (Ряд 1) и ВГП (Ряд 2). Показаны: линия регрессии Y по $\log_2 T$, где: Y – индекс, прогнозируемый по уравнению $Y = (0,441)\log_2 T + 1,302$, имеющего оценку адекватности $R^2 = 0,871$ для антигена НГП (Ряд 1); то же по уравнению $Y = (0,419)\log_2 T + 1,275$, имеющего оценку адекватности $R^2 = 0,890$ для антигена ВГП (Ряд 2).

Процедура проведения острого опыта полностью соответствовала общепринятой методике [518]. Как следует из полученных результатов вакцина «АвиФлуВак» на основе антигена НГП и использованная в качестве контроля вакцина на основе антигена ВГП, обеспечили защиту 100% иммунизированных птиц при введении одного прививного объема, что доказывает возможность их практического применения в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Однако, результаты регрессионного анализа показали, что (с учетом возможной статистической ошибки прогноза) прививной объем препарата «АвиФлуВак» содержал 96 ($93 \div 120$) PD_{50} , а прививной объем контрольного препарата содержал 38 ($28 \div 51$) PD_{50} . 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 раз – рекомендуемую концентрацию [518].

Содержание антигена в контрольном препарате соответствовало нижней границе эффективного количества (35 PD_{50}) [472].

***Изучение протективной активности вакцины против гриппа птиц H5
«АвиФлуВак» на утках***

Для изучения эффективности вакцинации препаратом «АвиФлуВак» водоплавающих птиц был поставлен в лабораторных условиях эксперимент на утках. Всего было использовано 20 голов суточных утят и 150 голов утят в возрасте 21 суток.

Суточных утят разделили на две группы по 10 голов и вакцинировали препаратом «АвиФлуВак» серия № 010122 внутримышечно в дозе $0,25 \text{ см}^3$ и в дозе $0,5 \text{ см}^3$, соответственно. Через 28 суток после вакцинации от утят получали сыворотки крови и исследовали на наличие антител (Ат) к вирусу ГП H5.

Утят в возрасте 21-сутки разделили на четыре группы по 35 голов в каждой. Утят первой опытной группы привили вакциной «АвиФлуВак» серия № 010122 в дозе $0,5 \text{ см}^3$; утят второй группы - в дозе $1,0 \text{ см}^3$; утят третьей - в дозе $1,5 \text{ см}^3$. Всех утят прививали внутримышечным методом в бедро. Утят четвёртой группы не прививали (контроль). Через 7, 14 и 21 суток от утят каждой группы отбирали пробы крови для контроля сероконверсии к вирусу ГП H5. Через 28 суток после вакцинации утят опытных групп в количестве по 10 голов заражали вирулентным вирусом гриппа А подтипа H5 A/chicken/Stavropol/2077-6/21 H5N1 в дозе $6,0 \text{ lg ЭИД}_{50}$ внутримышечно в бедро в объёме $0,5 \text{ см}^3$. Срок клинического наблюдения за заражёнными утятами составил 10 дней.

Через шесть суток после заражения у утят отбирали ротоглоточные смывы на предмет выявления генома вируса ГП H5 методом ПЦР. Для отбора ротоглоточных проб использовали стерильные тупферы. Пробы отбирали через шесть дней после заражения от всех утят соответствующих групп. Определяли пороговые циклы амплификации (C_t) в контроле (C_{t0}), и в группах вакцинированных птиц (C_{ti}). Реакцию считали положительной (геном вируса ГП H5 присутствует), если $0 < C_t < 37$ (18). Далее проводили сравнения с контролем и вычисляли разность

сопоставляемых величин ($d_i = C_{t_i} - C_{t_0}$). Кроме этого по групповым выборкам d рассчитывали средние оценки разности (D) и стандартные ошибки измерения средних ($\pm s$).

Иммуногенность вакцины ВНИИЗЖ «АвиФлуВак» для уток определяли в лабораторных опытах по результатам устойчивости к контрольному заражению, по титрам сывороточных антител и по выделению вируса во внешнюю среду с индикацией в ПЦР.

В таблице 79 представлены результаты исследований сывороток крови утят разного возраста на наличие антител к вирусу гриппа птиц H5 в РТГА.

Таблица 79 – Титры антител к вирусу ГП H5 в РТГА в сыворотках крови утят иммунизированных вакциной «АвиФлуВак»

Возраст птиц на момент вакцинации, сут.	Прививная доза, см ³	Титры антител (log ₂) после вакцинации			
		7 сут.	14 сут.	21 сут.	28 сут.
1	0,25	н/и	н/и	н/и	1,3±0,6
	0,5	н/и	н/и	н/и	4,4±0,3
21	0,5	0,9±0,6* (0)	0,9±0,6 (0)	4,3±0,5 (4,5)	4,4±0,6
	1,0	3,1±0,6 (1)	3,1±0,6 (4,0)	5,0±0,4 (5,0)	5,1±0,4
	1,5	2,1±0,8 (1)	2,1±0,8 (1,5)	6,1±0,5 (6,0)	6,2±0,6

Примечание: * - среднее значение титра антител и его ошибка в РТГА, в скобках медиана (Me) выборки; н/и - не исследовали

Из данных, представленных в таблице 79 следует, что суточные утята, вакцинированные в дозе 0,25см³ вырабатывали антитела к вирусу ГП H5 в низких неоднородных титрах ($P > 0,05$). В то же время титры антител к вирусу ГП H5 в группе утят, привитых в дозе 0,5см³, через 28 суток достигли значения 4,4 log₂ при хорошей однородности ($P \leq 0,001$).

У вакцинированных в возрасте 21 сутки утят независимо от дозы вакцины (0,5; 1,0; или 1,5 см³) антитела к вирусу ГП H5 формировались в сопоставимых

титрах. Сероконверсию в группах вакцинированных утят отмечали через 7 суток, с максимальными значениями титров Ат через 28 сутки после вакцинации.

Статистическая обработка результатов первичных значений титров антител через 28 сутки после вакцинации в экспериментальных группах была проведена методом однофакторного дисперсионного анализа (по Шеффе). Было установлено, что статистика F-теста меньше критического значения F ($F_{\text{теста}} 3,0 < F_{\text{крит.}} 3,4$), т.е. средние значения титров антител для трёх групп не различались.

Для определения протективных свойств вакцины «АвиФлуВак» в отношении ВГП Н5 вакцинированных уток заражали вирусом A/chicken/Stavropol/2077-6/21 H5N1. В таблице 78 представлены результаты эксперимента.

Таблица 78 – Протективное действие вакцины «АвиФлуВак» у утят при заражении вирусом гриппа А подтипа H5N1

Срок наблюдения, сут.	Опытные группы утят в соответствии с прививной дозой, см ³			Контроль
	0,5	1,0	1,5	
1	0/10*	0/10	0/10	0/10
2	0/10	0/10	0/10	0/10
3	0/10	0/10	0/10	0/10
4	0/10	0/10	0/10	0/10
5	0/10	0/10	0/10	2/10
6	0/10	0/10	0/10	5/9 (1 пала)
7	0/10	0/10	0/10	5/9
8	0/10	0/10	0/10	5/9
9	0/10	0/10	0/10	5/9
10	0/10	0/10	0/10	5/9

Примечание: * - отношение количества больных утят к общему количеству утят в группе

Из данных, представленных в таблице 78 видно, что вакцинированные утята во всех опытных группах в течение 10 суток после заражения высоковирулентным

вирусом ВГП H5N1 не заболевали. В группе не вакцинированных птиц у шести утят отмечали признаки болезни, в том числе одна пала.

Также для установления напряжённости иммунитета у вакцинированных уток проводили исследования по выявлению экскреции вирулентного вируса. Задача данного этапа работы состояла в обнаружении в ротоглоточных экскретах птиц генома вируса ГП H5 через шесть суток после заражения.

Было установлено, что геном вируса ГП H5 присутствовал во всех исследованных пробах. Однако, относительно контроля, исходная концентрация вирусного материала в ротоглоточных экскретах у вакцинированных птиц была существенно ниже. Так, пороговые циклы амплификации (C_t), в контрольной группе были в пределах $20,93 \div 25,47$, в среднем 23,83, в группе вакцинированных в дозе $0,5 \text{ см}^3$ утят - в пределах $24,49 \div 29,46$, в среднем 26,84, в группе вакцинированных в дозе $1,0 \text{ см}^3$ утят - в пределах $23,08 \div 30,29$, в среднем 27,5, в группе вакцинированных в дозе $1,5 \text{ см}^3$ утят - в пределах $26,12 \div 31,41$, в среднем 28,32. Если принять, что один цикл амплификации приблизительно соответствует удвоению количества целевого продукта, то в процентах от контроля исходная концентрация вирусного материала в тестируемой пробе может быть описана как $J = (1/2^D) \times 100$. Таким образом соответственно вакцинированным группам искомые оценки составили (%): $J_I = 10,8$; $J_{II} = 6,9$ и $J_{III} = 3,9$, т.е. иммунизированные вакциной «АвиФлуВак» в дозе $0,5 \text{ см}^3$ утки выделяли вирус в 9 раз меньше, вакцинированные в дозе $1,0 \text{ см}^3$ - в 14 раз меньше, а вакцинированные в дозе $1,5 \text{ см}^3$ - в 26 раз меньше вируса по сравнению с не вакцинированными птицами.

Таким образом, вакцинация утят препаратом «АвиФлуВак» способствовала снижению вирусвыделения вакцинированными птицами по сравнению с не вакцинированными, причём, чем больше была доза вакцины, тем снижение было более значимым.

В ходе проведенного эксперимента было показано, что вакцина «АвиФлуВак» обладает высокой антигенной активностью, достаточной для

формирования иммунитета у уток при прививке в дозах от 0,5 до 1,5 см³. Прививка суточных утят в дозе 0,25 см³, была недостаточной для защиты птицы.

Не вакцинированные утята были менее чувствительны к заражению вирулентным вирусом H5 клады 2.3.4.4b по сравнению с курами и индейками, и у 60% наблюдали болезнь, что согласуется с данными Ahmed Kandeil, который сообщил о низкой чувствительности не вакцинированных уток при заражении вирусом H5 клады 2.2.1.2 H5N1 [268]. Этот факт свидетельствует о том, что утки-вирусоносители способны поддерживать резервуар возбудителя ВГП.

Изучение протективной активности вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак» на индейках

В рамках регистрационных действий были проведены исследования по определению прививного объёма, кратности вакцинации для разных видов домашних птиц, в том числе и для индеек в лабораторных условиях.

Было использовано 40 голов индюшат в возрасте 10 суток из благополучного по острым инфекционным болезням птиц хозяйства. Индюшат в возрасте 10 суток разделили на четыре группы по 10 голов в каждой. Птицу трёх опытных групп вакцинировали препаратом «АвиФлуВак» внутримышечно в дозах: 0,25 см³, 0,5 см³ и 1,0 см³, соответственно. Четвёртую группу индеек не вакцинировали (контроль). Через 21 сутки после вакцинации от птиц отбирали кровь для исследований на наличие антител к вирусу ГП подтипа H5 в РТГА набором ФГБУ «ВНИИЗЖ». Затем птицу заражали вирусом A/chicken/Stavropol/2077/6/21H5N1 в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀ внутримышечно в бедро в объёме 0,5 см³. Срок клинического наблюдения за заражённой птицей составил 10 суток.

Перед заражением определяли гуморальный поствакцинальный иммунный ответ у индеек и было установлено, что в группе индеек, привитых в дозе 0,25 см³, средний титр антител составил: $3,3 \pm 0,6 \log_2$, в группе, привитых в дозе 0,5 см³ - $4,0 \pm 0,6 \log_2$, а в группе, привитых в дозе 1,0 см³ - $4,9 \pm 0,4 \log_2$.

В таблице 79 представлены результаты эксперимента.

Таблица 79 – Протективное действие вакцины «АвиФлуВак» у индеек при заражении вирусом гриппа А подтипа H5N1

Срок наблюдения, сут.	Опытные группы в соответствии с прививной дозой, см ³			Контроль
	0,25	0,5	1,0	
1	0/7*	0/9	0/8	0/8
2	0/7	0/9	0/8	2/8
3	0/7	0/9	0/8	6/6
4	1/7	0/9	0/8	-
5	2/6	1/9	0/8	-
6	1/4	2/8	0/8	-
7	1/3	1/6	1/8	-
8	0/2	0/5	0/7	-
9	0/2	1/4	0/7	-
10	0/2	0/4	0/7	-
Протективный эффект, %	28,6 (2/7)**	44,4 (4/9)	87,5 (7/8)	0 (0/8)

Примечание: * - отношение количества павших птиц к общему количеству птиц в группе: ** - отношение выживших птиц к общему количеству птиц в группе

Из данных, представленных в таблице 79 видно, что устойчивость вакцинированных индеек к заражению высоковирулентным вирусом гриппа птиц H5N1 в разных группах отличалась. Так, наибольшей устойчивостью обладали индейки, привитые вакциной в дозе 1,0 см³ - 87,5%, а наименьшей индейки, привитые вакциной в дозе 0,25 см³ - 28,6%. Не привитые индейки пали через трое суток после заражения ВГП.

Таким образом, однократная прививка индейки вакциной «АвиФлуВак» в дозе 1,0 см³ вызывала формирование наиболее напряжённого иммунного ответа к ВГП H5, что выражалось высокой протективной активностью - 87,5% поголовья не заболело и образованием высоких титров антител - $4,9 \pm 0,4 \log_2$.

Результаты проведенных доклинических исследований показали, что вакцина против гриппа птиц H5 инактивированная эмульсионная «АвиФлуВак» при соблюдении технологии изготовления, условий хранения и Инструкции по применению зарекомендовала себя как высокотехнологичный, качественный препарат, который можно безопасно и с высокой эффективностью использовать для профилактики гриппа птиц.

3.3.3.2 Клинические исследования вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак» инактивированной эмульсионной

Согласно Приказу Минсельхоза России от 24.03.2021 N 158 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов высокопатогенного гриппа птиц» клинические испытания вакцины против гриппа птиц H5 проводили на птицах в личных подсобных хозяйствах и птицеводствах открытого типа содержания.

Оценка эффективности применения вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак» на курах в ЛПХ

Клинические испытания вакцины «АвиФлуВак» серия 010122 в условиях ЛПХ проводили на территории Кировской области на домашней птице (куры) в количестве 68 гол.

Безопасность вакцины оценивали по результатам клинического состояния птицы в течение 28 суток после вакцинации. Антигенность вакцины оценивали по результатам серологического исследования сывороток крови птиц методом РТГА до вакцинации и через 28 дней после вакцинации.

Результаты оценки безопасности вакцины «АвиФлуВак» при применении на курах в ЛПХ граждан представлены в таблице 80.

Таблица 80 - Данные по безопасности вакцины «АвиФлуВак» при применении на курах в ЛПХ граждан

Наименование ЛПХ	Клиническое состояние	Потребление корма и воды	Продуктивность
Березин А.В.	Без изменений	Без изменений	Без изменений
Мышкин С.И.	Без изменений	Без изменений	Без изменений
Перевалова М.С.	Без изменений	Без изменений	Без изменений
Чувашова Н.В.	Без изменений	Без изменений	Без изменений

Из данных, представленных в таблице 80 видно, что вакцина была безопасна для домашней птицы, т.к. клиническое состояние, потребление корма и воды и продуктивность птицы оставались неизменными в течение 28 дней после вакцинации.

Таким образом, вакцина была безопасна для птицы при применении в ЛПХ граждан.

В таблице 81 представлены результаты оценки иммуногенности вакцины при применении в ЛПХ.

Таблица 81 – Антигенная активность вакцины «АвиФлуВак» после применения на курах в ЛПХ граждан

Наименование ЛПХ	Статус	Кол-во, шт.	Титры антител в РТГА, log ₂											Средний титр
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Перевалова	д/в	5	5											0
Перевалова	п/в	13								2	6	5		8,2±0,2
Чувашова	д/в	9	9											0
Чувашова	п/в	19					1		4	3	3	6	2	7,7±0,4
Березин	д/в	10	9	1										0,1±0,1
Березин	п/в	26					1		3	11	8	1	2	7,4±0,2
Мышкин	д/в	3							7			2		6,6±0,4
Мышкин	п/в	3								1		2		8,3±0,6

Из данных таблицы 81 видно, что птица в ЛПХ Переваловой, Чувашовой, Березина была серонегативной к вирусу гриппа птиц подтипа H5 и только в ЛПХ

Мышкина птица была серопозитивной к этому вирусу и обладала титрами антител $6,6 \log_2$. Через 28 дней после однократной вакцинации происходила сероконверсия к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в ЛПХ Переваловой, Чувашиной, Березина до уровня $8,2$, $7,7$ и $7,4 \log_2$, соответственно. В группе птиц из ЛПХ Мышкина сероконверсия к вирусу гриппа птиц подтипа H5 происходила до уровня $8,3 \log_2$.

Таким образом, вакцина «АвиФлуВак» была эффективной для защиты кур от гриппа птиц подтипа H5 при применении в ЛПХ граждан.

**Оценка эффективности применения вакцины против гриппа птиц H5
«АвиФлуВак» в ООО «Башкирская птица» на гусях**

В Башкортостане в производственных условиях на гусеводческой ферме ООО «Башкирская птица» были проведены две серии экспериментов. Первый заключался в вакцинации тридцати голов молодняка 2022 г.р. однократно, второй - в вакцинации тридцати голов родительского стада двукратно.

В таблице 82 представлены результаты определения титров сывороточных антител к вирусу ГП H5 у вакцинированных гусей.

Таблица 82 - Результаты исследований в РТГА сывороток крови гусей, привитых вакциной «АвиФлуВак» на наличие антител к вирусу гриппа птиц H5

Кратность вакцинации	Титры антител ($\log_2$) в разные сроки после вакцинации				
	д/в	1 мес.	2 мес.	7 мес.	10 мес.
Однократно	н/д	$3,7 \pm 0,6$ (16/33*, 48,5)	$1,9 \pm 0,4$ (7/30, 23,3)	н/д	н/д
Двукратно	$0,8 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,5$ (25/30, 83)	н/д	$6,5 \pm 0,5$ (22/29, 76)	$6,8 \pm 0,3$ (27/30, 90)

Примечание *- сероконверсия выражена отношением числа птицы с титром антител в РТГА выше $5 \log_2$ в числителе, к общему количеству исследованных птиц, выраженной в %, д/в - до вакцинации, н/д - нет данных

Данные, представленные в таблице 82 свидетельствуют, что после однократной иммунизации вакцина вызывала образование антител к вирусу ГП H5

у 48,5% поголовья гусей через один месяц после вакцинации в титре $3,7 \log_2$, а через 2 месяца после вакцинации количество птицы с защитными титрами антител составило только 23,3% и средний титр по группе составил $1,9 \log_2$.

Из данных, представленных в таблице 82, также видно, что минимальный защитный титр антител ($\geq 5 \log_2$) к вирусу ГП Н5 после двукратной вакцинации наблюдался у 22-27 из 30 голов птиц в течение 10 месяцев, т.е. охват поголовья был на уровне 76-90%. Также в этот период и средние титры антител были на высоком уровне в пределах $6,3 \div 6,8 \log_2$.

Оценка эффективности применения вакцины против гриппа птиц Н5 «АвиФлуВак» на индейке

В производственных испытаниях вакцину «АвиФлуВак» применяли на промышленном поголовье индеек в Ставропольском края в возрасте 1 сутки и 28 суток.

Экспериментальную группу индеек в количестве 700 голов в суточном возрасте вакцинировали в дозе $0,2 \text{ см}^3$, затем в возрасте 28 суток её разделили на две группы по 350 голов и повторно вакцинировали в дозе $0,5 \text{ см}^3$ и в дозе $1,0 \text{ см}^3$, соответственно.

Напряжённость иммунитета индеек к вирусу ГП Н5 оценивали по титрам антител в РТГА через 35 дней после второй вакцинации.

Было установлено, что средние титры антител в группе индеек, привитых двукратно в дозе $1,0 \text{ см}^3$, были $5,5 \pm 0,2 \log_2$, а в группе индеек, привитых в дозе $0,5 \text{ см}^3$ - $3,5 \pm 0,3 \log_2$. Статистически, полученные результаты различались с высокой степенью достоверности - 99,9%.

На основании результатов лабораторных и производственных испытаний вакцины «АвиФлуВак» на индейках были установлены оптимальные параметры её использования, а именно: доза равная $1,0 \text{ см}^3$ и кратность - не менее двух раз.

На основании вышеизложенного для крупных и водоплавающих видов домашних птиц рационально применять вакцину АвиФлуВак против ГП Н5 в

двойной коммерческой дозе и, как минимум, двукратно с последующим контролем напряженности иммунитета и проведением ревакцинаций по показаниям.

Клинические испытания вакцины против гриппа птиц H5 инактивированной эмульсионной «АвиФлуВак» позволили считать препарат безопасным и эффективным для птицы.

На основании проведённых доклинических и клинических испытаний приказом Россельхознадзора от 01.08.2022 № 1152 принято решение о государственной регистрации лекарственного препарата для ветеринарного применения «АвиФлуВак» - вакцины для профилактики гриппа птиц разработанной в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Вакцина разработана для реализации противоэпизоотических мероприятий в России и странах зарубежья, и предназначена для профилактики гриппа А подтипа H5 у птиц, содержащихся на птицефабриках, в личных подсобных хозяйствах и зоопарках в зонах высокого риска.

Преимущество новой вакцины заключается в ее высокой иммуногенности, т.е. способности защищать птицу от заражения актуальными высокопатогенными вирусами гриппа А подтипа H5. От основных конкурентов препарат отличается высокой безопасностью, связанной с использованием в ее составе антигена, изготовленного на основе низкопатогенного вируса гриппа А подтипа H5. Использование антигенов на основе низкопатогенного гриппа А в составе вакцины рекомендовано Всемирной организацией здравоохранения животных.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из вирусных заболеваний птиц наибольшую угрозу для птицеводства представляют грипп птиц и ньюкаслская болезнь. Это высококонтагиозные болезни, которые наносят значительный экономический ущерб, требуют строгих карантинных мер, постоянного мониторинга и немедленного реагирования.

Ньюкаслская болезнь – высококонтагиозное вирусное заболевание птиц, главным образом куриных, характеризующееся поражением органов дыхательного и пищеварительного трактов, центральной нервной системы. НБ регистрируют во всем мире, она включена в список нотифицируемых болезней ВОЗЖ, так как наносит колоссальный экономический ущерб и препятствует международной торговле [105; 524].

Научные исследования, проведенные в последние десятилетия, убедительно свидетельствуют о неуклонной эволюции вируса НБ. При этом штаммы новых генотипов часто проявляют себя как высоковирулентные [183]. Выделенные в 80-е годы во время эпизоотий в Европе, варианты вируса НБ были отнесены к генотипу VII [321], который в течение 20 лет распространился во многие страны с развитым птицеводством [183].

В последние десятилетия наиболее актуальными для птицеводства являются генотип VII для стран Старого Света и генотип V (включая вновь выделенный генотип XIX) для стран Америки. Две линии генотипа VII 2 (ранее названные субгенотипами VIIh и VIIi) были выявлены в Индонезии в 2010 г. [535]. В течение нескольких следующих лет первая из них проникла в Малайзию [238], Китай [320], ряд стран южной Африки [96] и Россию (NDV/chicken/Kaliningrad/184/2013). Вторая была в течение трех следующих лет выявлена в Пакистане [506], Индии [178], Израиле [373], Ливии [267], Турции, Грузии и Болгарии [213]. Вспышки НБ, вызванные ВНБ субгенотипа VIIi, впервые были зарегистрированы в республике Крым в конце 2015 г. и продолжались весь 2016 г., что на тот период времени являлось самой крупной и продолжительной эпизоотией НБ у сельскохозяйственных птиц в России за несколько последних десятилетий. Это

вполне оправдывает характеристику обеих групп генотипа VII вируса ньюкаслской болезни, как обладающих панзоотическим потенциалом [342].

К настоящему времени определены девять генотипов вирусов НБ класса I (авирулентные штаммы) и не менее 10 из класса II (вакцинные и вирулентные штаммы) – это разнообразная и постоянно эволюционирующая группа вирусов. Появление новых вирулентных штаммов генотипа класса II, вызывающих эпизоотии, связано с тем, что вирусы разных генотипов одновременно развиваются в различных географических зонах по всему миру, чему способствует большое видовое разнообразие птиц, восприимчивых к НБ [105; 183]. Эпизоотии НБ во многих странах Азии и Европы за последние 20 лет были вызваны вирусами разных подтипов VII генотипа [93; 97; 98; 192; 236; 261; 342; 348; 350; 355; 383; 412; 415; 425; 448; 488; 498; 505; 538]. В Российской Федерации вирус данного генотипа впервые вызвал вспышку болезни на птицефабрике в Амурской области в 2006 г. и используется в настоящее время как штамм для контрольного заражения [68]. В последующие годы вирусы НБ VII генотипа вызывали спорадические вспышки у домашних птиц ЛПХ в разных регионах страны. В 2016 г. возникла эпизоотия НБ у домашних птиц ЛПХ на территории Р. Крым (21 неблагополучный пункт).

В 2019 г. произошло резкое обострение ситуации по ньюкаслской болезни с распространением вируса НБ субгенотипа VII L (по новой классификации - VII 1.1 [182] по всей территории РФ от Приморского края до Курской области. В итоге было зарегистрировано 17 неблагополучных пунктов, все – в ЛПХ, на не вакцинированном поголовье [83; 236]. Есть основания предполагать, что НБ могла охватить и птицефабрики, в которых плановая специфическая профилактика осуществлялась не на должном уровне с использованием неэффективных импортных вакцин и без систематического контроля напряженности иммунитета. Однако зарегистрированных случаев в промышленном птицеводстве установлено не было. Вероятно, благодаря ревакцинациям поголовья при возникновении подозрений на НБ, специалистам хозяйств удавалось купировать очаги и защищать поголовье без огласки.

Вирус субгенотипа VII L, выделенный в РФ в 2019 г., является наиболее близким к группе изолятов из Ирана, получившей название подтипа VII L [201]. В Иране было показано высокое сходство изолятов между собой, их принадлежность генотипу VII, соответствие критериям выделения нового субгенотипа, а также филогенетическая близость к известным ранее и широко распространенным субгенотипом VIId. Эти же авторы [201] в дальнейшем значительно увеличили число изученных изолятов данной группы, показали их распространение практически по всем провинциям Ирана, а также отметили, что сходством с данной группой обладает частичная последовательность гена F, изолята, выделенного в Иране еще в 1999 г. [417] Molouki A. с соавторами показали широкое распространение вирусов подтипа VII-L как в мелких крестьянских хозяйствах, так и на коммерческих птицефабриках [349]. Опыт появления новой сублинии ВНБ генотипа VII показывает опасность подобных процессов и в других местах, поскольку вирусы субгенотипа VIId являются эндемичными во многих странах Евразии и Африки, а также были отмечены и в Америке [184].

Таким образом, болезнь Ньюкасла остается постоянной угрозой для производителей мяса птицы во всем мире, несмотря на доступность и повсеместное применение вакцин против НБ с 1950-х годов [270]. В последние десятилетия в результате непрерывной эволюции вируса ньюкаслской болезни появилось в общей сложности двадцать генотипов, и генетические вариации могут быть связаны со вспышками заболеваний у вакцинированных кур [250].

Проведенные нами опыты по изучению эффективности вакцин производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» для профилактики болезни Ньюкасла из штамма «Ла-Сота» против актуальных вирусов НБ VII генотипа, выделенных на территории Российской Федерации в 2013, 2017 и 2019 гг. показали, что вирулентность возбудителя НБ, циркулирующего с 2019 г. по настоящее время заметно возросла по сравнению с вирусами, выделенными в предыдущие годы. В ходе проведения острых опытов было установлено, что новый вирус НБ генотипа VII L способен преодолевать поствакцинальный иммунитет, создаваемый живыми вакцинами.

После однократной вакцинации интраназальным способом живой вакциной из штамма «Ла-Сота» показатель смертности после контрольного заражения достигал значения 60% при введении изолята вируса 2019 г. «Краснодар», тогда как при заражении вирусом 2013 г. «Калининград» смертность иммунизированных птиц равнялась нулю. Схема вакцинации, предусматривающая двукратное применение живых вакцин из штамма «Ла-Сота» интраназально предотвращала гибель птиц и клиническое проявление болезни, однако не предотвращала репликацию вируса, так как титры гуморальных антител после контрольного заражения увеличивались в 50-100 раз. В то время, как схема вакцинации с использованием бустерной вакцинации (живых и инактивированной вакцин) предотвращала гибель, клинические признаки болезни и репликацию вирулентного вируса [83].

Полученные нами данные совпадают с результатами других ученых, которые заявляют, что использование живых вакцин против НБ может защитить птицу только от клинического переболевания вышеназванной инфекцией, но не способны блокировать репликацию и выделение филогенетически отличающихся вирулентных изолятов, особенно VII генотипа [74; 250; 251; 274; 344].

С учетом изменения эпизоотической обстановки по болезни Ньюкасла и появлении на территории РФ с 2019 г. вируса НБ генотипа VII L, обладающего способностью преодолевать поствакцинальный иммунитет, мы посчитали необходимым проверить эффективность иммунобиологических препаратов против данного заболевания различных производителей: как вакцин «нового» поколения – векторных (где вектором является вакцинный вирус герпеса индеек, в геном которого встроен фрагмент, кодирующий F-белок вируса НБ), так и традиционных живых, но с разным количеством вируса НБ в одной прививной дозе. Изученные коммерческие препараты специфической профилактики НБ («Векормун ND», «Хиправиар», «Севак Витапест L», «Ла-Сота») создавали неодинаковый уровень иммунитета против полевого изолята «Краснодар» генотипа VII L. Из живых вакцин наименее активной по показателю заболеваемости оказалась вакцина «Хиправиар», где соответствующая оценка составила значение $In = 50,0 \pm 16,7\%$.

При этом из числа заболевших птиц 80% (4/5) пало. Практически аналогичную эффективность показал препарат «Севак Витапест», действие которого не смогло предупредить летальность у всех заболевших особей ($I_n = 40,0 \pm 16,3\%$ и $L_e = 40,0 \pm 16,3\%$). Вакцина «Векормун ND» не защитила от инфекции большее количество птиц ($I_n = 44,4 \pm 17,6\%$), однако смогла предупредить большее число летальных случаев ($L_e = 22,2 \pm 14,7\%$). Протективный эффект всех перечисленных препаратов находился в диапазоне $50,0 \leq P_r \leq 60,0\%$. Вакцина из штамма «Ла-Сота» лидировала как при однократном ($P_r = 80,0 \pm 13,3\%$), так и при двукратном ($P_r = 100\%$, все птицы были защищены) применении.

Допустимо считать, что при применении живых вакцин напряженность поствакцинального иммунитета против высоковирулентных штаммов вируса НБ существенно зависит от величины иммунизирующей дозы вакцинного вируса. В нашем эксперименте связь между величиной иммунизирующей дозы и протективным эффектом препарата была достаточно очевидна. Например прививная доза (I_g ЭИД₅₀) вакцины «Ла-Сота» ($\geq 7,7$) более чем на порядок превосходила аналогичный показатель препарата «Хиправиар» ($\geq 6,5$) и более чем на два порядка - вакцины «Севак Витапест» ($\geq 5,5$). Возможно, что для создания протективного иммунитета против вируса НБ необходим достаточно широкий масштаб презентации иммунокомпетентных клеток (вакцина «Векормун ND» имеет другой принцип действия и в аспекте дозы здесь не рассматривается). Для живых вакцин против НБ зависимость между величиной прививной дозы и защищающей способностью препарата (в том числе и для гетерологичных пробойников) была не однократно показана [171, 183]. В группе тестируемых препаратов по параметрам P_r и L_e , вакцина из штамма «Ла-Сота» оказалась наиболее иммуногенной. Эффективность данного препарата, очевидно, была связана с величиной иммунизирующей дозы ($\geq 7,7$), которая среди испытанных живых вакцин была наибольшей и обеспечила более эффективный иммунный ответ.

Высокие показатели заболеваемости и летальности после применения живых вакцин могли быть также обусловлены отсутствием антигенной гомологии между вакцинными штаммами и штаммом-пробойником. Связь между протективным эффектом вакцинного штамма и его генетической близостью к штамму-пробойнику была экспериментально подтверждена другими исследователями [459].

Разработчиками векторного препарата против НБ, было установлено, что в острых опытах, в зависимости от генотипа вируса НБ, заболеваемость привитых птиц могла быть от 0 до 75% [92]. В других сообщениях, заболеваемость птиц, привитых векторной вакциной, против штаммов генотипа VII не превышала 5% [371]. На этом основании возможно допустить, что экспрессируемый препаратом «Векормун ND» антиген и использованный в наших экспериментах изолят «Краснодар» вируса НБ генотипа VII L имели низкий уровень антигенной гомологии.

Полученные нами данные согласуются с другими исследованиями. Многие ученые отмечают, что на эффективность вакцин влияет степень их соответствия циркулирующим вирусам и с появлением новых генотипов вируса ньюкаслской болезни результативность применения традиционных вакцин снижается [50; 74; 183; 250]. Вирус ньюкаслской болезни имеет быструю эволюцию возбудителя. Например, установлено, что наследуемая вариация структуры эпитопа гемагглютинин-нейраминидазы произошла в течение шести лет у 22 из 56 изолятов вируса НБ [165]. Таким образом антигенная удаленность вакцинных и полевых штаммов может быть одной из главных причин снижения эффективности вакцин против НБ, применяемых на практике.

В большинстве стран, где НБ является эндемическим заболеванием, птицам вводят инактивированные вакцины на основе штамма «Ла-Сота». Однако установлено, что аминокислотное сходство белков F и HN между традиционными вакцинными штаммами и доминирующими вирусами НБ составляет 87–89% и 87–88% соответственно [189; 344]. Инактивированные вакцины на основе штамма

«Ла-Сота» вызывают значительно более низкие титры гемагглютинирующих антител против гетерологичного вируса, чем против гомологичного антигена [249; 328; 339; 540]. Более того, даже если куры, вакцинированные традиционными вакцинами, полностью защищены от заболеваний и смертности, хотя они всё равно могут выделять большое количество вируса [251; 274; 344]. Эти результаты могут объяснить частое возникновение нетипичной формы НБ у поголовья, вакцинированного традиционными вакцинами.

Традиционные вакцины против ВБН выдержали испытание временем, продемонстрировав свою защитную эффективность за последние 60 лет. Однако эти вакцины не способны блокировать репликацию и выделение большинства циркулирующих в настоящее время филогенетически дивергентных вирулентных изолятов вируса ньюкаслской болезни. Следовательно, для решения этих проблем, связанных с вакцинацией, крайне необходимы рационально разработанные вакцины, нацеленные на преобладающие генотипы, так называемые вакцины, соответствующие генотипу [130].

Miller P.J. с соавторами одними из первых в своих исследованиях показали, что вакцины против НБ, созданные на основе вирусов, филогенетически близких к потенциальным вирусам-возбудителям, могут обеспечить более эффективный контроль ньюкаслской болезни за счёт снижения выделения вируса инфицированными птицами [344]. В некоторых странах применение новых вакцин для домашней птицы, соответствующих генотипу, успешно подавляет циркуляцию вирулентных штаммов ВБН в полевых условиях [207; 249; 297; 410; 460].

В последние годы на рынок некоторых стран неблагополучных по ньюкаслской болезни вышел ряд вакцин против НБ где проблема подбора генотипа была решена с помощью обратной генетики. Рекомбинантные вакцины, специфичные для генотипа VII NDV, были созданы с помощью различных стратегий [146; 165; 249; 280; 331; 535]. Некоторые из этих вакцин-кандидатов уже поступили в продажу в разных странах: Корее [164; 179; 460], Китае [249], Египте [179; 460] и Мексике [250].

Вакцины, соответствующие генотипу, являются гомологичными преобладающим вирусам и более эффективны в предотвращении выделения вируса [317]. Таким образом, возникает вопрос о том, какие генетические или антигенные вариации чаще встречаются в полевых вирусах под воздействием гомологичных вакцин. Проведённый эксперимент с использованием метода нейтрализации сывороток *in vitro*, показал, что не существует значительных различий в вариациях генов F и HN генотипа VII NDV под давлением отбора, вызванного гомологичными и гетерологичными вакцинами [309]. Это указывает на то, что применение вакцин, соответствующих генотипу, может не изменить вариацию генотипа VII ВНБ.

В то же время некоторые ученые публикуют данные, что существующие вакцинные препараты против НБ обеспечивают такой же уровень клинической защиты, как и современные штаммы, и что антигенная гетерогенность циркулирующих штаммов не влияет на профили выделения вируса у иммунизированных птиц [189; 327]. Они предполагают, что вспышки и распространение вирулентных полевых штаммов ВНБ могут быть вызваны не антигенными вариациями, а слабым иммунитетом стада из-за ненадлежащей практики вакцинации. Однако, многие исследования неизменно подтверждают, что традиционные вакцины против ньюкаслской болезни даже если защищают от заболеваемости и смертности, то не снижают выделение вируса вакцинированными курами [249; 251; 274; 344; 535]. В таких условиях полевые вирусы могут незаметно распространяться в популяциях птиц вызывая нетипичные формы проявления ньюкаслской болезни.

Shahar Ehud с коллегами провели изучение генетических и иммунологических характеристик вирусов ньюкаслской болезни, выделенных из инфицированных, хотя и в значительной степени вакцинированных, стад. Между вакцинным штаммом и каждым из изолятов были выявлены аминокислотные различия в последовательностях белков F и HN, причём некоторые из них были связаны с нейтрализацией. Хотя все протестированные изоляты показали схожие титры ингибирования гемагглютинации (HI), для нейтрализации распространения полевых изолятов в эмбрионах по сравнению с вакцинным штаммом требовалось в

100–100 000 раз больше антител на вирус. В результате были разработаны модель и уравнение, объясняющие феномен ускользания от иммунного ответа у вирусов одного серотипа, а также позволяющие рассчитать значения HI, необходимые для защиты, в зависимости от скорости изменения ключевых позиций. В этой модели вирус вакцины может быть нейтрализован низкими титрами антител, индуцированными гомологичной вакциной, в то время как для нейтрализации полевых штаммов, содержащих вариации основных нейтрализующих эпитопов, требуются более высокие титры антител. Эта модель подтверждает необходимость разработки вакцин, гомологичных полевым вирусам [426]. Таким образом, для обеспечения надёжной защиты в полевых условиях необходимы как вакцины, соответствующие генотипу, так и надлежащие процедуры вакцинации.

В проведенных нами исследованиях эмульсионная инактивированная вакцина против НБ, изготовленная на основе антигена из штамма «ВНИИЗЖ G7», по изученным свойствам (интенсивности гуморальной иммунной реакции и протективному действию против вируса генотипа VII L) продемонстрировала более высокие показатели, чем аналогичный препарат на основе антигена из штамма «Ла-Сота». Было установлено, что в одной прививной дозе вакцины на основе антигена штамма «ВНИИЗЖ G7» содержалось 105 PD₅₀. Аналогичная оценка для препарата на основе антигена из штамма «Ла-Сота» имела величину 50 PD₅₀. Это означало, что протективный потенциал вакцины, содержащей антиген гомологичный заражающему штамму, был в два раза выше. Оценки титров антител всегда были выше при использовании в РТГА гомологичных антигенов. Проведенная нами оценка двустороннего антигенного родства (R, %) между штаммами «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» вируса НБ в РТГА определила этот показатель равным 18,3% [55].

Это согласуется с данным других исследователей, показавших, что иммунные сыворотки, полученные после вакцинации птиц антигеном штамма «Ла-Сота», тестируемые в РТГА с гомо- и гетерологичными антигенами (штаммов генотипа VII) демонстрировали значительные различия [311; 315; 540]. Это

предполагает, что для оценки поствакцинального иммунитета птиц против НБ целесообразно использовать в РТГА антигены актуальных эпизоотических штаммов вируса.

Разработанные нами инаktivированные вакцины, содержащие штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса НБ генотипа VII L, «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» и «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» показали свою высокую эффективность при применении в неблагополучных по НБ хозяйствах.

Параллельно с разработкой инаktivированных вакцин из вируса ньюкаслской болезни генотипа VII L проводился поиск кандидата штамма для живой вакцины, который по эффективности применения был сравним с препаратом из штамма «Ла-Соты», но не обладал реактогенностью. Известно, что вакцинный вирус штамма «Ла-Сота» в определенной степени сохраняет патогенные свойства, и, демонстрируя на организменном уровне субклиническую инфекцию, способен повреждать эпителий верхних дыхательных путей [366; 385], проникать в кровоток и распространяться в организме. Попадая в клетки эпителия воздушных мешков и миокарда [143], он нарушает гомеостаз птицы и влияет на ее продуктивность.

В аспекте использования, в составе живых вакцин заслуживают внимания лентогенные варианты вируса НБ, имеющие преимущественный аффинитет к эпителию кишечника (энтеротропные варианты), поскольку клетки слизистой оболочки кишечника быстро регенерируют, и этот тип ткани функционально более устойчив к воздействию возбудителя [385].

Факторы, определяющие тропизм, включают: специфические клеточные рецепторы, вирусный поверхностный тропоген, который способен взаимодействовать с соответствующими клеточными рецепторами, позволяющими вирусу проникнуть внутрь клетки; факторы транскрипции, участвующие в репликации вирусного генома. Наследуемый энтеротропный фенотип лентогенного варианта вируса НБ известен, данное свойство обусловлено особенностью оболочечного гликопротеина, который может расщепляться

трипсиноподобными ферментами, присутствующими только в клетках дыхательного и пищеварительного трактов. Показано, что энтеротропные варианты вируса менее вирулентны [95], но при этом способны индуцировать напряженный протективный иммунитет против полевых возбудителей НБ [311; 384].

В 2022 г. из проб клинического материала, полученного в ФГБУ «ВНИИЗЖ» от латентно инфицированных цыплят-бройлеров птицефабрики в Кемеровской области РФ был выделен изолят вируса НБ. Важной особенностью эпизоотического анамнеза было отсутствие у птиц признаков респираторных патологий. Вирус был адаптирован к развивающимся куриным эмбрионам. Индекс интрацеребральной патогенности вируса (ICPI) составил менее 0,2, что в соответствии с принятой классификацией [150; 526] позволило отнести его к лентогенным вариантам. При пассажах в системе культивирования вирус не изменил своих свойств, на этом основании был обозначен как штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн», обладающий наследуемым природно-ослабленным фенотипом и рассмотрен как перспективный вариант для живых вакцин.

Вирус изучаемого нами штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» обладал тропизмом как к тканям респираторной системы птицы, так и к ткани кишечника. Преимущественный аффинитет вируса установлен для кишечной ткани, в которой накопление вирусного генома было существенно выше ($p < 0,005$), чем в тканях респираторной системы.

Протективный эффект после прививки товарных цыплят вирусом штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀ был достаточно высокий – защита птиц при контрольном заражении вирусом НБ генотипа VII составила 93%. Аналогичный показатель был получен после иммунизации штаммом «Ла-Сота» в дозе 6,7 lg ЭИД₅₀. Данный показатель соответствует рекомендациям ВОЗЖ в отношении результатов испытания протективной функции живых вакцин против НБ.

При пероральном поступлении в организм птицы в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀ исследуемый вирус был способен индуцировать в организме птицы активный

гуморальный иммунный ответ. Через 15 сут после прививки титр циркулирующих антител к вирусу НБ составил величину более $4 \log_2$, или 1:16.

Индекс интрацеребральной патогенности вируса ICPI штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» приближенно составил 0,16, что значительно меньше данного показателя для штамма «Ла-Сота» (0,4) и при изучении безвредности в лабораторных и производственных условиях вакцина «ВНИИЗЖ НБ-Эн» была безвредной и ареактогенной [31].

На основе данного штамма был разработан новый препарат, который успешно прошел доклинические исследования и клинические испытания в птицеводческих хозяйствах [64]. В октябре 2023 г. вакцина под торговым наименованием «ВНИИЗЖ НБ-Эн» была зарегистрирована Россельхознадзором в установленном порядке.

Таким образом, для профилактики болезни Ньюкасла, в т.ч. для борьбы с высоковирулентным вирусом НБ генотипа VII L, были разработаны и предложены в ветеринарную практику три вакцины: «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» и «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Применение новых вакцин позволило улучшить эпизоотическую ситуацию по ньюкаслской болезни в РФ.

Особую опасность для рентабельного ведения птицеводства представляет высокопатогенный грипп птиц, т.к. заболевание является высококонтагиозным, а смертность поголовья может достигать 100%. Несмотря на принятую в Российской Федерации стратегию ограниченной целевой вакцинации птиц в личных подворных хозяйствах, не удалось предотвратить распространения вируса и его заноса в крупные промышленные предприятия закрытого типа [12; 14; 53; 67; 82].

Значимый экономический ущерб, причиняемый высокопатогенным гриппом птиц, обуславливает необходимость разработки средств специфической профилактики заболевания, и долгое время наиболее эффективными являлись инаktivированные цельновирсионные вакцины [334].

Исследования эффективности инаktivированных вакцин на основе как

высоко-, так и низкопатогенных вирусов показывают, что их протективная способность зависит от двух (возможно, взаимодополняющих) факторов: антигенного соответствия между заражающим и вакцинным вирусами [279; 298; 388] и величины прививной дозы антигена в вакцине [305; 388; 432; 469]. При этом использование для производства инаktivированных вакцин штаммов вируса ВГП не рекомендуется ВОЗЖ по причине их эпизоотической опасности [518; 522] и в связи с низким накоплением вирусного антигена в системе культивирования [37].

Большинство ученых доказывают, что для эффективной иммунизации против гриппа птиц требуется использовать антигенно родственные вирусы в составе вакцин [145; 275; 388]. Данные научных публикаций по эффективности вакцин в отношении гетерологичных (принадлежащих к разным генетическим линиям в пределах одного подтипа) вирусов носят противоречивый характер. Так, учеными из США с использованием разнообразных методов было установлено, что инаktivированные вакцины на основе цельного вируса подтипа H5 на 100% защищали цыплят от гибели при заражении гетерологичными вирулентными вирусами подтипов H5N8 и H5N2 клады 2.3.4.4 [275]. Основываясь на результатах перекрестной реакции гемагглютинации, другие исследователи установили, что вакцины на основе высоковирулентных вирусов H5N1 обладают разной протективной активностью в отношении вирулентного вируса [388]. Российские ученые указывали, что решающую роль в обеспечении эффективности вакцины играет концентрация антигена вируса гомологичного подтипа, и высоковирулентные вирусы H5 не всегда эффективны в качестве вакцинных штаммов из-за их низкого накопления в системе культивирования [37].

В ходе проведенного нами изучения иммуногенных свойств инаktivированных антигриппозных вакцин на основе разных антигенов (высоко- и низковирулентных) против актуальных высоковирулентных вариантов вируса гриппа птиц подтипа H5 было установлено, что антиген вируса низкопатогенного гриппа птиц штамма «Ямал» подтипа H5N1 в составе инаktivированной эмульгированной вакцины способен индуцировать выработку напряженного

иммунитета у кур против высокопатогенного гриппа птиц. В одной прививной дозе вакцины «АвиФлуВак» из штамма «Ямал» НГП содержалось 88 PD_{50} при контрольном заражении ВГП H5N1 и 92 PD_{50} при заражении высоковирулентным вирусом гриппа H5N8, в то время как вакцина из штамма «Приморский» ВГП H5N1 при заражении изолятом H5N8 в одной прививной дозе содержала всего 44 PD_{50} .

Известно, что поствакцинальный иммунитет влияет на выделение возбудителя из организма птицы, т.е. ограничивает контактную передачу вируса [469; 501]. Например, концентрация гемагглютинирующих антител равная $5,2 \log_2$ до четырех порядков снижала оральную вирусную экскрецию [147]. Аналогичные по тематике исследования показали подобные результаты [293]. Препарат «АвиФлуВак», примененный в 1/5 прививной дозы, на третьи сутки после контрольного заражения, по сравнению с контролем (не вакцинированная птица) редуцировал более двух порядков вируса в оральных мазках, и на седьмые сутки полностью блокировал вирусвыделение. Отсутствие прироста титра антител после искусственного заражения птиц, вакцинированных препаратом «АвиФлуВак», испытанного в 1/5 и в цельной дозах, свидетельствует о предотвращении генерализации вирусной инфекции в организме птицы.

По изученным показателям, отражающим иммуногенность, вакцина против гриппа птиц H5 инактивированная эмульсионная «АвиФлуВак» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» не уступала коммерческому аналогу – вакцине «Флу Протект H5», которая была использована в эксперименте в качестве контроля. При испытании в цельной и 1/5 от прививной дозы, по антигенному действию препарат «АвиФлуВак» достоверно превосходил контроль. Протективные коэффициенты, установленные после иммунизации в указанных дозах вакциной «АвиФлуВак» после искусственного заражения, полностью совпадали с контролем. При этом, препарат «АвиФлуВак» в 1/5 прививной дозы был эффективнее контроля по ограничению экскреции инфекционного вируса.

Установленные показатели иммуногенности препарата «АвиФлуВак» согласуются с аналогичными данными, опубликованными в научных изданиях

[229; 453]. Определение содержания протективных доз используется и для вакцин «нового поколения». Так, установлено, что такие вакцины способны нести антигенную нагрузку, обеспечивающую выработку напряженного иммунитета в отношении заражения гомо- и гетерологичными вирусами гриппа подтипа H5 клатов 2.3.2.1с и 2.3.4.4с. Определенное содержание PD_{50} составляло более 50, что позволяет в дальнейшем использовать испытанные вакцины в условиях текущей эпизоотии, однако при изменении свойств высоковирулентного вируса, вероятно, потребуется оценка протективных свойств в отношении нового патогена [269; 463].

Концентрация антигена в прививном объеме инаktivированной вакцины является важнейшей характеристикой препарата. Основным антигеном вируса (гемагглютинин) может быть измерен в абсолютных единицах, например, в весовых [386], или - в единицах действия, например в PD_{50} . Считается, что прививной объем эффективной вакцины против гриппа птиц должен содержать 50 PD_{50} или 3 мкг гемагглютинина [468; 518].

ВОЗЖ для специфической профилактики высокопатогенного гриппа птиц рекомендует использовать вакцины с количеством протективных доз не менее 50 [518], и по результатам проведенных нами экспериментов, очевидно, что вакцина из ВГП штамма «Ямал» удовлетворяет данному требованию, и значительно его превосходит.

Как следует из полученных нами результатов вакцина «АвиФлуВак» на основе антигена НГП и использованная в качестве контроля вакцина на основе антигена ВГП, обеспечили защиту 100% иммунизированных птиц при введении одного прививного объема, что доказывает возможность их практического применения в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Однако, результаты регрессионного анализа показали, что (с учетом возможной статистической ошибки прогноза) прививной объем препарата «АвиФлуВак» содержал 96 ($93 \div 120$) PD_{50} , а прививной объем контрольного препарата содержал 38 ($28 \div 51$) PD_{50} . 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 раз - рекомендуемую концентрацию ВОЗЖ. Содержание антигена в контрольном препарате соответствовало нижней границе эффективного количества (35 PD_{50}) [468]. Получение высоких концентраций антигена вируса ВГП на эмбрионах кур может быть затруднено, т.к. вирус убивает эмбрионы на ранней стадии развития инфекционного процесса.

Поскольку защита птиц от генерализованной инфекции вируса гриппа в основном обеспечивается выработкой антител против вирусного гемагглютинина [278], 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 - $4 \log_2$ [526] и титры, предотвращающие в том числе локальную репродукцию вируса - $6,5 \log_2$ [293]. При этом необходимо, чтобы титр антител более $4 \log_2$ присутствовал у 80% птицепоголовья [20]. При выполнении наших исследований защита 95% вакцинированных птиц соответствовала ожидаемым титрам выше $6 \log_2$ для вакцины «АвиФлуВак».

При изучении динамики поствакцинальной иммунной реакции у кур против ВГП Н5 после прививки препаратом «АвиФлуВак» протективный эффект оценивался отдельно по показателям заболеваемости и летальности. Время достижения полной поствакцинальной защиты от инфекции высоко вирулентного ГП было на уровне 25 суток после вакцинации [57].

На основании проведенных лабораторных и производственных экспериментов по применению вакцины «АвиФлуВак» на утках, гусях и индейках было установлено, что для крупных и водоплавающих видов домашних птиц рационально применять вакцину «АвиФлуВак» против ГП Н5 в двойной коммерческой дозе и, как минимум, двукратно с последующим контролем напряженности иммунитета и проведением ревакцинаций по показаниям [56]. Наши данные о необходимости применения вакцины для крупных и водоплавающих видов домашних птиц в двойной коммерческой дозе и, как

минимум, двукратном применении согласуются с данными ряда учёных [8; 9; 268; 444; 447].

Вакцина «АвиФлуВак» из штамма «Ямал» была разработана для реализации противоэпизоотических мероприятий в России и странах зарубежья, и предназначена для профилактики гриппа А подтипа Н5 у птиц, содержащихся на птицефабриках, в личных подсобных хозяйствах и зоопарках в зонах высокого риска.

Преимущество новой вакцины заключается в ее высокой иммуногенности, т.е. способности защищать птицу от заражения актуальными высокопатогенными вирусами гриппа А подтипа Н5. От основных конкурентов препарат «АвиФлуВак» отличается высокой безопасностью, связанной с использованием в ее составе антигена, изготовленного на основе низкопатогенного вируса гриппа А подтипа Н5.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по итогам выполненного нами диссертационного исследования, сформулированы и обозначены следующие выводы.

5.1 Выводы

1. В 2019-2024 гг. на территории РФ отмечалась напряженная эпизоотическая ситуация по ньюкаслской болезни и высокопатогенному гриппу птиц, вызванная циркуляцией вирусов НБ субгенотипа VII L и ВГП генетической линии (клады) 2.3.4.4b.

2. Показано низкое протективное действие коммерческих вакцин против болезни Ньюкасла в отношении вируса НБ субгенотипа VII L. Согласно данным серологических исследований и результатов контрольного заражения, установлено, что протективный уровень антител $5 \log_2$ в условиях заражения вакцинированной птицы вирусом НБ субгенотипа VII L являлся недостаточным.

3. По результатам ПЦР установлено присутствие генома высоковирулентного вируса НБ в ротоглоточных и клоакальных пробах в течение 7-10 дней после контрольного заражения вакцинированной против НБ птицы независимо от использованных схем вакцинации и вида вакцин.

4. Доказан более высокий протективный эффект инаktivированных вакцин из вируса НБ субгенотипа VII L по сравнению с препаратами из штамма «Ла-Сота». Показано, что в одной иммунизирующей дозе вакцины из штамма «ВНИИЗЖ G7» содержится $105 PD_{50}$, в то время как у препарата из штамма «Ла-Сота» - $50 PD_{50}$ при заражении вирусом НБ субгенотипа VII L.

5. Определена иммуногенная активность вакцин на основе вируса низкопатогенного гриппа птиц H5: в одной иммунизирующей дозе вакцины из штамма «Ямал» НГП H5N1 содержится 88-96 PD_{50} , что не уступает

отечественным аналогам на основе вируса высокопатогенного гриппа птиц H5N1(38-44 PD₅₀).

6. Выделены, депонированы и используются в изготовлении вакцин производственные штаммы вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ G7» и «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и штамм вируса гриппа птиц H5 «Ямал», обладающие высокой иммуногенной активностью при иммунизации птиц, что подтверждено получением патентов.

7. Разработаны технологии изготовления и методы контроля инаktivированных эмульсионных вакцин против болезни Ньюкасла «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» и против НБ и гриппа птиц H9N2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», содержащих вирус НБ субгенотипа VII L. На основании результатов доклинических и клинических исследований в лабораторных и производственных условиях доказана безопасность и высокая эффективность разработанных препаратов против актуального для РФ вирулентного субгенотипа VII L ВНБ.

8. Разработана технология изготовления и методы контроля живой сухой вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Экспериментально доказано, что при применении препарата в одной прививной дозе 5,5 ЭИД₅₀ вакцина безвредна и по протективному эффекту по отношению к ВНБ субгенотипа VII L не уступает вакцине из штамма «Ла-Сота».

9. Разработана промышленная технология изготовления и методы контроля инаktivированной эмульсионной вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак», апробированная на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ». Установлен высокий протективный эффект вакцины «АвиФлуВак» на основе низкопатогенного вируса подтипа H5 штамма «Ямал» в отношении высокопатогенных возбудителей гриппа H5N1 и H5N8, несмотря на принадлежность к разным генетическим линиям.

5.2 Практические предложения

Разработаны и внедрены в промышленное производство и ветеринарную практику вакцины против болезни Ньюкасла и гриппа птиц.

Получены и депонированы штаммы ньюкаслской болезни и гриппа птиц для производства вакцинных препаратов:

- Справка № 366-деп /21-27 о депонировании штамма «Ямал» подтипа H5N1 вируса гриппа А (производственного) 24.09.2021 г.;
- Справка № 437-деп /22-71 о депонировании штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни (производственного) 08.02.2022 г.;
- Справка о депонировании № 436-деп/22-70 штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни (производственного) от 30.12.2022 г.

Зарегистрированы в установленном порядке и внедрены в ветеринарную практику:

- СТО 00495527-0211-2022 Вакцина против гриппа птиц (H5) инактивированная эмульгированная «АвиФлуВак»;
- СТО 00495527-0211-2023 Вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сухая живая;
- СТО 00495527-0468-2024 Вакцина против ньюкаслской болезни (G7 и Ла-Сота) и гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) ассоциированная инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»;
- СТО 00495527-0483-2024 Вакцина против ньюкаслской болезни инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»;
- «Методические рекомендации по оценке по оценке титра 50-процентных протективных доз (PD₅₀) для инактивированных вакцин против вирусных болезней птиц» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024 г.);
- «Методические рекомендации по планированию и проведению мониторинговых исследований на грипп птиц и ньюкаслскую болезнь в дикой орнитофауне и в популяции домашних птиц населенных пунктов» (ФГБУ «ВНИИЗЖ» 2024 г.);
- «Методические рекомендации по активному и пассивному надзору за вакцинированным против высокопатогенного гриппа птиц поголовьем в условиях промышленных предприятий» (ФГБУ «ВНИИЗЖ» 2025 г.).

Осуществлено промышленное серийное производство инактивированных вакцин против болезни Ньюкасла «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» и «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», вакцины против гриппа птиц H5 «АвиФлуВак» с ежегодным выпуском препаратов не менее 250 миллионов доз и живой вакцины против ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ НБ-Эн» с объемом производства около миллиарда доз в год. Вакцины внедрены в ветеринарную практику и широко применяются в птицеводческих хозяйствах для профилактики болезни Ньюкасла и гриппа птиц.

5.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты, полученные в ходе научно-исследовательской работы активно используются в практике. Разработанные вакцины против гриппа птиц и ньюкаслской болезни широко применяются в схемах специфической профилактики на промышленных птицеводческих предприятиях. За разработку вакцин «АвиФлуВак», «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» и «ВНИИЗЖ НБ-Эн» ФГБУ «ВНИИЗЖ» награждено тремя золотыми медалями на Всероссийской агропромышленной выставке «Золотая осень» в 2022-2025 гг. в номинации «За разработку, производство и внедрение эффективных лекарственных средств и препаратов для ветеринарного применения, высокую эффективность проведения противоэпизоотических мероприятий на территории субъектов Российской Федерации, ликвидацию, лечение заразных и незаразных болезней животных, популяризацию ветеринарной профессии в регионе» (Приложения 17-19)

Эволюция возбудителей вирусов гриппа птиц и ньюкаслской болезни потребует дальнейших исследований по изучению их биологических свойств и оценке эффективности вакцин или разработке новых препаратов, адекватных возникающим угрозам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЭЭИ – аминоксилэтиленимин

ВАЦ – вирус анемии цыплят

ВБМ – вирус болезни Марека

ВНБ – вирус ньюкаслской болезни

ВГП – высокопатогенный грипп птиц

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВОЗЖ – Всемирное Общество Защиты Животных

ВПЧ – вирусподобные частицы

ГАЕ – гемагглютинирующая единица

ГП – грипп птиц

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИББ – инфекционная бурсальная болезнь

ИБК – инфекционный бронхит кур

ИЛТ – инфекционный ларинготрахеит птиц

ИФА – иммуноферментный анализ

ИЭМ – инфекционный энцефаломиелит птиц

КШМ – коллекция штаммов микроорганизмов

КРС – крупный рогатый скот

КЭ – куриный эмбрион

ЛПХ – личное подворное хозяйство

МАТ – материнские антитела

МПВИ – метапневмовирусная инфекция

НБ – ньюкаслская болезнь

НГП – низкопатогенный грипп птиц

ОП – оспа птиц

ОТ-ПЦР – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РГА – реакция гемагглютинации

РЕО – реовирус птиц

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

РФ – Российская Федерация

ФАО – Всемирная продовольственная организация

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ЭБЛРЖ (ВК) – Экспериментальная биологическая лаборатория работы с животными (виварный комплекс)

ЭИД – эмбриональная инфекционная доза

ЭЭЖ – экстраэмбриональная жидкость

С – клинический индекс

ССЯ-76 – синдром снижения яйценоскости-76

НА – гемагглютинин

HVT – герпес вирус индеек

ICPI – индекс интрацеребральной патогенности

ICTV – Международный Комитет по таксономии вирусов

In – индекс заболеваемости

IVPI – индекс интравенозной патогенности

Le – индекс летальности

NA – нейраминидаза

PD₅₀ – 50-процентная проективная доза

Pr – протективный индекс

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авситидийский, Е.А. Ньюкаслская болезнь. Обзор ситуации в РФ. Стратегия профилактики / Е.А. Авситидийский, В.В. Борисов, С.Н. Норкина, Т.Н. Рождественская // Птицеводство. – 2024. – № №9. – С. 63-70. DOI: 10.33845/0033-3239-2024-73-9-63-70.
2. Бахчин, И.В. Патоморфологические изменения у кур при экспериментальном заражении вирусом гриппа птиц А/Н5N1 / И.В. Бахчин, И.А. Чвала, М.А. Волкова и др. // Вестник Ветеринарии. – 2014. – № 1 (68). – С. 47-51.
3. Борисов, А.В. Клинические признаки и патологоанатомические изменения при гриппе птиц / А.В. Борисов, В.Н. Ирза // РацВетИнформ. – 2007. – № 3. – С. 7-8.
4. Борисов, А.В. Конструирование и иммунобиологические свойства экспериментальных вакцин против гриппа птиц : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 16.00.03 / А.В. Борисов. – Москва : Место защиты: Всерос. гос. центр качества и стандартизации лекарств, средств и кормов для животных, 2009. – 24 с.
5. Брит, В.И. Эффективность методов вакцинации против ньюкаслской болезни в промышленном птицеводстве: автореф. дис. канд. вет наук: 06.02.02. / В.И. Брит. – п.Вольгинский, 2015. – 24 с.
6. Бурым, В.Ю. Птичий грипп, его профилактика и эпизоотологическая ситуация в Ставропольском крае в 2023-2024 гг / В.Ю. Бурым. – Ставропольский государственный аграрный университет, 2024. – С. 127-131. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=75074736> (дата обращения: 26.11.2025). – Текст: электронный.
7. Ван дер Ваден Б. Л. Математическая статистика. / Ван дер Ваден Б. Л. – Издательство иностранной литературы. – Москва, 1960. – 434 с.
8. Варкентин, А.В. Поствакцинальный иммунитет к гриппу у разных видов домашних птиц : автореф. дис. канд. вет наук: 06.02.02. / А.В. Варкентин. – Владимир, 2011. – 20 с.
9. Варкентин, А.В. Изучение поствакцинального иммунитета к гриппу у разных видов домашних птиц / А.В. Варкентин, М.А. Циванюк, В.Н. Ирза, А.В. Борисов // Ветеринария. – 2009. – № 6. – С. 25-28.
10. Васильев, Ю.М. Оптимизация размножения вирусов гриппа птиц в различных субстратах и совершенствование инактивированных вакцин против вирусов гриппа птиц : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.02.02 / Ю.М. Васильев. – Москва : Науч.-исслед. ин-т вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, 2010. – 26 с.

11. Васильева, С.В. Изучение влияния различных схем вакцинации цыплят против высокопатогенного гриппа подтипа H5N1 на показатели метаболизма и гуморального иммунитета / С.В. Васильева, Тарлавин Н.В., Веретенников В.В., Хрипункова Д.С. // Ветеринария Кубани. – 2025. – № № 2. – С. 6-9.
12. Васильцова, Н.Н. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка по высокопатогенному гриппу птиц в мире и на территории Российской Федерации в 2024 г. / Н.Н. Васильцова, А.С. Панова, В.Н. Петров и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2025. – № 1. – С. 18-26. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-1-18-26.
13. Виткова, О.Н. Эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц и болезни Ньюкасла в Российской Федерации в 2016-2020 год / О.Н. Виткова, А.К. Караулов, В.Н. Ирза и др. // Эффективное животноводство. – 2021. – № № 4(170). – С. 76-78.
14. Волков, М.С. Эпизоотологические особенности и контроль гриппа птиц на территории Российской Федерации : 2005-2021 гг. : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук : 4.2.3. / М.С. Волков. – Владимир : ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 2022. – 43 с.
15. Волкова, М.А. Серологический мониторинг ньюкаслской болезни в Российской Федерации в 2023–2024 гг. / М.А. Волкова, И.А. Чвала, П.С. Ярославцева и др. // Ветеринария сегодня. – 2025. – Т. 14. – № 4. – С. 391-400. DOI: 10.29326/2304-196X-2025-14-4-391-400.
16. Волкова, М.А. Серологический мониторинг гриппа птиц и ньюкаслской болезни в Российской Федерации в 2019 году / М.А. Волкова, И.А. Чвала, О.С. Осипова и др. // Ветеринария сегодня. – 2020. – № 2. – С. 76-82. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-2-33-76-82.
17. Глущенко, А.В. Биологические свойства вирусов болезни Ньюкасла, выделенных из природных резервуаров среди диких птиц в различных регионах России в 2008-2018 гг. : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 1.5.10. / А.В. Глущенко. – Владимир : «Федеральный центр охраны здоровья животных», 2022. – 22 с.
18. Государственная фармакопея Российской Федерации. ОФС.1.1.0009 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» / Государственная фармакопея Российской Федерации. – XV издание, 2023.
19. Государственная Фармакопея РФ. Издание 14, 2018, Т 1, С. 368, табл. V. – 2018.
20. Джавадов, Э.Д. Особенности вакцинопрофилактики в промышленном птицеводстве / Э.Д. Джавадов, М.Е. Дмитриева // Птица и птицепродукты. – 2011. – № 5:37. – С. 39.

21. Джавадов, Э.Д. Прогрессивные методы вакцинопрофилактики / Э.Д. Джавадов // Животноводство России. – 2020. – № 9. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=43895793> (дата обращения: 12.10.2025). – Текст: электронный.
22. Джавадов, Э.Д. Опыт Китая в борьбе с высокопатогенным гриппом птиц и в его профилактике / Э.Д. Джавадов, Н.В. Тарлавин, В.В. Веретенников и др. // Птица И Птицепродукты. – 2025. – № 1. – С. 50-53. DOI: 10.30975/2073-4999-2025-27-1-50-53.
23. Джавадов, Э.Д. Болезнь Ньюкасла: патогенез, диагностика и профилактика / Э.Д. Джавадов, Д.Н. Хлып, И.М. Сажаев, С.В. Степанова // Био. – 2021. – Болезнь Ньюкасла. – № 5 (248). – С. 22-30.
24. Енгашев, С.В. Эффективность схем иммунизации молодняка птиц живыми и инактивированными вакцинами против НБ / С.В. Енгашев, А.А. Гусев, В.А. Бабак // Ветеринария. – 2021. – Т. 24. – № 12. – С. 21-24. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.12.21-24.
25. Жильцова, М.В. Расширение спектра восприимчивых видов млекопитающих в ходе развития эпизоотической ситуации в мире по гриппу птиц за 2023–2024 гг. / М.В. Жильцова, Т.П. Акимова, М.Н. Митрофанова и др. // Ветеринария сегодня. – 2025. – Т. 14. – № 1. – С. 6-13. DOI: 10.29326/2304-196X-2025-14-1-6-13.
26. Забережный, А.Д. Получение нового штамма-реассортанта вируса гриппа А/Н5N1 методом обратной генетики и анализ его биологических свойств / А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова Т. В., Г.К. Воркунова и др. // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. №6. – С. 23-27.
27. Закс, Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. – М.: Статистика. – 1976. – 598 с.
28. Захарова, О.И. Высокопатогенный грипп птиц в мире: стратегии вакцинации (обзор) / О.И. Захарова, О.А. Бурова, Н.Н. Торопова и др. // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2022. – Т. 23. – № 3. – С. 295-306. DOI: 10.30766/2072-9081.2022.23.3.295-306.
29. Зиняков, Н.Г. Изучение патогенного потенциала и возможности межвидового перехода вирусов гриппа птиц подтипа Н5, выявленных на территории России в 2018-2022 годах / Н.Г. Зиняков, А.Д. Грехнева, А.В. Андриясов и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2025. – Т. 102. – № 3. – С. 350-361. DOI: 10.36233/0372-9311-646.
30. Зуев, Ю.В. Оценка протективной эффективности вакцин против ньюкаслской болезни, применяемых в различных иммунизирующих дозах / Ю.В. Зуев, В.И. Смоленский, В.Н. Сазонкин, и др. // Мат. IVС. – 2016.

31. Зыбина, Т.Н. Иммунологические свойства лентогенного штамма «ВНИИЗЖ НБ-ЭН» вируса ньюкаслской болезни / Т.Н. Зыбина, А.А. Пяткина, Н.В. Мороз и др. // Ветеринария. – 2024. – № 4. – С. 39-44. DOI: 10.30896/0042-4846.2024.27.4.39-44.
32. Инструкция о мероприятиях по борьбе с ньюкаслской болезнью (псевдочумой) птиц (утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 9 июня 1976 г. с изменениями и дополнениями от 28 августа 1978 г. взамен инструкции от 21 июля 1965 г.). – 1976.
33. Инструкция по ветеринарному применению «АВИВАК-ГП-Н5N1R» Вакцина против гриппа птиц типа А подтипа Н5 инактивированная эмульсионная (организация-разработчик - ООО «НЛП «АВИВАК», 188502, Ленинградская обл., Ломоносовский район, д. Горбунки, промзона Орлинская зона, дом 21, лит. А) Номер регистрационного удостоверения 29-1-22.24-5205№ПВР-1-22.24/04001.
34. Инструкция по ветеринарному применению вакцины против гриппа птиц инактивированной эмульгированной ФЛУ ПРОТЕКТ Н5 (Организация-разработчик: ФКП «Ставропольская биофабрика», Российская Федерация, 355019, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Биологическая, д. 18). Номер регистрационного удостоверения: 05-1-11,12-2597№ПВР-1-3.5/01518. – 2024.
35. Ирза, В.Н. Иммуногенные и протективные свойства экспериментальных инактивированных вакцин против гриппа птиц подтипов Н5 и Н7 / В.Н. Ирза, А.В. Варкентин, М.С. Волков и др. // Ветеринария. – 2013. – № 1. – С. 24-26.
36. Ирза, В.Н. О текущей панзоотии высокопатогенного гриппа птиц / В.Н. Ирза, М.С. Волков, А.В. Варкентин // Эффективное Животноводство. – 2022. – № 5 (180). – С. 85-86.
37. Ирза, В.Н. Протективные свойства отечественных серийных и экспериментальных вакцин в отношении вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипов Н5N1 и Н5N8, изолированных в 2015-2016 гг. / В.Н. Ирза, М.С. Волков, А.В. Варкентин и др. // Птица и птицепродукты. – 2017. – № №6. – С. 12-15.
38. Каверин, Н.В. Ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae) / Н.В. Каверин, Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов // Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – Москва : Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. – С. 307-313.
39. Ковальская, Л.А. Защитная среда для вирусвакцины против ньюкаслской болезни птиц (штамм Ла-Сота) // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. / Л.А. Ковальская. – Москва, 1986. – 16 с.
40. Ковальский, И.В. Применение статистических методов в биотехнологических исследованиях часть 3. Алгоритм определения иммуногенности вирусвакцины против ньюкаслской болезни / И.В. Ковальский,

Т.А. Скотникова, Ю.Д. Фролов и др. // Вестник Технологического университета. – 2017. – Т. 20. – № 19. – С. 125-130.

41. Компанцев, Д.В. Технологический поиск адъювантной композиции для вакцины против птичьего гриппа / Д.В. Компанцев, В.А. Чахирова, А.А. Чахирова // Вопросы Обеспечения Качества Лекарственных Средств. – 2025. – № 1 (47). – С. 50-53. DOI: 10.34907/JRQAI.2025.19.57.007.

42. Кондакова, О.А. Разработка вакцины против птичьего гриппа на основе структурно модифицированных вирусов растений / О.А. Кондакова, Е.А. Трифонова, М.В. Архипенко и др. // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 4. – С. 731-738. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.4.731rus.

43. Костина, Л.В. Вакцины против гриппа птиц в птицеводстве / Л.В. Костина, А.Д. Забережный, Т.В. Гребенникова и др. // Вопросы вирусологии. – 2017. – № №2. – С. 53-60.

44. Креймер, Ю.Х. Изыскание и разработка вирусвакцины для специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук / Ю.Х. Креймер. – Москва, 1986. – 45 с.

45. Кудря, К.С. Характеристика антигенно актуального кандидатного вакцинного штамма вируса гриппа А (H5N1) / К.С. Кудря, М.В. Сергеева, Д.А. Шамакова и др. – Политех-Пресс, 2025. – С. 42. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=82223091> (дата обращения: 26.11.2025). – Текст: электронный.

46. Кулагина, М.А. Серологический мониторинг гриппа птиц и ньюкаслской болезни на территории Российской Федерации в 2020 г / М.А. Кулагина, М.А. Волкова, И.А. Чвала и др. // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11. – № 2. – С. 142-148. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-142-148.

47. Кулаков, В.Ю. Методические рекомендации по анализу параметров в системах «доза – эффект» с альтернативным способом оценивания / В.Ю. Кулаков, С.Н. Колосов, А.В. Константинов и др. // ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир: 2016. – 31 с.

48. Ларионова, Н.В. Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте / Н.В. Ларионова. – Санкт-Петербург : Институт Экспериментальной Медицины, 2017. – 336 с.

49. Литвинова, В.Р. Иммуногенные свойства экспериментальной ДНК-вакцины, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа подтипа А/Н5N8 / В.Р. Литвинова, А.П. Рудометов, Д.Н. Кисаков и др. // Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 2023. – С. 179-180. – URL:

<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=67362063> (дата обращения: 26.11.2025). – Текст: электронный.

50. Манин, Т.Б. Концепция ранней защиты против ньюкаслской болезни / Т.Б. Манин // Наше сельское хозяйство. – 2021. – Т. 24(272). – С. 54-57.

51. Марченко, В.Ю. Мониторинг вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации / В.Ю. Марченко, Н.П. Колосова, А.С. Гудымо и др. // Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. – С. 427. –URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=50097701> (дата обращения: 26.11.2025). – Текст: электронный.

52. Марченко, В.Ю. Мониторинг высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории Российской Федерации: дис. ... доктора биологических наук / В.Ю. Марченко. – Кольцово : ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 275 с.

53. Марченко, В.Ю. В новый век — с новым птичьим гриппом / В.Ю. Марченко, А.С. Панова // Наука из первых рук. – 2024. – № №2(100). – С. 60-67.

54. Марченко, В.Ю. Обзор ситуации с высокопатогенным вирусом птичьего гриппа H5 в России в 2016–2017 годах / В.Ю. Марченко, И.М. Суслопаров, В.Е. Игнатьев и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 30-35. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-30-35.

55. Мороз, Н.В. Иммунологические свойства инаktivированных вакцин против ньюкаслской болезни на основе антигенов вируса VII и II генотипа. / Н.В. Мороз, Д.Л. Долгов, И.А. Комаров и др. // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 1. – С. 41-47. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.41.

56. Мороз, Н.В. Применение вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» для индеек, гусей и уток / Н.В. Мороз, С.В. Фролов, В.Н. Ирза и др. // Ветеринария Сегодня. – 2024. – Т. 13. – № 3. – С. 248-254. DOI: 10.29326/2304-196X-2024-13-3-248-254.

57. Мороз, Н.В. Развитие поствакцинальной иммунной реакции у цыплят против высокопатогенного вируса гриппа птиц типа А подтипа H5N1 / Н.В. Мороз, С.В. Фролов, В.Ю. Кулаков, А.В. Константинов // Эффективное Животноводство. – 2023. – № 5 (187). – С. 58-61. DOI: 10.24412/cl-33489-2023-5-58-61.

58. Нечипуренко, А.А. Новый взгляд на болезнь Ньюкасла / А.А. Нечипуренко, О.А. Иващенко // Био. – 2020. – № 7 (238). – С. 18-21.

59. Орехов, С.Н. Биологические угрозы и биологическая безопасность / С.Н. Орехов, А.Н. Яворский // Вестник Университета имени О.Е. Кутафина (МГЮА). – 2020. – № 5. – С. 60-73. DOI: 10.17803/2311-5998.2020.69.5.060-073.
60. Петухова, Н.В. Вирусоподобные частицы - новая стратегия для создания противогриппозных вакцин / Н.В. Петухова, П.А. Иванов, А.И. Мигунов // Вопросы вирусологии. – Т. 58. – № № 2. – С. 10-14.
61. Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 24 марта 2021 г. № 158 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов высокопатогенного гриппа птиц». – URL: <https://docs.cntd.ru/document/603446871>. – Текст: электронный.
62. Проект Приказа Минсельхоза России «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов болезни Ньюкасла», 2018. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/56651206/>. – Текст: электронный.
63. Пчелкина, И.П. Характеристика изолятов вируса ньюкаслской болезни, выделенных в Калининградской области в 2013 г. / И.П. Пчелкина, С.Н. Колосов, П.И. Репин и др. // Труды Федерального Центра Охраны Здоровья Животных. – 2014. – Т. 12. – С. 77-85.
64. Пяткина, А.А. Новая вакцина «ВНИИЗЖ НБ-ЭН» против болезни Ньюкасла на практике / А.А. Пяткина, Т.Н. Зыбина, Н.В. Мороз, С.А. Мусатов // Эффективное Животноводство. – 2024. – № 3 (193). – С. 85-87. DOI: 10.24412/c1-33489-2024-3-85-87.
65. РСХН. Эпизоотическая ситуация по болезни Ньюкасла на территории Российской Федерации в 2023 году / РСХН. – URL: <https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaja-situacija/rossija/informacija-po-bolezni-njukasla-v-rossijskoj-federacii/hronologija-po-bolezni-njukasla/>. – Текст: электронный.
66. Руденко, Т.В. Вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ГАМ-61» // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Т.В. Руденко. – Москва, 2000. – 25 с.
67. Рябцева, В.А. Обзор эпизоотологической ситуации по высокопатогенному гриппу птиц в России / В.А. Рябцева, Т.И. Лоренгель (Лементовская) // Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, 2024. – С. 157-161. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=67998933> (дата обращения: 25.11.2025). – Текст: электронный.

68. Сарбасов, А.Б. Протективные свойства вакцины из штамма «Ла-Сота» при заражении цыплят вирулентным штаммом VII генотипа вируса ньюкаслской болезни / А.Б. Сарбасов, В.Н. Ирза, П.И. Репин и др. // Ветеринария. – 2015. – № 2. – С. 28-31.
69. Скотникова, Т.А. Совершенствование технологии производства и способов применения вакцин против ньюкаслской болезни: диссертация ... доктора биологических наук : 03.01.06 / Т.А. Скотникова. – Щёлково : Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти РАСХН, 2010. – 342 с.
70. Смирнов, В.Н. Вакцины против гриппа птиц / В.Н. Смирнов, Е.В. Чуфарова, М.М. Зубаиров, А.Т. Кушнир // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных. – Покров, 2008. – Т. 1. – С. 193-197.
71. Смоленский, В.И. Актуальные проблемы профилактики ньюкаслской болезни / В.И. Смоленский // Птица и птицепродукты. – 2017. – № № 6. – С. 19-21.
72. Смоленский, В.И. Средства и методы специфической профилактики болезней птиц вирусной этиологии: автореферат дис. ... доктора биологических наук : 16.00.03 / В.И. Смоленский. – Москва, 1999. – 44 с.
73. Старов, С.К. Современные принципы профилактики ньюкаслской болезни птиц / С.К. Старов // Материалы Междунар. научно-практ. конф., поев. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: – Владимир, 2003. – С. 284-289.
74. Стасенкова, Ю.В. Программа вакцинации в борьбе с различными вариантами генотипов вируса болезни Ньюкасла / Ю.В. Стасенкова, А.В. Плешаков // Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И.И. Иванова, 2021. – С. 266-270. – URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=48316358> (дата обращения: 23.11.2025). – Текст: электронный.
75. Тарлавин, Н.В. Оценка безопасности и безвредности рекомбинантного кандидатного штамма для профилактики высокопатогенного гриппа птиц H5N1. / Н.В. Тарлавин, В.В. Веретенников, Э.Д. Джавадов и др. // Международный вестник ветеринарии. – 2025. – № 2. – С. 46-53. DOI: 10.52419/issn2072-2419.2025.2.46.
76. Тарлавин Н.В. Изучение антигенной активности рекомбинантной реассортантной вакцины против высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1 / Тарлавин Н.В., Э.Д. Джавадов, В.В. Веретенников и др. // Птица и птицепродукты. – 2025. – Т. 27. – № 2. – С. 53-57. DOI: 10.30975/2073-4999-2025-27-2-53-57.
77. Токарик (Павленко), Э.Ф. Вакцина против болезни Ньюкасла птиц и способ ее применения / Э.Ф. Токарик (Павленко), Т.А. Скотникова, Л.А. Неминущая (Ковальская) и др. – 1995. – URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38007050> (дата обращения: 18.10.2025). – Текст: электронный.

78. Трещалина, А.А. Молекулярная идентификация вируса ньюкаслской болезни, выделенного в домашнем птицеводстве Подмоскovie летом 2022 года / А.А. Трещалина, А.А. Ртищев, Е.Ю. Шустова и др. // Ветеринария сегодня. – 2023. – Т. 12. – № 2. – С. 147-153. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-147-153.
79. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. – Медицина. – Москва, 1975. – 297 с.
80. Фёрстер, Э. Методы корреляционного и регрессионного анализа / Э. Фёрстер, Б. Рёнци. – Финансы и статистика. – Москва, 1983. – 304 с.
81. Фисинин, В.И. Динамика и перспективы развития мирового и отечественного птицеводства. Результаты работы яичного и мясного птицеводства России в 2024 году / В.И. Фисинин // Птицеводство. – 2025. – № № 3. – С. 4-10.
82. Фролов, А.В. Сезонность высокопатогенного гриппа птиц в России в период 2005-2023 гг. / А.В. Фролов, Т.Н. Рождественская // Ветеринарный врач. – 2025. – № 5. – С. 95-102.
83. Фролов, С.В. Эффективность вакцин против ньюкаслской болезни производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» в отношении актуальных вирусов VII генотипа / С.В. Фролов, Н.В. Мороз, И.А. Чвала, В.Н. Ирза // Ветеринария сегодня. – 2021. – Т. 1. – № 1. – С. 44-51. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-44-51.
84. Хлып, Д.Н. Болезнь Ньюкасла / Д.Н. Хлып // Био. – 2021. – № 1 (244). – С. 5-21.
85. Холлендер, М. Непараметрические методы статистики / М. Холлендер, Д. Вулф. – Финансы и статистика. – Москва, 1983. – 518 с.
86. Чвала, И.А. Особенности инфекции гриппа А у молодняка водоплавающих птиц, вызванной A/Chicken/Primorsky/85/08 H5N1 / И.А. Чвала, Л.Ю. Абрамова, Ю.Ю. Бабин и др. // Ветеринария. – 2010. – № 12. – С. 28-30.
87. Чвала, И.А. Биологические свойства изолятов вируса гриппа А птиц, выделенных в Российской Федерации в 2005-2007 гг.: дис. ... канд. вет. наук:06.02.02 / И.А. Чвала. – Владимир, 2008. – 174 с.
88. Чвала, И.А. Особенности течения гриппа А у уток-крякв, вызванного A/chicken/Primorsky/85/08 H5N1 / И.А. Чвала, Л.О. Щербакова, М.И. Шульпин и др. // Ветеринария. – 2009. – № 10. – С. 25-26.
89. Шагурина, Е.В. Генетический анализ изолятов вируса ньюкаслской болезни, выявленных в Республике Крым в 2016-2017 гг. / Е.В. Шагурина, С.Н. Колосов, А.В. Андриясов, И.А. Чвала // Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук, 2017. – С. 48-50. – URL:

<https://www.elibrary.ru/item.asp?id=30644936> (дата обращения: 23.11.2025). – Текст: электронный.

90. Шарабрин, С.В. мРНК-вакцина, кодирующая гемагглютинин вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, доставленная с помощью безыгольной струйной инъекции, защищает мышей от летального заражения вирусом / С.В. Шарабрин, А.А. Ильичев, Д.Н. Кисаков и др. // Молекулярная биология. – 2025. – Т. 59. – № 3. – С. 376-389. DOI: 10.1134/S0026893325700062.

91. Щелканов, М.Ю. Клинические признаки заболевания у птиц, вызванного высокопатогенными вариантами вируса H5N1 в эпицентре эпизоотии на юге Западной сибире (июль 2005 г.) / М.Ю. Щелканов, Н.А. Власов, Д.Е. Киреев и др. // Журнал инфекционной патологии. – 2005. – № 3-4. – С. 121-124.

92. Paniago, M. Оценка защиты, вызванной Вектормун® ND, против различных генотипов вируса болезни Ньюкасла / M. Paniago, C. Cazaban, F. Lozano, Gonzalez G. // Ценовик. – 2017. – URL: <https://www.tsenovik.ru/articles/veterinariya/otsenka-zashchity-vyzvannoy-vektormun-nd-protiv-razlichnykh-genotipov-virusa-bolezni-nyukasla-evalua/>. – Текст: электронный.

93. Abd El-Hamid, H.S. Sequence analysis and pathogenicity of Avian Orthoavulavirus 1 strains isolated from poultry flocks during 2015–2019 / H.S. Abd El-Hamid, M.E. Shafi, N.M. Albaqami et al. // BMC Veterinary Research. – 2020. – Vol. 16. – № 1. – P. 253. DOI: 10.1186/s12917-020-02470-9.

94. Abdallah Mouhamed, A. Comparative protective efficacy of a newly generated live recombinant thermostable highly attenuated vaccine rK148/GVII-F using a single regimen against lethal NDV GVII.1.1 / A. Abdallah Mouhamed, J. Lee, D.-H. Kim, C.-S. Song // Avian Pathology. – 2024. – Vol. 53. – № 1. – P. 14-32. DOI: 10.1080/03079457.2023.2263395.

95. Abdisa, T. Review on Newcastle Disease of Poultry and its Public Health Importance / T. Abdisa, T. Tagesu. // Journal of Veterinary Science & Technology. – 2017. – Vol. 08. – № 03. – URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/review-on-newcastle-disease-of-poultry-and-its-public-health-importance-2157-7579-1000441.php?aid=89486> (date of access: 08.10.2025). – Текст: электронный.

96. Abolnik, C. History of Newcastle disease in South Africa / C. Abolnik // Onderstepoort Journal of Veterinary Research. – 2017. – Vol. 84. – № 1. – URL: <https://ojvr.org/index.php/ojvr/article/view/1306> (date of access: 23.11.2025). – Текст: электронный.

97. Abozaid, K.G.A. Epidemiological surveillance of Newcastle disease virus in Egypt — a 6-year cohort study / K.G.A. Abozaid, A.S. Abdel-Moneim // Tropical Animal Health and Production. – 2022. – Vol. 54. – № 4. – P. 243. DOI: 10.1007/s11250-022-03234-3.

98. Absalón, A.E. Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions: Latin America / A.E. Absalón, D.V. Cortés-Espinosa, E. Lucio et al. // *Tropical Animal Health and Production*. – 2019. – Vol. 51. – Epidemiology, control, and prevention of Newcastle disease in endemic regions. – № 5. – P. 1033-1048. DOI: 10.1007/s11250-019-01843-z.
99. Adam, F.E.A. Simultaneous Expression of Chicken Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor and the Hemagglutinin-Neuraminidase Epitope of the Virulent Newcastle Disease Virus Genotype VII C22 Strain in a Functional Synthetic Recombinant Adenovirus as a Genotype-Matched Vaccine with Potential Antiviral Activity / F.E.A. Adam, X. Zhao, Z. Guan et al. // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11. – № 3. – P. e04024-22. DOI: 10.1128/spectrum.04024-22.
100. Aila, F. Biosecurity and poultry agribusinesses: a conceptual overview / F. Aila, B. Ombok, E. Owaga, Dr.H. Mumbo // *EPH - International Journal of Business & Management Science*. – 2017. – Vol. 3. – № 3. – P. 18-21. DOI: 10.53555/eijbms.v3i3.33.
101. Akmyrzayev, N. Phylogenetic Analysis of a Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Domestic Poultry and Its Potential for Vaccine Development in the Republic of Kazakhstan / N. Akmyrzayev, S. Ryskeldinova, A. Mailybayeva et al. // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13. – № 5. – P. 440. DOI: 10.3390/vaccines13050440.
102. Alasiri, A. Vaccination and Antiviral Treatment against Avian Influenza H5Nx Viruses: A Harbinger of Virus Control or Evolution / A. Alasiri, R. Soltane, A. Hegazy et al. // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – Vaccination and Antiviral Treatment against Avian Influenza H5Nx Viruses. – № 11. – P. 1628. DOI: 10.3390/vaccines11111628.
103. Aldous, E.W. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene / E.W. Aldous, J.K. Mynn, J. Banks, D.J. Alexander // *Avian Pathology*. – 2003. – Vol. 32. – № 3. – P. 239-257. DOI: 10.1080/030794503100009783.
104. Alemneh, T. Epidemiology, Diagnosis & Prevention of Newcastle Disease in Poultry / T. Alemneh // *American Journal of Biomedical Science & Research*. – 2019. – Vol. 3. – № 1. – P. 50-59. DOI: 10.34297/AJBSR.2019.03.000632.
105. Alexander, D.J. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research / D.J. Alexander, E.W. Aldous, C.M. Fuller // *Avian Pathology*. – 2012. – Vol. 41. – The long view. – № 4. – P. 329-335. DOI: 10.1080/03079457.2012.697991.
106. Alexander, D.J. A technology review: Newcastle disease, with special emphasis on its effect on village chickens : FAO animal production and health paper. A technology review / D.J. Alexander, J.G. Bell, R.G. Alders. – Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. – No. 161. – 63 p.

107. Alexander, D.J. History of highly pathogenic avian influenza / D.J. Alexander, I.H. Brown // *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. – 2009. – Vol. 28. – History of highly pathogenic avian influenza. – № 1. – P. 19-38. DOI: 10.20506/rst.28.1.1856.
108. Alexander, D.J. Newcastle disease / D.J. Alexander // *British Poultry Science*. – 2001. – Vol. 42. – № 1. – P. 5-22. DOI: 10.1080/713655022.
109. Alexander, D.J. Newcastle disease and other avian paramyxovirus / D.J. Alexander // *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. – 2000. – Vol. 19. – Newcastle disease and other avian paramyxovirus. – № 2. – P. 443-462. DOI: 10.20506/rst.19.2.1231.
110. Alian Samakkhah, S. Effectiveness of different Newcastle disease vaccination programs in Iranian broiler farms: a case-control study / S. Alian Samakkhah, A. Bahonar, S.A. Ghafouri et al. // *Journal of Poultry Sciences and Avian Diseases*. – 2023. – Vol. 1. – № 4. – P. 3-12. DOI: 10.61838/kman.jpsad.1.4.2.
111. Aljumaili, O.A. Protective efficacy of inactivated Newcastle disease virus vaccines prepared in two different oil-based adjuvants / O.A. Aljumaili, M.B. Bello, S.K. Yeap et al. // *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. – 2020. – Vol. 87. – № 1. – URL: <https://ojvr.org/index.php/ojvr/article/view/1865> (date of access: 23.11.2025). – Текст: электронный.
112. Allan, W.H. Newcastle disease vaccines: their production and use : FAO animal production and health series. Newcastle disease vaccines / W.H. Allan, J.E. Lancaster, B. Toth. – Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1978. – No. 10. – 163 p.
113. Alvarez, J. Risk posed by the HPAI virus H5N1, Eurasian lineage goose/Guangdong clade 2.3.4.4b. genotype B3.13, currently circulating in the US / J. Alvarez, A. Bortolami, M. Ducatez et al. // *EFSA Journal*. – 2025. – Vol. 23. – № 7. – URL: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2025.9508> (date of access: 25.11.2025). – Текст: электронный.
114. Amer, S.A.-M.A. Enhanced Protection and Blocked Viral Shedding for Broiler Chickens in Challenge with Newcastle Disease Virus Genotype VII by Generation of Oil Inactivated Vaccine Antigenically-Matched to The Endemic Virus in Egypt / S.A.-M.A. Amer, A.M. Ghetas, A.M. Maatouq et al. – // *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. – 2023. – Vol. 11. – № 9. – URL: <http://researcherslinks.com/current-issues/Enhanced-and-Blocked-Viral-Shedding-for-Broiler-Chickens/33/1/6505/html> (date of access: 11.10.2025). – Текст: электронный.
115. Amer, S.A.-M.A. Advancement in Vaccination of Broiler Chickens with Genotype-Matched Vaccines to Currently Epidemic Newcastle Disease Virus Genotype VII in Egypt. / S.A.-M.A. Amer, Mohamed Ahmed, A.M. Kandeil et al. // *Journal of World's Poultry Research*. – 2019. – Vol. 9. – № 3. – P. 117-123. DOI: 10.36380/jwpr.2019.14.

116. Amoia, C.F. Development of a genotype-matched Newcastle disease DNA vaccine candidate adjuvanted with IL-28b for the control of targeted velogenic strains of Newcastle disease virus in Africa / C.F. Amoia, A.A. Chengula, J.N. Hakizimana et al. // *Veterinary Research Communications*. – 2025. – Vol. 49. – № 1. – P. 33. DOI: 10.1007/s11259-024-10590-y.
117. Amoia, C.F. Genomic Diversity and Geographic Distribution of Newcastle Disease Virus Genotypes in Africa: Implications for Diagnosis, Vaccination, and Regional Collaboration / C.F. Amoia, J.N. Hakizimana, A.A. Chengula et al. // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 5. – P. 795. DOI: 10.3390/v16050795.
118. APHIS Confirms D1.1 Genotype in Dairy Cattle in Nevada. – 2025. – URL. <https://www.aphis.usda.gov/news/program-update/aphis-confirms-d11-genotype-dairy-cattle-nevada-0>. – Текст: электронный.
119. Archetti, I. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum / I. Archetti, F.L. Horsfall // *Journal of Experimental Medicine*. – 1950. – Vol. 92. – № 5. – P. 441-462. DOI: 10.1084/jem.92.5.441.
120. Arruda, B. Divergent Pathogenesis and Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) in Swine / B. Arruda, A.L.V. Baker, A. Buckley et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 30. – № 4. – URL: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/30/4/23-1141_article (date of access: 08.10.2025). – Текст: электронный.
121. Ashraf, A. Newcastle Disease: Present status and future challenges for developing countries / A. Ashraf, M.S. Shah, // *African Journal of Microbiology Research*. – 2014. – Vol. 8. – № 5. – P. 411-416. DOI: 10.5897/AJMR2013.6540.
122. Avellaneda, G. A Heterologous Neuraminidase Subtype Strategy for the Differentiation of Infected and Vaccinated Animals (DIVA) for Avian Influenza Virus Using an Alternative Neuraminidase Inhibition Test / G. Avellaneda, M.J. Sylte, C.-W. Lee, D.L. Suarez // *Avian Diseases*. – 2010. – Vol. 54. – № s1. – P. 272-277. DOI: 10.1637/8677-030409-Reg.1.
123. Avian Influenza and Newcastle Disease / I. Capua, D.J. Alexander eds. – Milano : Springer Milan, 2009. – URL: <http://link.springer.com/10.1007/978-88-470-0826-7> (date of access: 03.11.2025). – Текст: электронный.
124. Azab, A.A. Evaluation of inactivated avian influenza virus and Newcastle disease virus bivalent vaccination program against newly circulated H5N8 and NDV strains / A.A. Azab, N. Yehia, M. Makhareta et al. // *Poultry Science*. – 2023. – Vol. 102. – № 10. – P. 102952. DOI: 10.1016/j.psj.2023.102952.
125. Banoun, H. Vaccination des canards contre la grippe aviaire en France / H. Banoun. 2025. –

URL: https://www.researchgate.net/publication/387723652_Vaccination_des_canards_contre_la_grippe_aviaire_en_France. – Текст: электронный.

126. Bartlett, M.L. Enhancing the response to avian influenza in the US and globally / M.L. Bartlett, P. Palese, M.F. Davis et al. // *The Lancet Regional Health - Americas*. – 2025. – Vol. 46. – P. 101100. DOI: 10.1016/j.lana.2025.101100.

127. Bauer, L. The neuropathogenesis of highly pathogenic avian influenza H5Nx viruses in mammalian species including humans / L. Bauer, F.F.W. Benavides, E.J.B. Veldhuis Kroeze et al. // *Trends in Neurosciences*. – 2023. – Vol. 46. – № 11. – P. 953-970. DOI: 10.1016/j.tins.2023.08.002.

128. Beard, C.W. Effect of route of administration on the efficacy of a recombinant fowlpox virus against H5N2 avian influenza / C.W. Beard, W.M. Schnitzlein, D.N. Tripathy // *Avian Diseases*. – 1992. – Vol. 36. – № 4. – P. 1052-1055.

129. Bellido-Martín, B. Evolution, spread and impact of highly pathogenic H5 avian influenza A viruses / B. Bellido-Martín, W.F. Rijnink, M. Iervolino et al. // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2025. DOI: 10.1038/s41579-025-01189-4.

130. Bello, M.B. Diagnostic and Vaccination Approaches for Newcastle Disease Virus in Poultry: The Current and Emerging Perspectives / M.B. Bello, K. Yusoff, A. Ideris et al. // *BioMed Research International*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-18. DOI: 10.1155/2018/7278459.

131. Bello, M.B. Genotype Diversity of Newcastle Disease Virus in Nigeria: Disease Control Challenges and Future Outlook / M.B. Bello, K.M. Yusoff, A. Ideris et al. // *Advances in Virology*. – 2018. – Vol. 2018. – Genotype Diversity of Newcastle Disease Virus in Nigeria. – P. 1-17. DOI: 10.1155/2018/6097291.

132. Bensink, Z. Newcastle disease virus strain I2 – a prospective thermostable vaccine for use in developing countries / Z. Bensink, P. Spradbrow // *Veterinary Microbiology*. – 1999. – Vol. 68. – № 1-2. – P. 131-139. DOI: 10.1016/S0378-1135(99)00069-3.

133. Bertran, K. Protection of White Leghorn chickens by U.S. emergency H5 vaccination against clade 2.3.4.4 H5N2 high pathogenicity avian influenza virus / K. Bertran, C. Balzli, D.-H. Lee et al. // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 46. – P. 6336-6344. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.051.

134. Bertran, K. Efficacy of recombinant Marek's disease virus vectored vaccines with computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) hemagglutinin insert against genetically diverse H5 high pathogenicity avian influenza viruses / K. Bertran, A. Kassa, M.F. Criado et al. // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39. – № 14. – P. 1933-1942. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.02.075.

135. Bertran, K. Lack of chicken adaptation of newly emergent Eurasian H5N8 and reassortant H5N2 high pathogenicity avian influenza viruses in the U.S. is consistent with

restricted poultry outbreaks in the Pacific flyway during 2014–2015 / K. Bertran, D.E. Swayne, M.J. Pantin-Jackwood et al. // *Virology*. – 2016. – Vol. 494. – P. 190-197. DOI: 10.1016/j.virol.2016.04.019.

136. Bhavesh. Highly pathogenic avian influenza H5N1 viral infection in cattle: an emerging threat to global dairying? / Bhavesh, Sakshi, P. Kaur et al. // *Bulletin of the National Research Centre*. – 2025. – Vol. 49. – Highly pathogenic avian influenza H5N1 viral infection in cattle. – № 1. – P. 69. DOI: 10.1186/s42269-025-01363-x.

137. Bordes, L. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus Infections in Wild Red Foxes (*Vulpes vulpes*) Show Neurotropism and Adaptive Virus Mutations / L. Bordes, S. Vreman, R. Heutink et al. // *Microbiology Spectrum*. – 2023. – Vol. 11. – № 1. – P. e02867-22. DOI: 10.1128/spectrum.02867-22.

138. Bouma, A. Estimation of Transmission Parameters of H5N1 Avian Influenza Virus in Chickens / A. Bouma, I. Claassen, K. Natih et al. // *PLoS Pathogens*. – 2009. – Vol. 5. – № 1. – P. e1000281. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000281.

139. Boursnell, M.E.G. Insertion of the fusion gene from Newcastle disease virus into a non-essential region in the terminal repeats of fowlpox virus and demonstration of protective immunity induced by the recombinant / M.E.G. Boursnell, P.F. Green, J.I.A. Campbell et al. // *Journal of General Virology*. – 1990. – Vol. 71. – № 3. – P. 621-628. DOI: 10.1099/0022-1317-71-3-621.

140. Branda, F. Emerging threats: Is highly pathogenic avian influenza A(H5N1) in dairy herds a prelude to a new pandemic? / F. Branda, C. Romano, M. Giovanetti et al. // *Travel Medicine and Infectious Disease*. – 2024. – Vol. 59. – Emerging threats. – P. 102721. DOI: 10.1016/j.tmaid.2024.102721.

141. Brice, D.C. Immunogenicity and efficacy of commercial poultry avian influenza vaccines against HPAI A(H5N1) clade 2.3.4.4b viruses in Mexico / D.C. Brice, K. Andreev, L. Miller et al. // *Virology*. – 2026. – Vol. 615. – P. 110765. DOI: 10.1016/j.virol.2025.110765.

142. Brooks, R. AABP decides to reference cattle disease as Bovine influenza A virus (BIAV). / R. Brooks // *Bovine Veterinarian*. – 2024. – URL: <https://www.bovinevetonline.com/news/industry/aabp-decides-reference-cattle-disease-bovine-influenza-virus-biav>. – Текст: электронный.

143. Brown, C. Pathogenesis of Newcastle Disease in Chickens Experimentally Infected with Viruses of Different Virulence / C. Brown, D.J. King, B.S. Seal // *Veterinary Pathology*. – 1999. – Vol. 36. – № 2. – P. 125-132. DOI: 10.1354/vp.36-2-125.

144. Brown, I. Technical Item II High Pathogenicity Avian Influenza and Vaccination: Application in Europe Region. / I. Brown // WOA. – 2022. – URL: https://rr-europe.woah.org/app/uploads/2022/09/technical-item-ii_high-pathogenicity-avian-influenza-and-vaccination.pdf. – Текст: электронный.

145. Brugh, M. Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines / M. Brugh, C.W. Beard, H.D. Stone // *American Journal of Veterinary Research*. – 1979. – Vol. 40. – № 2. – P. 165-169.
146. Bu, Y. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) La Sota expressing the haemagglutinin–neuraminidase protein of genotype VII NDV shows improved protection efficacy against NDV challenge / Y. Bu, H. Yang, J. Jin et al. // *Avian Pathology*. – 2019. – Vol. 48. – № 2. – P. 91-97. DOI: 10.1080/03079457.2018.1548754.
147. Bublot, M. Efficacy of a Fowlpox-Vectored Avian Influenza H5 Vaccine Against Asian H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Challenge / M. Bublot, N. Pritchard, J.S. Cruz et al. // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № s1. – P. 498-500. DOI: 10.1637/7624-042706R.1.
148. Bublot, M. Development and Use of Fowlpox Vectored Vaccines for Avian Influenza / M. Bublot, N. Pritchard, D.E. Swayne et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1081. – № 1. – P. 193-201. DOI: 10.1196/annals.1373.023.
149. Burrough, E.R. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus Infection in Domestic Dairy Cattle and Cats, United States, 2024 / E.R. Burrough, D.R. Magstadt, B. Petersen et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 30. – № 7. – URL: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/30/7/24-0508_article (date of access: 25.11.2025). – Текст: электронный.
150. Bustin, S.A. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments / S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson et al. // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55. – The MIQE Guidelines. – № 4. – P. 611-622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
151. Byrne J. To what extent is vaccination against avian influenza increasing globally? / Byrne J. // *FeedNavigator. News & Analysis on the Global Animal Feed and Pet Food Industries*. – 2024. – URL: <https://www.feednavigator.com/Article/2024/02/14/Boehringer-talks-vaccination-campaigns-against-bird-flu>. – Текст: электронный.
152. Calderón, K. A Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing the F Protein of Newcastle Disease Virus Genotype XII Generated by NHEJ-CRISPR/Cas9 and Cre-LoxP Systems Confers Protection against Genotype XII Challenge in Chickens / K. Calderón, A. Rojas-Neyra, B. Carbajal-Lévano et al. // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 793. DOI: 10.3390/v14040793.
153. Capua, I. Avian influenza and human health / I. Capua, D.J. Alexander // *Acta Tropica*. – 2002. – Vol. 83. – № 1. – P. 1-6. DOI: 10.1016/S0001-706X(02)00050-5.

154. Capua, I. The challenge of avian influenza to the veterinary community / I. Capua, D.J. Alexander // *Avian Pathology*. – 2006. – Vol. 35. – № 3. – P. 189-205. DOI: 10.1080/03079450600717174.
155. Capua, I. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza / I. Capua, C. Terregino, G. Cattoli et al. // *Avian Pathology*. – 2003. – Vol. 32. – № 1. – P. 47-55. DOI: 10.1080/0307945021000070714.
156. Caserta, L.C. Spillover of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus to dairy cattle / L.C. Caserta, E.A. Frye, S.L. Butt et al. // *Nature*. – 2024. – Vol. 634. – № 8034. – P. 669-676. DOI: 10.1038/s41586-024-07849-4.
157. Cattoli, G. Evidence for differing evolutionary dynamics of A/H5N1 viruses among countries applying or not applying avian influenza vaccination in poultry / G. Cattoli, A. Fusaro, I. Monne et al. // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – № 50. – P. 9368-9375. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.127.
158. CDC. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus: Interim Recommendations for Prevention, Monitoring, and Public Health Investigations. Avian Influenza (Bird Flu). / CDC. – 2024. – URL: <https://www.cdc.gov/bird-flu/prevention/hpai-interim-recommendations.html>. – Текст: электронный.
159. Cha, R.M. Suboptimal protection against H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses from Vietnam in ducks vaccinated with commercial poultry vaccines / R.M. Cha, D. Smith, E. Shepherd et al. // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31. – № 43. – P. 4953-4960. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.08.046.
160. Charkhkar, S. The evaluation and importance of Newcastle disease's economic loss in commercial layer poultry / S. Charkhkar, M. Bashizade, M. Sotoudehnejad et al. // *Journal of Poultry Sciences and Avian Diseases*. – 2024. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-4. DOI: 10.61838/kman.jp sad.2.1.1.
161. Chen, H. Avian influenza vaccination: the experience in China / H. Chen // *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. – 2009. – Vol. 28. – Avian influenza vaccination. – № 1. – P. 267-274. DOI: 10.20506/rst.28.1.1860.
162. Chen, H. Development and Application of Avian Influenza Vaccines in China / H. Chen, Z. Bu. // *Vaccines for Pandemic Influenza : Current Topics in Microbiology and Immunology* / R.W. Compans, W.A. Orenstein eds. . – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2009. – Vol. 333. – P. 153-162. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-92165-3_7 (date of access: 19.10.2025). – Текст: электронный.
163. Cherbonnel, M. Strategies to Improve Protection Against Low-Pathogenicity H7 Avian Influenza Virus Infection Using DNA Vaccines / M. Cherbonnel, J. Rousset, V.

Jestin // Avian Diseases. – 2003. – Vol. 47. – № s3. – P. 1181-1186. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.1181.

164. Cho, S.-H. Characterization of a Recombinant Newcastle Disease Virus Vaccine Strain / S.-H. Cho, H.-J. Kwon, T.-E. Kim et al. // Clinical and Vaccine Immunology. – 2008. – Vol. 15. – № 10. – P. 1572-1579. DOI: 10.1128/CVI.00156-08.

165. Cho, S.-H. Variation of a Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Linear Epitope / S.-H. Cho, H.-J. Kwon, T.-E. Kim et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46. – № 4. – P. 1541-1544. DOI: 10.1128/JCM.00187-08.

166. Chothe, S.K. Marked neurotropism and potential adaptation of H5N1 clade 2.3.4.4.b virus in naturally infected domestic cats / S.K. Chothe, S. Srinivas, S. Misra et al. // Emerging Microbes & Infections. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 2440498. DOI: 10.1080/22221751.2024.2440498.

167. Clements, M. What's happening in the French HPAI vaccination campaign? / M. Clements. – 2026. – URL. <https://www.wattagnet.com/poultry-meat/diseases-health/avian-influenza/article/15770939/whats-happening-in-the-french-hpai-vaccination-campaign>. – Текст: электронный.

168. Clemmons, E.A. Transboundary Animal Diseases, an Overview of 17 Diseases with Potential for Global Spread and Serious Consequences / E.A. Clemmons, K.J. Alfson, J.W. Dutton // Animals. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 2039. DOI: 10.3390/ani11072039.

169. Cohen, J. A bird flu vaccine for cows? It's complicated / J. Cohen // Science. – 2024. – Vol. 384. – A bird flu vaccine for cows? – № 6698. – P. 837-838. DOI: 10.1126/science.adq5971.

170. Conan, A. Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries: a systematic review / A. Conan, F.L. Goutard, S. Sorn, S. Vong // BMC Veterinary Research. – 2012. – Vol. 8. – Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries. – № 1. – P. 240. DOI: 10.1186/1746-6148-8-240.

171. Cornax, I. Characterization of Live LaSota Vaccine Strain–Induced Protection in Chickens upon Early Challenge with a Virulent Newcastle Disease Virus of Heterologous Genotype / I. Cornax, P.J. Miller, C.L. Afonso // Avian Diseases. – 2012. – Vol. 56. – № 3. – P. 464-470. DOI: 10.1637/10043-122011-Reg.1.

172. Cornelissen, L.A.H.M. Protective Efficacy of Newcastle Disease Virus Expressing Soluble Trimeric Hemagglutinin against Highly Pathogenic H5N1 Influenza in Chickens and Mice / L.A.H.M. Cornelissen, O.S. De Leeuw, M.G. Tacken et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 8. – P. e44447. DOI: 10.1371/journal.pone.0044447.

173. Cottrell E. Uruguay launches vaccination campaign to curb avian flu. / Cottrell E. // WATTPoultry. – 2023. –

URL: <https://www.wattagnet.com/egg/article/15537941/uruguay-launches-vaccination-campaign-to-curb-avian-flu>. – Текст: электронный.

174. Couty, M. The role of wild birds in the global highly pathogenic avian influenza H5 panzootic, 2020–2023 / M. Couty, C. Guinat, D. Fornasiero et al. // *Biodiversity*. – 2026. – Vol. 5. – № 1. – P. 1. DOI: 10.1038/s44185-025-00114-5.

175. Craig J. Why aren't we vaccinating birds against bird flu? / Craig J. – 2024. – URL: <https://www.vox.com/future-perfect/24155545/bird-flu-vaccines-h5n1-avian-flu-cows>. – Текст: электронный.

176. Cui, P. Global dissemination of H5N1 influenza viruses bearing the clade 2.3.4.4b HA gene and biologic analysis of the ones detected in China / P. Cui, J. Shi, C. Wang et al. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2022. – Vol. 11. – № 1. – P. 1693-1704. DOI: 10.1080/22221751.2022.2088407.

177. Czeglédi, A. On the origins and relationships of Newcastle disease virus vaccine strains Hertfordshire and Mukteswar, and virulent strain Herts'33 / A. Czeglédi, E. Wehmann, B. Lomniczi // *Avian Pathology*. – 2003. – Vol. 32. – № 3. – P. 271-276. DOI: 10.1080/0307945031000097868.

178. Desingu, P.A. May Newly Defined Genotypes XVII and XVIII of Newcastle Disease Virus in Poultry from West and Central Africa Be Considered a Single Genotype (XVII)? / P.A. Desingu, K. Dhama, Y.S. Malik, R.K. Singh // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2016. – Vol. 54. – № 9. – P. 2399-2399. DOI: 10.1128/JCM.00667-16.

179. Dewidar, A.A. Genotype VII.1.1-Based Newcastle Disease Virus Vaccines Afford Better Protection against Field Isolates in Commercial Broiler Chickens / A.A. Dewidar, W.H. Kilany, A.A. El-Sawah et al. // *Animals*. – 2022. – Vol. 12. – № 13. – P. 1696. DOI: 10.3390/ani12131696.

180. Diel, D.G. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes / D.G. Diel, L.H.A. Da Silva, H. Liu et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2012. – Vol. 12. – Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1. – № 8. – P. 1770-1779. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.07.012.

181. Diel, D.G. Complete Genome and Clinicopathological Characterization of a Virulent Newcastle Disease Virus Isolate from South America / D.G. Diel, L. Susta, S. Cardenas Garcia et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50. – № 2. – P. 378-387. DOI: 10.1128/JCM.06018-11.

182. Dimitrov, K.M. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus / K.M. Dimitrov, C. Abolnik, C.L. Afonso et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2019. – Vol. 74. – P. 103917. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103917.

183. Dimitrov, K.M. Newcastle disease vaccines — A solved problem or a continuous challenge? / K.M. Dimitrov, C.L. Afonso, Q. Yu, P.J. Miller // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 206. – P. 126-136. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.019.
184. Dimitrov, K.M. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) / K.M. Dimitrov, A.M. Ramey, X. Qiu et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2016. – Vol. 39. – P. 22-34. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.01.008.
185. Dimitrov, K.M. Novel Recombinant Newcastle Disease Virus-Based In Ovo Vaccines Bypass Maternal Immunity to Provide Full Protection from Early Virulent Challenge / K.M. Dimitrov, T.L. Taylor, V.C. Marciano et al. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 10. – P. 1189. DOI: 10.3390/vaccines9101189.
186. Domańska-Blicharz, K. Outbreak of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b virus in cats, Poland, June to July 2023 / K. Domańska-Blicharz, E. Świętoń, A. Świątalska et al. // *Eurosurveillance*. – 2023. – Vol. 28. – № 31. – URL: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300366> (date of access: 25.11.2025). – Текст: электронный.
187. Domínguez-Odio, A. Research publications and global manufacture of veterinary vaccines against avian influenza A (2019-2023) / A. Domínguez-Odio, E. Rodríguez-Martínez, M. Paneque Zayas, D.L. Cala-Delgado // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2025. – Vol. 12. – P. 1394675. DOI: 10.3389/fvets.2025.1394675.
188. Donahoe, J.P. Inactivated Avian Influenza Whole Virus Vaccines / J.P. Donahoe // *Avian Diseases*. – 2003. – Vol. 47. – P. 228-236.
189. Dortmans, J.C.F.M. Newcastle disease virus outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? / J.C.F.M. Dortmans, B.P.H. Peeters, G. Koch // *Veterinary Microbiology*. – 2012. – Vol. 160. – Newcastle disease virus outbreaks. – № 1-2. – P. 17-22. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.05.003.
190. Dortmans, J.C.F.M. Field vaccinated chickens with low antibody titres show equally insufficient protection against matching and non-matching genotypes of virulent Newcastle disease virus / J.C.F.M. Dortmans, S. Venema-Kemper, B.P.H. Peeters, G. Koch // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – Vol. 172. – № 1-2. – P. 100-107. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.05.004.
191. Dortmans, J.C.F.M. Virulence Determinants of Newcastle Disease Virus : Doctoral dissertation / J.C.F.M. Dortmans. – Utrecht University, 2011. – URL: <https://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/194128/dortmans.pdf;sequence=1> p. – Текст: электронный.
192. Ebrahimi, M.M. Phylogeny and evolution of Newcastle disease virus genotypes isolated in Asia during 2008–2011 / M.M. Ebrahimi, S. Shahsavandi, G. Moazenijula, M.

Shamsara // *Virus Genes*. – 2012. – Vol. 45. – № 1. – P. 63-68. DOI: 10.1007/s11262-012-0738-5.

193. EFSA. Avian influenza overview December 2023–March 2024 / EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza et al. // *EFSA Journal*. – 2024. – Vol. 22. – № 3. – URL: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2024.8754> (date of access: 14.11.2025). – Текст: электронный.

194. EFSA. Avian influenza overview June–September 2025 / EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza et al. // *EFSA Journal*. – 2025. – Vol. 23. – № 10. – URL: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2025.9702> (date of access: 25.11.2025). – Текст: электронный.

195. EFSA. Unprecedented high level of highly pathogenic avian influenza in wild birds in Europe during the 2025 autumn migration / EFSA, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, M. Ducatez et al. // *EFSA Journal*. – 2025. – Vol. 23. – № 11. – URL: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2025.9811> (date of access: 07.12.2025). – Текст: электронный.

196. Eisfeld, A.J. Pathogenicity and transmissibility of bovine H5N1 influenza virus / A.J. Eisfeld, A. Biswas, L. Guan et al. // *Nature*. – 2024. – Vol. 633. – № 8029. – P. 426-432. DOI: 10.1038/s41586-024-07766-6.

197. El Khantour, A. Immunity Elicited by a Turkey Herpesvirus-Vectored Newcastle Disease Vaccine in Turkey Against Challenge With a Recent Genotype IV Newcastle Disease Virus Field Strain / A. El Khantour, S. Darkaoui, T. Tatár-Kis et al. // *Avian Diseases*. – 2017. – Vol. 61. – № 3. – P. 378-386. DOI: 10.1637/11547-120216-ResNoteR.

198. Elbestawy, A. Superior Efficacy of Apathogenic Genotype I (V4) over Lentogenic Genotype II (LaSota) Live Vaccines against Newcastle Disease Virus Genotype VII.1.1 in Pathogen-Associated Molecular Pattern-H9N2 Vaccinated Broiler Chickens / A. Elbestawy, H. Ellakany, M. Sedeik et al. // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 11. – P. 1638. DOI: 10.3390/vaccines11111638.

199. Ellis, T.M. Vaccination of chickens against H5N1 avian influenza in the face of an outbreak interrupts virus transmission / T.M. Ellis, C.Y.H.C. Leung, M.K.W. Chow et al. // *Avian Pathology*. – 2004. – Vol. 33. – № 4. – P. 405-412. DOI: 10.1080/03079450410001724012.

200. El-Shall, N.A. Examination of the protective efficacy of two avian influenza H5 vaccines against clade 2.3.4.4b H5N8 highly pathogenic avian influenza virus in commercial broilers / N.A. El-Shall, A.M. Awad, M.E. Sedeik // *Research in Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 140. – P. 125-133. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.08.012.

201. Esmaelizad, M. Identification of novel Newcastle disease virus sub-genotype VII-(j) based on the fusion protein / M. Esmaelizad, V. Mayahi, M. Pashaei, H. Goudarzi // *Archives of Virology*. – 2017. – Vol. 162. – № 4. – P. 971-978. DOI: 10.1007/s00705-016-3189-9.
202. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. EMPRES Global Animal Disease Information System (EMPRES-i+). / FAO. – URL. <https://empres-i.apps.fao.org>. – Текст: электронный.
203. FAO. Updated joint FAO/WHO/WOAH public health assessment of recent influenza A(H5) virus events in animals and people / FAO, WHO, WOAHA // Paris, France. – 2025. – URL: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/human-animal-interface-risk-assessments/fao-woah-who-joint-h5-assessment-july-2025.pdf?sfvrsn=fe76b74e_1 & download=true. – Текст: электронный.
204. Farnós, O. Establishing a Robust Manufacturing Platform for Recombinant Veterinary Vaccines: An Adenovirus-Vector Vaccine to Control Newcastle Disease Virus Infections of Poultry in Sub-Saharan Africa / O. Farnós, E. Gelaye, K. Trabelsi et al. // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – № 2. – P. 338. DOI: 10.3390/vaccines8020338.
205. Farnós, O. Intranasally Delivered Adenoviral Vector Protects Chickens against Newcastle Disease Virus: Vaccine Manufacturing and Stability Assessments for Liquid and Lyophilized Formulations / O. Farnós, B.C. Martins Fernandes Paes, B. Getachew et al. // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 41. DOI: 10.3390/vaccines12010041.
206. Fatoyinbo, H.O. Multivariable analysis of highly pathogenic H5N1 and H5Nx avian influenza in wild birds and poultry in Asian subregions / H.O. Fatoyinbo, P. Tiwari, R.H.L. Ip, V. Miranda // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 2025. – Vol. 123. – P. 102387. DOI: 10.1016/j.cimid.2025.102387.
207. Fawzy, M. Efficacy of inactivated velogenic Newcastle disease virus genotype VII vaccine in broiler chickens / M. Fawzy, R. Ali, W. Elfeil et al. // *Veterinary Research Forum*. – 2020. – Vol. 11. – № 2. – URL: <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.95311.2295> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
208. Ferreira, H.L. Protection against Different Genotypes of Newcastle Disease Viruses (NDV) Afforded by an Adenovirus-Vectored Fusion Protein and Live NDV Vaccines in Chickens / H.L. Ferreira, P.J. Miller, D.L. Suarez // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 182. DOI: 10.3390/vaccines9020182.
209. Ferreira, H.L. Protection conferred by commercial NDV live attenuated and double recombinant HVT vaccines against virulent California 2018 Newcastle disease virus (NDV) in chickens / H.L. Ferreira, A.M. Reilley, D. Goldenberg et al. // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38. – № 34. – P. 5507-5515. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.06.004.
210. Firouzmandi, M. Developing a vaccine against velogenic sub-genotype seven of Newcastle disease virus based on virus-like particles / M. Firouzmandi, J.A. Helan, H.

Moeini et al. // AMB Express. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 114. DOI: 10.1186/s13568-023-01617-9.

211. Fodor, E. Rescue of Influenza A Virus from Recombinant DNA / E. Fodor, L. Devenish, O.G. Engelhardt et al. // Journal of Virology. – 1999. – Vol. 73. – № 11. – P. 9679-9682. DOI: 10.1128/JVI.73.11.9679-9682.1999.

212. Fouchier, R.A.M. Use of Antigenic Cartography in Vaccine Seed Strain Selection / R.A.M. Fouchier, D.J. Smith // Avian Diseases. – 2010. – Vol. 54. – № s1. – P. 220-223. DOI: 10.1637/8740-032509-ResNote.1.

213. Fuller, C. An Epizootiological Report of the Re-emergence and Spread of a Lineage of Virulent Newcastle Disease Virus into Eastern Europe / C. Fuller, B. Löndt, K.M. Dimitrov et al. // Transboundary and Emerging Diseases. – 2017. – Vol. 64. – № 3. – P. 1001-1007. DOI: 10.1111/tbed.12455.

214. Gallili, G.E. Newcastle disease vaccines / G.E. Gallili, D. Ben-Nathan // Biotechnology Advances. – 1998. – Vol. 16. – № 2. – P. 343-366. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00081-5.

215. Gall-Reculé, G.L. Importance of a Prime–Boost DNA/Protein Vaccination to Protect Chickens Against Low-Pathogenic H7 Avian Influenza Infection / G.L. Gall-Reculé, M. Cherbonnel, N. Pelotte et al. // Avian Diseases. – 2007. – Vol. 51. – № s1. – P. 490-494. DOI: 10.1637/7592-040206R.1.

216. Ganar, K. Newcastle disease virus: Current status and our understanding / K. Ganar, M. Das, S. Sinha, S. Kumar // Virus Research. – 2014. – Vol. 184. – Newcastle disease virus. – P. 71-81. DOI: 10.1016/j.virusres.2014.02.016.

217. Gao, H. Expression of HA of HPAI H5N1 Virus at US2 Gene Insertion Site of Turkey Herpesvirus Induced Better Protection than That at US10 Gene Insertion Site / H. Gao, H. Cui, X. Cui et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 7. – P. e22549. DOI: 10.1371/journal.pone.0022549.

218. Gardin, Y. Experimental and Field Results Regarding Immunity Induced by a Recombinant Turkey Herpesvirus H5 Vector Vaccine Against H5N1 and Other H5 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Challenges / Y. Gardin, V. Palya, K.M. Dorsey et al. // Avian Diseases. – 2016. – Vol. 60. – № 1s. – P. 232-237. DOI: 10.1637/11144-050815-ResNote.

219. Garg, S. Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Viruses in U.S. Dairy Cattle and Detection of Two Human Cases — United States, 2024 / S. Garg, C. Reed, C.T. Davis et al. // MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2024. – Vol. 73. – № 21. – P. 501-505. DOI: 10.15585/mmwr.mm7321e1.

220. Ge, J. Newcastle Disease Virus-Based Live Attenuated Vaccine Completely Protects Chickens and Mice from Lethal Challenge of Homologous and Heterologous

H5N1 Avian Influenza Viruses / J. Ge, G. Deng, Z. Wen et al. // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 1. – P. 150-158. DOI: 10.1128/JVI.01514-06.

221. Germeraad, E.A. Progress report: Transmission study testing HVT-based H5 vaccine against highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus (clade 2.3.4.4b) / E.A. Germeraad, K.M. Bouwman, C.A. Jansen et al. – Lelystad, 2024. – URL: <https://open.overheid.nl/documenten/0e32d043-50df-4817-900d-d20c94d72ead/file#:~:text=In%20this%20study%2C%20commercial%20poultry,cellula r%20immune%20responses%20were%20studied.> – Текст: электронный.

222. Getabalew, M. Epidemiology, Diagnosis & Prevention of Newcastle Disease in Poultry / M. Getabalew, Alemneh T., Akebereg D. et al. // *American Journal of Biomedical Science & Research*. – 2019. – Vol. 3. – № 1. – P. 50-59. DOI: 10.34297/AJBSR.2019.03.000632.

223. Geus, E.D.D. Induction of respiratory immune responses in the chicken; implications for development of mucosal avian influenza virus vaccines / E.D.D. Geus, J.M.J. Rebel, L. Vervelde // *Veterinary Quarterly*. – 2012. – Vol. 32. – № 2. – P. 75-86. DOI: 10.1080/01652176.2012.711956.

224. Ghafouri S.A. Newcastle disease vaccination program in broilers using a Apathogenic heat-resistant vaccine / Ghafouri S.A., Ghaniei A., Moghani M., Lotfalizadeh N. // *Archives of Razi Institute*. – 2023. – P. 541-548. DOI: 10.32592/ARI.2024.79.3.541.

225. Ghanem, I.A.E. The protection conferred against virulent Newcastle disease virus (vNDV) genotype VII by commercial double recombinant HVT vaccines and NDV live-attenuated vaccine as prime/boost vaccination regimens in commercial broiler chickens carrying maternally-derived antibodies (MDAs) against NDV / I.A.E. Ghanem, T.M. Abdullatif, O. Hassanin // *Avian Pathology*. – 2023. – Vol. 52. – № 4. – P. 251-263. DOI: 10.1080/03079457.2023.2211548.

226. Giacinti, J.A. Transmission dynamics of highly pathogenic avian influenza virus at the wildlife-poultry-environmental interface: A case study / J.A. Giacinti, M. Jarvis-Cross, H. Lewis et al. // *One Health*. – 2024. – Vol. 19. –P. 100932. DOI: 10.1016/j.onehlt.2024.100932.

227. Gobbo, F. Silent Infection of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b in a Commercial Chicken Broiler Flock in Italy / F. Gobbo, C. Zanardello, M. Bottinelli et al. // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – P. 1600. DOI: 10.3390/v14081600.

228. Goebel, S.J. Isolation of Avian Paramyxovirus 1 from a Patient with a Lethal Case of Pneumonia / S.J. Goebel, J. Taylor, B.C. Barr et al. // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81. – № 22. – P. 12709-12714. DOI: 10.1128/JVI.01406-07.

229. Goetz, S.K. Assessment of Reduced Vaccine Dose on Efficacy of an Inactivated Avian Influenza Vaccine Against an H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Virus / S.K. Goetz, E. Spackman, C. Hayhow, D.E. Swayne // *Journal of Applied Poultry Research*. – 2008. – Vol. 17. – № 1. – P. 145-150. DOI: 10.3382/japr.2007-00098.
230. Goraichuk, I.V. Genetic diversity of Newcastle disease viruses circulating in wild and synanthropic birds in Ukraine between 2006 and 2015 / I.V. Goraichuk, A. Gerilovych, V. Bolotin et al. // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2023. – Vol. 10. – P. 1026296. DOI: 10.3389/fvets.2023.1026296.
231. Graziosi, G. Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) H5 Clade 2.3.4.4b Virus Infection in Birds and Mammals / G. Graziosi, C. Lupini, E. Catelli, S. Carnaccini // *Animals*. – 2024. – Vol. 14. – № 9. – P. 1372. DOI: 10.3390/ani14091372.
232. Grenfell, B.T. Unifying the Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Pathogens / B.T. Grenfell, O.G. Pybus, J.R. Gog et al. // *Science*. – 2004. – Vol. 303. – № 5656. – P. 327-332. DOI: 10.1126/science.1090727.
233. Gu, M. Current situation of H9N2 subtype avian influenza in China / M. Gu, L. Xu, X. Wang, X. Liu // *Veterinary Research*. – 2017. – Vol. 48. – № 1. – P. 49. DOI: 10.1186/s13567-017-0453-2.
234. Guinat, C. Promising Effects of Duck Vaccination against Highly Pathogenic Avian Influenza, France 2023–2024 / C. Guinat, L. Fourtune, S. Lambert et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2025. – Vol. 31. – № 7. – URL: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/31/7/24-1445_article (date of access: 14.11.2025). – Текст: электронный.
235. Gupta, N. Endemic avian influenza landscape in Asia: sustained zoonotic risks / N. Gupta, M.P. Grobusch, J.F. Drexler et al. // *Infection*. – 2025. – Endemic avian influenza landscape in Asia. – URL: <https://link.springer.com/10.1007/s15010-025-02681-y> (date of access: 25.11.2025). – Текст: электронный.
236. Guseva, N.A. Analysis of Avian Orthoavulavirus 1 Detected in the Russian Federation between 2017 and 2021 / N.A. Guseva, S.N. Kolosov, N.G. Zinyakov et al. // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – P. 1032. DOI: 10.3390/vaccines11061032.
237. Gwon, S.-H. Fatal H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza with Retrograde Neuroinvasion in a Free-Ranging Leopard Cat (*Prionailurus bengalensis*) During a Wild Bird Outbreak in South Korea / S.-H. Gwon, S.-I. Park, H. Jeong et al. // *Animals*. – 2026. – Vol. 16. – № 2. – P. 200. DOI: 10.3390/ani16020200.
238. Habib, M. Genomic and biological characterization of Newcastle disease viruses isolated from migratory mallards (*Anas platyrhynchos*) / M. Habib, T. Yaqub, J. Nazir et al. // *Archives of Virology*. – 2018. – Vol. 163. – № 8. – P. 2179-2188. DOI: 10.1007/s00705-018-3840-8.

239. Habibi, H. Efficacy of the thermostable Newcastle disease virus strain I-2 in broiler chickens challenged with highly virulent virus / H. Habibi, S. Firuzi, H. Nili et al. // Archives of Razi Institute. – 2020. – № Online First. – URL: <https://doi.org/10.22092/ari.2019.122830.1228> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
240. Habibi, H. Efficacy and transmissibility of Newcastle disease I-2 vaccine strain against a field isolate of virulent ND virus (JF820294.1) in village chicken / H. Habibi, H. Nili, K. Asasi et al. // Tropical Animal Health and Production. – 2015. – Vol. 47. – № 1. – P. 73-78. DOI: 10.1007/s11250-014-0687-1.
241. Haque, M.A. Determination of immunogenicity of an inactivated ND-vaccine developed experimentally with Newcastle disease virus (Genotype VII.2) local isolates of Bangladesh / M.A. Haque, Md.E. Haque, Mst.K. Parvin et al. // Frontiers in Immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1482314. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1482314.
242. Haque, M.A. Characterization of the dominant strain (G-VII) of Newcastle disease viruses isolated from commercial chickens in Bangladesh during recent outbreaks / M.A. Haque, M. Sadekuzzaman, M. Haque et al. // Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. – 2024. – Vol. 11. – № 2. – P. 408. DOI: 10.5455/javar.2024.k790.
243. Haredy, A.M. An MDCK cell culture-derived formalin-inactivated influenza virus whole-virion vaccine from an influenza virus library confers cross-protective immunity by intranasal administration in mice / A.M. Haredy, N. Takenaka, H. Yamada et al. // Clinical and vaccine immunology: CVI. – 2013. – Vol. 20. – № 7. – P. 998-1007. DOI: 10.1128/CVI.00024-13.
244. Hasegawa, H. Development of mucosal adjuvants for intranasal vaccine for H5N1 influenza viruses / H. Hasegawa, Ichinohe T., Ainai A. et al. // Therapeutics and Clinical Risk Management. – 2009. – P. 125. DOI: 10.2147/TCRM.S3297.
245. Hassanzadeh, M. Evaluation of the Newcastle disease virus genotype VII–mismatched vaccines in SPF chickens: A challenge efficacy study / M. Hassanzadeh, M. Abedi, M. Bashashati et al. // Veterinary and Animal Science. – 2024. – Vol. 24. – P. 100348. DOI: 10.1016/j.vas.2024.100348.
246. Hein, R. Review of Poultry Recombinant Vector Vaccines / R. Hein, R. Koopman, M. García et al. // Avian Diseases. – 2021. – Vol. 65. – № 3. – URL: <https://bioone.org/journals/avian-diseases/volume-65/issue-3/0005-2086-65.3.438/Review-of-Poultry-Recombinant-Vector-Vaccines/10.1637/0005-2086-65.3.438.full> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
247. Höfle, U. Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*) / U. Höfle, M.W.G. Van De Bildt, L.M. Leijten et al. // Avian Pathology. – 2012. – Vol. 41. – № 6. – P. 547-553. DOI: 10.1080/03079457.2012.744447.

248. Hossain, I. A Booster with a Genotype-Matched Inactivated Newcastle Disease Virus (NDV) Vaccine Candidate Provides Better Protection against a Virulent Genotype XIII.2 Virus / I. Hossain, J.F. Subarna, C.K. Kabiraj et al. // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 5. – P. 1005. DOI: 10.3390/vaccines11051005.
249. Hu, S. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics / S. Hu, H. Ma, Y. Wu et al. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 27. – № 6. – P. 904-910. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.091.
250. Hu, Z. Current situation and future direction of Newcastle disease vaccines / Z. Hu, X. He, J. Deng et al. // *Veterinary Research*. – 2022. – Vol. 53. – № 1. – P. 99. DOI: 10.1186/s13567-022-01118-w.
251. Hu, Z. Generation of a Genotype VII Newcastle Disease Virus Vaccine Candidate with High Yield in Embryonated Chicken Eggs / Z. Hu, S. Hu, C. Meng et al. // *Avian Diseases*. – 2011. – Vol. 55. – № 3. – P. 391-397. DOI: 10.1637/9633-122410-Reg.1.
252. Hu, Z. "Antigen Camouflage and Decoy" Strategy to Overcome Interference From Maternally Derived Antibody With Newcastle Disease Virus-Vectorized Vaccines: More Than a Simple Combination / Z. Hu, X. Liu // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 735250. DOI: 10.3389/fmicb.2021.735250.
253. Hu, Z. Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for 20 Years: A Focus on Maternally Derived Antibody Interference / Z. Hu, J. Ni, Y. Cao, X. Liu // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for 20 Years. – № 2. – P. 222. DOI: 10.3390/vaccines8020222.
254. ICTV. Taxonomy. – International Committee on Taxonomy of Viruses / ICTV. – 2021. – URL: <https://ictv.global/taxonomy> (date of access: 08.02.2026). – Текст: электронный.
255. Ingraio, F. The Expression of Hemagglutinin by a Recombinant Newcastle Disease Virus Causes Structural Changes and Alters Innate Immune Sensing / F. Ingraio, V. Duchatel, I.F. Rodil et al. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – № 7. – P. 758. DOI: 10.3390/vaccines9070758.
256. Islam, A. The role of vaccination and environmental factors on outbreaks of high pathogenicity avian influenza H5N1 in Bangladesh / A. Islam, S. Munro, M.M. Hassan et al. // *One Health*. – 2023. – Vol. 17. – P. 100655. DOI: 10.1016/j.onehlt.2023.100655.
257. Islam, Md.S. Study on Vaccination Efficacy against Avian Influenza in Rajshahi, Bangladesh / Md.S. Islam, Md.H. Islam, Md.J.U. Sarder et al. // *Journal of Agricultural Science and Technology A*. – 2017. – Vol. 7. – № 3. – URL: <http://www.davidpublisher.org/index.php/Home/Article/index?id=32014.html> (date of access: 14.11.2025). – Текст: электронный.

258. Izquierdo-Lara, R. Genotype-matched Newcastle disease virus vaccine confers improved protection against genotype XII challenge: The importance of cytoplasmic tails in viral replication and vaccine design / R. Izquierdo-Lara, A. Chumbe, K. Calderón et al. // PLOS ONE. – 2019. – Vol. 14. – № 11. – P. e0209539. DOI: 10.1371/journal.pone.0209539.
259. Jahid, M.J. Dynamics of a Panzootic: Genomic Insights, Host Range, and Epidemiology of the Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Clade 2.3.4.4b in the United States / M.J. Jahid, J.M. Nolting // Viruses. – 2025. – Vol. 17. – № 3. – P. 312. DOI: 10.3390/v17030312.
260. Jazayeri, S.D. Recent advances in delivery of veterinary DNA vaccines against avian pathogens / S.D. Jazayeri, C.L. Poh // Veterinary Research. – 2019. – Vol. 50. – № 1. – P. 78. DOI: 10.1186/s13567-019-0698-z.
261. Jeon, W.-J. Protective efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines in chickens against a recent Korean epizootic strain / W.-J. Jeon, E.-K. Lee, Y.-J. Lee et al. // Journal of Veterinary Science. – 2008. – Vol. 9. – № 3. – P. 295. DOI: 10.4142/jvs.2008.9.3.295.
262. Ji, Y. A novel genotype VII Newcastle disease virus vaccine candidate generated by mutation in the L and F genes confers improved protection in chickens / Y. Ji, T. Liu, Y. Du et al. // Veterinary Microbiology. – 2018. – Vol. 216. – P. 99-106. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.01.021.
263. Jia, W. Construction and immune efficacy of a recombinant turkey herpesvirus vaccine strain expressing fusion protein of genotype VII Newcastle disease virus / W. Jia, X. Zhang, H. Wang et al. // Veterinary Microbiology. – 2022. – Vol. 268. – P. 109429. DOI: 10.1016/j.vetmic.2022.109429.
264. Kaleta, E.F. Newcastle Disease in Free-Living and Pet Birds / E.F. Kaleta, C. Baldauf // Newcastle Disease : Developments in Veterinary Virology / Y. Becker, J. Hadar coll. ; D.J. Alexander ed. . – Boston, MA : Springer US, 1988. – Vol. 8. – P. 197-246. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-1759-3_12 (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
265. Kalonda, A. Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolated from Poultry in Live Bird Markets and Wild Waterfowl in Zambia / A. Kalonda, N. Saasa, M. Kajihara et al. // Microorganisms. – 2024. – Vol. 12. – № 2. – P. 354. DOI: 10.3390/microorganisms12020354.
266. Kamel, M. The emergence of highly pathogenic avian influenza H5N1 in dairy cattle: implications for public health, animal health, and pandemic preparedness / M. Kamel, S. Aleya, W.T. Almagharbeh et al. // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. – 2025. – Vol. 44. – № 8. – P. 1817-1833. DOI: 10.1007/s10096-025-05147-z.

267. Kammon, A. Characterization of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses from Poultry in Libya / A. Kammon, A. Heidari, A. Dayhum et al. // *Avian Diseases*. – 2015. – Vol. 59. – № 3. – P. 422-430. DOI: 10.1637/11068-032215-ResNote.1.
268. Kandeil, A. Avian influenza H5N1 vaccination efficacy in Egyptian backyard poultry / A. Kandeil, A. Mostafa, R. El-Shesheny et al. // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 45. – P. 6195-6201. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.09.040.
269. Kang, Y.-M. Introduction of Multiple Novel High Pathogenicity Avian Influenza (H5N1) Virus of Clade 2.3.4.4b into South Korea in 2022 / Y.-M. Kang, G.-B. Heo, S.-H. An et al. // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2023. – Vol. 2023. – P. 8339427. DOI: 10.1155/2023/8339427.
270. Kapczynski, D.R. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus / D.R. Kapczynski, C.L. Afonso, P.J. Miller // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2013. – Vol. 41. – № 3. – P. 447-453. DOI: 10.1016/j.dci.2013.04.012.
271. Kapczynski, D.R. Efficacy of recombinant H5 vaccines delivered in ovo or day of age in commercial broilers against the 2015 U.S. H5N2 clade 2.3.4.4c highly pathogenic avian Influenza virus / D.R. Kapczynski, K. Chrzastek, R. Shanmugasundaram et al. // *Virology Journal*. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 298. DOI: 10.1186/s12985-023-02254-1.
272. Kapczynski, D.R. Vaccine Protection of Turkeys Against H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus with a Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing the Hemagglutinin Gene of Avian Influenza / D.R. Kapczynski, K. Dorsey, K. Chrzastek et al. // *Avian Diseases*. – 2016. – Vol. 60. – № 2. – P. 413-417. DOI: 10.1637/11267-090115-Reg.
273. Kapczynski, D.R. Vaccine protection of chickens against antigenically diverse H5 highly pathogenic avian influenza isolates with a live HVT vector vaccine expressing the influenza hemagglutinin gene derived from a clade 2.2 avian influenza virus / D.R. Kapczynski, M. Esaki, K.M. Dorsey et al. // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33. – № 9. – P. 1197-1205. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.12.028.
274. Kapczynski, D.R. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak / D.R. Kapczynski, D.J. King // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23. – № 26. – P. 3424-3433. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.140.
275. Kapczynski, D.R. Homologous and heterologous antigenic matched vaccines containing different H5 hemagglutinins provide variable protection of chickens from the 2014 U.S. H5N8 and H5N2 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses / D.R.

Kapczynski, M.J. Pantin-Jackwood, E. Spackman et al. // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 46. – P. 6345-6353. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.04.042.

276. Kapczynski, D.R. Influenza Vaccines for Avian Species / D.R. Kapczynski, D.E. Swayne // *Vaccines for Pandemic Influenza : Current Topics in Microbiology and Immunology* / R.W. Compans, W.A. Orenstein eds. . – Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2009. – Vol. 333. – P. 133-152. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-92165-3_6 (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.

277. Karami S. Immunogenicity of inactivated H5 avian influenza vaccine used in commercial laying pullet in Tehran province / Karami S, Karimi V, Barin A et al. // *Archives of Razi Institute*. – 2024. – P. 499-506. DOI: 10.32592/ARI.2024.79.3.499.

278. Katz, J.M. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses / J.M. Katz, X. Lu, A.M. Frace et al. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2000. – Vol. 54. – № 4. – P. 178-187. DOI: 10.1016/S0753-3322(00)89024-1.

279. Kayali, G. Do commercial avian influenza H5 vaccines induce cross-reactive antibodies against contemporary H5N1 viruses in Egypt? / G. Kayali, A. Kandeil, R. El-Shesheny et al. // *Poultry Science*. – 2013. – Vol. 92. – № 1. – P. 114-118. DOI: 10.3382/ps.2012-02637.

280. Kim, S.-H. Evaluation of fusion protein cleavage site sequences of Newcastle disease virus in genotype matched vaccines / S.-H. Kim, Z. Chen, A. Yoshida et al. // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. e0173965. DOI: 10.1371/journal.pone.0173965.

281. Kim, S.-H. A novel chimeric Newcastle disease virus vectored vaccine against highly pathogenic avian influenza virus / S.-H. Kim, A. Paldurai, S.K. Samal // *Virology*. – 2017. – Vol. 503. – P. 31-36. DOI: 10.1016/j.virol.2017.01.006.

282. Kim, S.-H. Modified Newcastle disease virus vectors expressing the H5 hemagglutinin induce enhanced protection against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in chickens / S.-H. Kim, A. Paldurai, S. Xiao et al. // *Vaccine*. – 2014. – Vol. 32. – № 35. – P. 4428-4435. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.06.061.

283. Kim, S.-H. Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for Development of Human and Veterinary Vaccines / S.-H. Kim, S. Samal // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8. – № 7. – P. 183. DOI: 10.3390/v8070183.

284. Kim, S.-H. Newcastle disease virus fusion protein is the major contributor to protective immunity of genotype-matched vaccine / S.-H. Kim, N. Wanasen, A. Paldurai et al. // *PLOS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – Retraction. – № 12. – P. e0244074. DOI: 10.1371/journal.pone.0244074.

285. Kim, Y.-I. PB2 and NP of North American H5N1 virus drive immune cell replication and systemic infections / Y.-I. Kim, S.-G. Jang, W. Kwon et al. // *Science Advances*. – 2025. – Vol. 11. – № 39. – P. 1208. DOI: 10.1126/sciadv.ady1208.
286. King, A.M.Q. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy / A.M.Q. King. – Amsterdam : Elsevier/Academic Press, 2012. – 1344 p.
287. Kondakova, O.A. Genetic Diversity of Newcastle Disease Virus and Its Implications for Vaccine Development / O.A. Kondakova, A.A. Agranovsky, E.M. Ryabchevskaya et al. // *Veterinary Sciences*. – 2025. – Vol. 12. – № 9. – P. 858. DOI: 10.3390/vetsci12090858.
288. Kovács, L. Avian Influenza Clade 2.3.4.4b: Global Impact and Summary Analysis of Vaccine Trials / L. Kovács, M. Farkas, P.F. Dobra et al. // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13. – Avian Influenza Clade 2.3.4.4b. – № 5. – P. 453. DOI: 10.3390/vaccines13050453.
289. Kozlov, M. US will vaccinate birds against avian flu for first time — what researchers think / M. Kozlov // *Nature*. – 2023. – Vol. 618. – № 7964. – P. 220-221. DOI: 10.1038/d41586-023-01760-0.
290. Krammer, F. Highly pathogenic avian influenza H5N1: history, current situation, and outlook / F. Krammer, E. Hermann, A.L. Rasmussen // *Journal of Virology*. – 2025. – Vol. 99. – Highly pathogenic avian influenza H5N1. – № 4. – P. e02209-24. DOI: 10.1128/jvi.02209-24.
291. Ku, C.-C. Vaccine optimization for highly pathogenic avian influenza: Assessment of antibody responses and protection for virus-like particle vaccines in chickens / C.-C. Ku, C.-Y. Lin, C.-R. Yang et al. // *Vaccine: X*. – 2024. – Vol. 20. – P. 100552. DOI: 10.1016/j.jvacx.2024.100552.
292. Kuiken, T. Zoonotic Infection With Pigeon Paramyxovirus Type 1 Linked to Fatal Pneumonia / T. Kuiken, M. Breitbart, M. Beer et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 218. – № 7. – P. 1037-1044. DOI: 10.1093/infdis/jiy036.
293. Kumar, M. Association of Serologic and Protective Responses of Avian Influenza Vaccines in Chickens / M. Kumar, H.-J. Chu, J. Rodenberg et al. // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № s1. – P. 481-483. DOI: 10.1637/7605-041706R1.1.
294. Kwon, Y.-K. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in the commercial domestic ducks of South Korea / Y.-K. Kwon, S.-J. Joh, M.-C. Kim et al. // *Avian Pathology*. – 2005. – Vol. 34. – № 4. – P. 367-370. DOI: 10.1080/03079450500181257.
295. Lardinois, A. Stronger Interference of Avian Influenza Virus-Specific Than Newcastle Disease Virus-Specific Maternally Derived Antibodies with a Recombinant NDV-H5 Vaccine / A. Lardinois, O. Vandersleyen, M. Steensels et al. // *Avian Diseases*. – 2016. – Vol. 60. – № 1s. – P. 191-201. DOI: 10.1637/11133-050815-Reg.

296. Larsen, S.V. Transmission, Pathological and Clinical Manifestations of Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus in Mammals with Emphasis on H5N1 Clade 2.3.4.4b / S.V. Larsen, R. Israelson, C. Torp et al. // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17. – № 12. – P. 1548. DOI: 10.3390/v17121548.
297. Lebdah, M. Protective effectiveness of two vaccination schemes against the prevalent Egyptian strain of Newcastle disease virus genotype VII / M. Lebdah, A. Abdallah, E. Hamouda et al. // *Open Veterinary Journal*. – 2024. – Vol. 14. – № (1) International Zagazig Vet. – P. 32. DOI: 10.5455/OVJ.2024.v14.i1.5.
298. Lee, C.-W. Effect of Vaccine Use in the Evolution of Mexican Lineage H5N2 Avian Influenza Virus / C.-W. Lee, D.A. Senne, D.L. Suarez // *Journal of Virology*. – 2004. – Vol. 78. – № 15. – P. 8372-8381. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004.
299. Lee, D.-H. Progress and hurdles in the development of influenza virus-like particle vaccines for veterinary use / D.-H. Lee, J.-K. Park, C.-S. Song // *Clinical and Experimental Vaccine Research*. – 2014. – Vol. 3. – № 2. – P. 133. DOI: 10.7774/cevr.2014.3.2.133.
300. Lee, D.-H. H9N2 avian influenza virus in Korea: evolution and vaccination / D.-H. Lee, C.-S. Song // *Clinical and Experimental Vaccine Research*. – 2013. – Vol. 2. – H9N2 avian influenza virus in Korea. – № 1. – P. 26. DOI: 10.7774/cevr.2013.2.1.26.
301. Lee, Y.-J. Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins / Y.-J. Lee, H.-W. Sung, J.-G. Choi et al. // *Journal of Veterinary Science*. – 2008. – Vol. 9. – № 3. – P. 301. DOI: 10.4142/jvs.2008.9.3.301.
302. Lee, Y.-N. Isolation and Characterization of a Novel H9N2 Influenza Virus in Korean Native Chicken Farm / Y.-N. Lee, D.-H. Lee, J.-K. Park et al. // *Avian Diseases*. – 2011. – Vol. 55. – № 4. – P. 724-727. DOI: 10.1637/9774-050911-Case.1.
303. Leguia, M. Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru / M. Leguia, A. Garcia-Glaessner, B. Muñoz-Saavedra et al. // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 5489. DOI: 10.1038/s41467-023-41182-0.
304. Leonard, R.A. Development of DNA and mRNA-LNP vaccines against an H5N1 clade 2.3.4.4b influenza virus / R.A. Leonard, M.A. Spurrier, S. Skavicus et al. // *Journal of Virology*. – 2025. – Vol. 99. – № 8. – P. e00795-25. DOI: 10.1128/jvi.00795-25.
305. Lewis, N.S. Emergence and spread of novel H5N8, H5N5 and H5N1 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza in 2020 / N.S. Lewis, A.C. Banyard, E. Whittard et al. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 148-151. DOI: 10.1080/22221751.2021.1872355.

306. Li, B. Association of poultry vaccination with interspecies transmission and molecular evolution of H5 subtype avian influenza virus / B. Li, J. Raghwani, S.C. Hill et al. // *Science Advances*. – 2025. – Vol. 11. – № 4. – P. eado9140. DOI: 10.1126/sciadv.ado9140.
307. Li, C. Avian influenza vaccines against H5N1 ‘bird flu’ / C. Li, Z. Bu, H. Chen // *Trends in Biotechnology*. – 2014. – Vol. 32. – № 3. – P. 147-156. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.01.001.
308. Li, Y. Recombinant herpesvirus of turkeys as a vector-based vaccine against highly pathogenic H7N1 avian influenza and Marek’s disease / Y. Li, K. Reddy, S.M. Reid et al. // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – № 46. – P. 8257-8266. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.115.
309. Li, Y. Comparison of the protective antigen variabilities of prevalent Newcastle disease viruses in response to homologous/heterologous genotype vaccines / Y. Li, Z.U. Rehman, M. Li et al. // *Poultry Science*. – 2021. – Vol. 100. – № 8. – P. 101267. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101267.
310. Liljebjelke, K.A. Determination of Minimum Hemagglutinin Units in an Inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine for Clinical Protection of Chickens from Exotic Newcastle Disease Virus Challenge / K.A. Liljebjelke, D.J. King, D.R. Kapczynski // *Avian Diseases*. – 2008. – Vol. 52. – № 2. – P. 260-268. DOI: 10.1637/8154-101907-Reg.1.
311. Lima, F.L. Evaluation of Different Programs of Newcastle Disease Vaccination in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) / F.L. Lima, E. Santin, A.C.P. Pauli et al. // *International Journal of Poultry Science*. – 2004. – Vol. 3. – № 5. – P. 354-356. DOI: 10.3923/ijps.2004.354.356.
312. Linden, J. Avian flu hits poultry farms in 13 European states / J. Linden. – 2025. – URL: <https://www.wattagnet.com/poultry-meat/diseases-health/avian-influenza/news/15772927/avian-flu-hits-poultry-farms-in-13-european-states>. – Текст: электронный.
313. Liu, H. Can genotype mismatch really affect the level of protection conferred by Newcastle disease vaccines against heterologous virulent strains? / H. Liu, R.S. De Almeida, P. Gil et al. // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36. – № 27. – P. 3917-3925. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.05.074.
314. Liu, J. Chimeric Newcastle disease virus-vectorized vaccine protects chickens against H9N2 avian influenza virus in the presence of pre-existing NDV immunity / J. Liu, L. Xue, S. Hu et al. // *Archives of Virology*. – 2018. – Vol. 163. – № 12. – P. 3365-3371. DOI: 10.1007/s00705-018-4016-2.
315. Liu, J. Effects of the HN Antigenic Difference between the Vaccine Strain and the Challenge Strain of Newcastle Disease Virus on Virus Shedding and Transmission / J.

- Liu, J. Zhu, H. Xu et al. // *Viruses*. – 2017. – Vol. 9. – № 8. – P. 225. DOI: 10.3390/v9080225.
316. Liu, L. Recombinant turkey herpesvirus expressing H9 hemagglutinin providing protection against H9N2 avian influenza / L. Liu, T. Wang, M. Wang et al. // *Virology*. – 2019. – Vol. 529. – P. 7-15. DOI: 10.1016/j.virol.2019.01.004.
317. Liu, M. Efficacy of Newcastle disease LaSota vaccine-induced hemagglutination inhibition antibodies against challenges with heterologous virulent strains of genotypes VII and IX / M. Liu, X. Shen, J. Li et al. // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2023. – Vol. 259. – P. 110591. DOI: 10.1016/j.vetimm.2023.110591.
318. Liu, M. Effect of Different Levels of Maternally Derived Genotype VII Newcastle Disease Virus-Specific Hemagglutination Inhibition Antibodies on Protection against Virulent Challenge in Chicks / M. Liu, X. Shen, Y. Yu et al. // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 9. – P. 1840. DOI: 10.3390/v15091840.
319. Liu, S. Control of avian influenza in China: Strategies and lessons / S. Liu, Q. Zhuang, S. Wang et al. // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2020. – Vol. 67. – Control of avian influenza in China. – № 4. – P. 1463-1471. DOI: 10.1111/tbed.13515.
320. Liu, Y. Genetic characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus from China / Y. Liu, C. Sun, M. Chi et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2019. – Vol. 75. – P. 103958. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.103958.
321. Lomniczi, B. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII) / B. Lomniczi, E. Wehmann, J. Herczeg et al. // *Archives of Virology*. – 1998. – Vol. 143. – № 1. – P. 49-64. DOI: 10.1007/s007050050267.
322. Lupiani, B. The history of avian influenza / B. Lupiani, S.M. Reddy // *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 32. – № 4. – P. 311-323. DOI: 10.1016/j.cimid.2008.01.004.
323. Ly, H. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections of dairy cattle and livestock handlers in the United States of America / H. Ly // *Virulence*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 2343931. DOI: 10.1080/21505594.2024.2343931.
324. Ma, M.-J. Avian Influenza A Virus Infection among Workers at Live Poultry Markets, China, 2013–2016 / M.-J. Ma, T. Zhao, S.-H. Chen et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 24. – № 7. – P. 1246-1256. DOI: 10.3201/eid2407.172059.
325. Maartens, L.H. The efficacy of an inactivated avian influenza H5N1 vaccine against an African strain of HPAI H5N8 (clade 2.3.4.4 B) / L.H. Maartens, L. Frizzo Da Silva, S. Dawson et al. // *Avian Pathology*. – 2023. – Vol. 52. – № 3. – P. 176-184. DOI: 10.1080/03079457.2023.2181145.

326. Macpherson, L.W. Some Observations On The Epizootiology Of NewCastle Disease / L.W. Macpherson // Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science. – 1956. – Vol. 20. – № 5. – P. 155-168.
327. Mahmood, S. In vivo challenge studies on vaccinated chickens indicate a virus genotype mismatched vaccine still offers significant protection against NDV / S. Mahmood, P. Skinner, C.J. Warren et al. // Vaccine. – 2024. – Vol. 42. – № 3. – P. 653-661. DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.12.037.
328. Mahmoud, N.K. Genotypes II and VIId-based inactivated Newcastle disease vaccine reduces virus shedding / N.K. Mahmoud, A.H. El-Deeb, M.M. Emara et al. // VirusDisease. – 2019. – Vol. 30. – № 3. – P. 453-461. DOI: 10.1007/s13337-019-00537-2.
329. Mahmoud, S.H. Immunogenicity and Cross-Protective Efficacy Induced by an Inactivated Recombinant Avian Influenza A/H5N1 (Clade 2.3.4.4b) Vaccine against Co-Circulating Influenza A/H5Nx Viruses / S.H. Mahmoud, A.A. Khalil, N.M. Abo Shama et al. // Vaccines. – 2023. – Vol. 11. – № 9. – P. 1397. DOI: 10.3390/vaccines11091397.
330. Malik, Y.S. Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses / Y.S. Malik, A. Arun Prince Milton, S. Ghatak, S. Ghosh // Role of Birds in Transmitting Zoonotic Pathogens : Livestock Diseases and Management. – Singapore : Springer Singapore, 2021. – P. 79-91. – URL: https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-4554-9_6 (date of access: 21.11.2025). – Текст: электронный.
331. Manoharan, V.K. Effect of fusion protein cleavage site sequence on generation of a genotype VII Newcastle disease virus vaccine / V.K. Manoharan, B.P. Varghese, A. Paldurai, S.K. Samal // PLOS ONE. – 2018. – Vol. 13. – № 5. – P. e0197253. DOI: 10.1371/journal.pone.0197253.
332. Mariappan, A.K. Pathological and molecular investigation of velogenic viscerotropic Newcastle disease outbreak in a vaccinated chicken flocks / A.K. Mariappan, P. Munusamy, D. Kumar et al. // VirusDisease. – 2018. – Vol. 29. – № 2. – P. 180-191. DOI: 10.1007/s13337-018-0445-5.
333. Mase, M. Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Genotypes Isolated in Japan / M. Mase, K. Imai, Y. Sanada et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – № 10. – P. 3826-3830. DOI: 10.1128/JCM.40.10.3826-3830.2002.
334. McNulty, M.S. Avian Influenza: Diagnosis and Vaccination / M.S. McNulty, J.B. McFerran // Acute Virus Infections of Poultry / J.B. McFerran, M.S. McNulty eds. . – Dordrecht : Springer Netherlands, 1986. – Avian Influenza. – P. 36-44. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-94-009-4287-5_4 (date of access: 23.11.2025). – Текст: электронный.
335. Mena-Vasquez, J. Emerging threats of HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b in swine: knowledge gaps and the imperative for a One Health approach / J. Mena-Vasquez, A.

Marco-Fuertes, M. Culhane, M. Torremorell // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2025. – Vol. 12. – Emerging threats of HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b in swine. – P. 1648878. DOI: 10.3389/fvets.2025.1648878.

336. Meseko, C. Rational approach to vaccination against highly pathogenic avian influenza in Nigeria: a scientific perspective and global best practice / C. Meseko, N.O. Ameji, B. Kumar, M. Culhane // *Archives of Virology*. – 2023. – Vol. 168.– № 10. – P. 263. DOI: 10.1007/s00705-023-05888-2.

337. Mihiretu, B.D. Genetic and antigenic characteristics of genotype VII.1.1 Newcastle disease viruses currently circulating in Ethiopian chickens / B.D. Mihiretu, T. Usui, T.R. Chibssa, T. Yamaguchi // *Virology Journal*. – 2025. – Vol. 22. – № 1. – P. 63. DOI: 10.1186/s12985-025-02686-x.

338. Miller P. J., Koch G. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and avian metapneumovirus infections / Miller P. J., Koch G. // *Diseases of poultry*. – 2013. – Vol. 13. – P. 89-107.

339. Miller, P.J. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses / P.J. Miller, C.L. Afonso, J. El Attrache et al. // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2013. – Vol. 41. – № 4. – P. 505-513. DOI: 10.1016/j.dci.2013.06.007.

340. Miller, P.J. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges / P.J. Miller, E.L. Decanini, C.L. Afonso // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2010. – Vol. 10. – Newcastle disease. – № 1. – P. 26-35. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.09.012.

341. Miller, P.J. International Biological Engagement Programs Facilitate Newcastle Disease Epidemiological Studies / P.J. Miller, K.M. Dimitrov, D. Williams-Coplin et al. // *Frontiers in Public Health*. – 2015. – Vol. 3. – URL: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpubh.2015.00235/abstract> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.

342. Miller, P.J. Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features / P.J. Miller, R. Haddas, L. Simanov et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – Vol. 29. – P. 216-229. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.10.032.

343. Miller, P.J. Improved Newcastle disease vaccine strategies to reduce shedding of virulent virus from infected birds. / P.J. Miller. – Athens USA : Faculty of The University of Georgia, 2008. – 186 p.

344. Miller, P.J. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge / P.J. Miller, D.J. King, C.L. Afonso, D.L. Suarez // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – № 41. – P. 7238-7246. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.07.017.

345. Mo, J. Prediction of highly pathogenic avian influenza vaccine efficacy in chickens by comparison of in vitro and in vivo data: A meta-analysis and systematic review / J. Mo, E. Spackman, D.E. Swayne // *Vaccine*. – 2023. – Vol. 41. – № 38. – P. 5507-5517. DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.07.076.
346. Mogler, M.A. RNA-based viral vectors / M.A. Mogler, K.I. Kamrud // *Expert Review of Vaccines*. – 2015. – Vol. 14. – № 2. – P. 283-312. DOI: 10.1586/14760584.2015.979798.
347. Mohammadi, M. Identification of Six Novel Autophosphorylation Sites on Fibroblast Growth Factor Receptor 1 and Elucidation of Their Importance in Receptor Activation and Signal Transduction / M. Mohammadi, I. Dikic, A. Sorokin et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – Vol. 16. – № 3. – P. 977-989. DOI: 10.1128/MCB.16.3.977.
348. Moharam, I. Investigation of suspected Newcastle disease (ND) outbreaks in Egypt uncovers a high virus velogenic ND virus burden in small-scale holdings and the presence of multiple pathogens / I. Moharam, A.A.E. Razik, H. Sultan et al. // *Avian Pathology*. – 2019. – Vol. 48. – № 5. – P. 406-415. DOI: 10.1080/03079457.2019.1612852.
349. Molouki, A. NDV subgenotype VII(L) is currently circulating in commercial broiler farms of Iran, 2017–2018 / A. Molouki, M.H.F. Mehrabadi, M. Bashashati et al. // *Tropical Animal Health and Production*. – 2019. – Vol. 51. – № 5. – P. 1247-1252. DOI: 10.1007/s11250-019-01817-1.
350. Molouki, A. Correction to: Predominance of Fourth Panzootic Newcastle Disease Virus Subgenotype VII.1.1 in Iran and Its Relation to the Genotypes Circulating in the Region / A. Molouki, M. Soltani, M.H.F. Mehrabadi et al. // *Current Microbiology*. – 2021. – Vol. 78. – Correction to. – № 10. – P. 3812-3812. DOI: 10.1007/s00284-021-02619-1.
351. Morgan, R.W. Efficacy in Chickens of a Herpesvirus of Turkeys Recombinant Vaccine Containing the Fusion Gene of Newcastle Disease Virus: Onset of Protection and Effect of Maternal Antibodies / R.W. Morgan, J. Gelb, C.R. Pope, P.J.A. Sondermeijer // *Avian Diseases*. – 1993. – Vol. 37. – № 4. – P. 1032. DOI: 10.2307/1591910.
352. Morgan, R.W. Protection of Chickens from Newcastle and Marek's Diseases with a Recombinant Herpesvirus of Turkeys Vaccine Expressing the Newcastle Disease Virus Fusion Protein / R.W. Morgan, J. Gelb, C.S. Schreurs et al. // *Avian Diseases*. – 1992. – Vol. 36. – № 4. – P. 858. DOI: 10.2307/1591544.
353. Mossie T. A Compressive Review on Newcastle Disease Virus in Ethiopia. / Mossie T, Wondie D.A. // *Journal of Veterinary Science and Technology*. – 2022. – № 13. – P. 1-13.

354. Mostafa, A. Avian influenza A (H5N1) virus in dairy cattle: origin, evolution, and cross-species transmission / A. Mostafa, M.M. Naguib, A. Nogales et al. // *mBio*. – 2024. – Vol. 15. – Avian influenza A (H5N1) virus in dairy cattle. – № 12. – P. e02542-24. DOI: 10.1128/mbio.02542-24.
355. Mousa, M.R. Molecular and pathological characterisation of genotype VII Newcastle disease virus on Egyptian chicken farms during 2016–2018 / M.R. Mousa, F.F. Mohammed, A.H. El-deeb et al. // *Acta Veterinaria Hungarica*. – 2020. – Vol. 68. – № 2. – P. 221-230. DOI: 10.1556/004.2020.00027.
356. Moustapha, A. Newcastle Disease Virus in Poultry: Current Status and Control Prospects / A. Moustapha, E. Talaki, A. Akourki, M. Ousseini // *World's Veterinary Journal*. – 2023. – Vol. 13. – Newcastle Disease Virus in Poultry. – № 2. – P. 240-249. DOI: 10.54203/scil.2023.wvj26.
357. Murr, M. Protection of Chickens with Maternal Immunity Against Avian Influenza Virus (AIV) by Vaccination with a Novel Recombinant Newcastle Disease Virus Vector / M. Murr, C. Grund, A. Breithaupt et al. // *Avian Diseases*. – 2020. – Vol. 64. – № 4. – URL: <https://bioone.org/journals/avian-diseases/volume-64/issue-4/aviandiseases-D-20-00014/Protection-of-Chickens-with-Maternal-Immunity-Against-Avian-Influenza-Virus/10.1637/aviandiseases-D-20-00014.full> (date of access: 19.10.2025). – Текст: электронный.
358. Nayak, B. Avian paramyxovirus serotypes 2-9 (APMV-2-9) vary in the ability to induce protective immunity in chickens against challenge with virulent Newcastle disease virus (APMV-1) / B. Nayak, F.M. Dias, S. Kumar et al. // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – № 12. – P. 2220-2227. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.090.
359. Nayak, B. Immunization of Chickens with Newcastle Disease Virus Expressing H5 Hemagglutinin Protects against Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Viruses / B. Nayak, S.N. Rout, S. Kumar et al. // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4. – № 8. – P. e6509. DOI: 10.1371/journal.pone.0006509.
360. Nayak, D.P. Influenza virus morphogenesis and budding / D.P. Nayak, R.A. Balogun, H. Yamada et al. // *Virus Research*. – 2009. – Vol. 143. – № 2. – P. 147-161. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.05.010.
361. Neumann, G. Reverse Genetics of Influenza Viruses / G. Neumann, M. Ozawa, Y. Kawaoka // *Influenza Virus : Methods in Molecular Biology* / Y. Kawaoka, G. Neumann eds. . – Totowa, NJ : Humana Press, 2012. – Vol. 865. – P. 193-206. – URL: https://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-621-0_12 (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
362. Neumann, G. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs / G. Neumann, T. Watanabe, H. Ito et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96. – № 16. – P. 9345-9350. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9345.

363. Nielsen, S.S. Scientific Opinion on the assessment of the control measures of the category A diseases of Animal Health Law: Highly Pathogenic Avian Influenza / S.S. Nielsen, D.J. Bicout, P. Calistri et al. // *EFSA Journal*. – 2021. – Vol. 19. – Scientific Opinion on the assessment of the control measures of the category A diseases of Animal Health Law. – № 1. – URL: <https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6372> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
364. Ninyio, N.N. Virus-like Particle Vaccines: A Prospective Panacea Against an Avian Influenza Panzootic / N.N. Ninyio, K.L. Ho, A.R. Omar et al. // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – Virus-like Particle Vaccines. – № 4. – P. 694. DOI: 10.3390/vaccines8040694.
365. Norkin, L.C. Orthomyxoviruses / Norkin, L.C. // *Virology. Molecular biology and pathogenesis*. – Washington DC, USA, 2010. – P. 296-345.
366. Nunes J. E. S. Comparative morphometric analysis of vaccinal virulence of some lentogenic strains of Newcastle disease virus in tracheas of SPF chickens / Nunes J. E. S., Vasconcelos A.C., Jorge M. A. et al. // *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. – 2002. – Vol. 54. – P. 335-339.
367. Nurzijah, I. Development of Plant-Based Vaccines for Prevention of Avian Influenza and Newcastle Disease in Poultry / I. Nurzijah, O.A. Elbohy, K. Kanyuka et al. // *Vaccines*. – 2022. – Vol. 10. – № 3. – P. 478. DOI: 10.3390/vaccines10030478.
368. Okamoto, S. Intranasal Immunization with a Formalin-Inactivated Human Influenza A Virus Whole-Virion Vaccine Alone and Intranasal Immunization with a Split-Virion Vaccine with Mucosal Adjuvants Show Similar Levels of Cross-Protection / S. Okamoto, S. Matsuoka, N. Takenaka et al. // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2012. – Vol. 19. – № 7. – P. 979-990. DOI: 10.1128/CVI.00016-12.
369. Onyango Aila, F. Validating Biosecurity Principles for Indigenous Chicken Scale / F. Onyango Aila, I. Ochieng, D. Oima // *Universal Journal of Management*. – 2013. – Vol. 1. – № 1. – P. 22-31. DOI: 10.13189/ujm.2013.010104.
370. Palya, V. Efficacy of a Turkey Herpesvirus Vectored Newcastle Disease Vaccine against Genotype VII.1.1 Virus: Challenge Route Affects Shedding Pattern / V. Palya, T. Tatár-Kis, A.S.A. Arafa et al. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9. – Efficacy of a Turkey Herpesvirus Vectored Newcastle Disease Vaccine against Genotype VII.1.1 Virus. – № 1. – P. 37. DOI: 10.3390/vaccines9010037.
371. Palya, V. Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers / V. Palya, T. Tatár-Kis, T. Mató et al. // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. – 2014. – Vol. 158. – № 1-2. – P. 105-115. DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.11.008.
372. Palya, V. Efficacy of a Recombinant Turkey Herpesvirus AI (H5) Vaccine in Preventing Transmission of Heterologous Highly Pathogenic H5N8 Clade 2.3.4.4b Challenge Virus in Commercial Broilers and Layer Pullets / V. Palya, T. Tatár-Kis, E.

Walkóné Kovács et al. // Journal of Immunology Research. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-14. DOI: 10.1155/2018/3143189.

373. Pandarangga, P. Pathogenesis of New Strains of Newcastle Disease Virus From Israel and Pakistan / P. Pandarangga, C.C. Brown, P.J. Miller et al. // Veterinary Pathology. – 2016. – Vol. 53. – № 4. – P. 792-796. DOI: 10.1177/0300985815622972.

374. Pandarangga, P. mRNA Profiling and Transcriptomics Analysis of Chickens Received Newcastle Disease Virus Genotype II and Genotype VII Vaccines / P. Pandarangga, P.T.K. Doan, R. Tearle et al. // Pathogens. – 2024. – Vol. 13. – № 8. – P. 638. DOI: 10.3390/pathogens13080638.

375. Pandarangga, P. Performance comparison of homologous and heterologous Newcastle disease virus in vaccines and antibody tests / P. Pandarangga, M.M. McAllister, A.E. Peaston et al. // Research in Veterinary Science. – 2022. – Vol. 149. – P. 82-89. DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.06.014.

376. Pantin-Jackwood, M.J. Efficacy of a Recombinant Turkey Herpesvirus H5 Vaccine Against Challenge With H5N1 Clades 1.1.2 and 2.3.2.1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Domestic Ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*) / M.J. Pantin-Jackwood, D.R. Kapczynski, E. DeJesus et al. // Avian Diseases. – 2016. – Vol. 60. – № 1. – P. 22-32. DOI: 10.1637/11282-091615-Reg.1.

377. Pantin-Jackwood, M.J. Vaccination of domestic ducks against H5N1 HPAI: A review / M.J. Pantin-Jackwood, D.L. Suarez // Virus Research. – 2013. – Vol. 178. – Vaccination of domestic ducks against H5N1 HPAI. – № 1. – P. 21-34. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.07.012.

378. Park, M.-S. Engineered viral vaccine constructs with dual specificity: Avian influenza and Newcastle disease / M.-S. Park, J. Steel, A. García-Sastre et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 103. – Engineered viral vaccine constructs with dual specificity. – № 21. – P. 8203-8208. DOI: 10.1073/pnas.0602566103.

379. Peacock, T.P. The global H5N1 influenza panzootic in mammals / T.P. Peacock, L. Moncla, G. Dudas et al. // Nature. – 2025. – Vol. 637. – № 8045. – P. 304-313. DOI: 10.1038/s41586-024-08054-z.

380. Pekar, J.E. Timing and molecular characterisation of the transmission to cattle of H5N1 influenza A virus genotype D1.1, clade 2.3.4.4b / J.E. Pekar, T.P. Peacock, L. Moncla et al. – 2025. – URL: <https://virological.org/t/timing-and-molecular-characterisation-of-the-transmission-to-cattle-of-h5n1-influenza-a-virus-genotype-d1-1-clade-2-3-4-4b/991>. – Текст: электронный.

381. Permin, A. Improvement of management and biosecurity practices in smallholder producers / A. Permin, A. Detmer // Food and Agricultural Organization of the United Nations. – Rome, 2007.

382. Peroso, F. The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis / F. Peroso, P. Villegas, R. Dolz et al. // *Avian Pathology*. – 2008. – Vol. 37. – № 3. – P. 237-245. DOI: 10.1080/03079450802043734.
383. Perozo, F. Biological and Phylogenetic Characterization of a Genotype VII Newcastle Disease Virus from Venezuela: Efficacy of Field Vaccination / F. Perozo, R. Marcano, C.L. Afonso // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50. – № 4. – P. 1204-1208. DOI: 10.1128/JCM.06506-11.
384. Perozo F. Evaluation of two vaccination programs against Newcastle disease in ross line broiler chickens reared under field conditions in Zulia State, Venezuela. 1. Productive parameters and posvaccine reaction / Perozo F., Nava J., Rivera S. et al. // *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*. – 2004. – № 14(5). – P. 387-394.
385. Perozo, F. Genomic comparison of the complete coding and intergenic regions of the VG/GA Newcastle disease virus and its respirotropic clone 5 / F. Perozo, P. Villegas, C.L. Afonso // *Virus Genes*. – 2008. – Vol. 37. – № 2. – P. 161-167. DOI: 10.1007/s11262-008-0249-6.
386. Peyre, M. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience / M. Peyre, G. Fusheng, S. Desvaux, F. Roger // *Epidemiology and Infection*. – 2009. – Vol. 137. – № 1. – P. 1-21. DOI: 10.1017/S0950268808001039.
387. Placidi, L. Human infection by the Newcastle virus / L. Placidi, J. Santucci, J. Haag // *Maroc Medical*. – 1952. – Vol. 31. – № 321. – P. 120-122.
388. Poetri, O.N. Different cross protection scopes of two avian influenza H5N1 vaccines against infection of layer chickens with a heterologous highly pathogenic virus / O.N. Poetri, M. Van Boven, G. Koch et al. // *Research in Veterinary Science*. – 2017. – Vol. 114. – P. 143-152. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.04.005.
389. PoultryMed. First Death from H5N5 Avian Influenza // 22 November, 2025. – URL: <https://www.poultrymed.com/Poultrymed/Templates/showpage.asp?DBID=1 & LNGID=1 & TMID=178 & FID=9061 & PID=0 & IID=94812>. – Текст: электронный.
390. PoultryMed. Genomic epidemiology of 2024 H5N1 outbreak in US cattle: Preliminary report // PoultryMed. – 2024. – URL: <https://www.poultrymed.com/Poultrymed/Templates/showpage.asp?DBID=1 & LNGID=1 & TMID=178 & FID=9025 & PID=0 & IID=89896>. – Текст: электронный.
391. PoultryMed. Over 700 HPAI Outbreaks Reported in European Commercial Farms in 2025 // PoultryMed. – 2026. – URL: <https://www.poultrymed.com/Poultrymed/Templates/showpage.asp?DBID=1 & LNGID=1 & TMID=178 & FID=12100 & PID=0 & IID=95821>. – Текст: электронный.

392. Prel, A. Achievement of avian influenza virus-like particles that could be used as a subunit vaccine against low-pathogenic avian influenza strains in ducks / A. Prel, G. Le Gall-Reculé, V. Jestin // *Avian Pathology*. – 2008. – Vol. 37. – № 5. – P. 513-520. DOI: 10.1080/03079450802357001.
393. Pulit-Penaloza, J.A. Transmission of a human isolate of clade 2.3.4.4b A(H5N1) virus in ferrets / J.A. Pulit-Penaloza, J.A. Belser, N. Brock et al. // *Nature*. – 2024. – Vol. 636. – № 8043. – P. 705-710. DOI: 10.1038/s41586-024-08246-7.
394. Pulit-Penaloza, J.A. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus of clade 2.3.4.4b isolated from a human case in Chile causes fatal disease and transmits between co-housed ferrets / J.A. Pulit-Penaloza, N. Brock, J.A. Belser et al. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2024. – Vol. 13. – № 1. – P. 2332667. DOI: 10.1080/22221751.2024.2332667.
395. Qiao, C. Development of a recombinant fowlpox virus vector-based vaccine of H5N1 subtype avian influenza / C. Qiao, K. Yu, Y. Jiang et al. // *Developments in Biologicals*. – 2006. – Vol. 124. – P. 127-132.
396. Qiao, C. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes / C. Qiao, K. Yu, Y. Jiang et al. // *Avian Pathology*. – 2003. – Vol. 32. – № 1. – P. 25-31. DOI: 10.1080/0307945021000070688.
397. Qiao, Y. H5N1 influenza virus-like particles based on BEVS induce robust functional antibodies and immune responses / Y. Qiao, M. Tang, M. Du et al. // *Virology*. – 2025. – Vol. 612. – P. 110672. DOI: 10.1016/j.virol.2025.110672.
398. Qin, Z.-M. Pathotypical Characterization and Molecular Epidemiology of Newcastle Disease Virus Isolates from Different Hosts in China from 1996 to 2005 / Z.-M. Qin, L.-T. Tan, H.-Y. Xu et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2008. – Vol. 46. – № 2. – P. 601-611. DOI: 10.1128/JCM.01356-07.
399. Qiu, X. Phylogenetic, antigenic and biological characterization of pigeon paramyxovirus type 1 circulating in China / X. Qiu, C. Meng, Y. Zhan et al. // *Virology Journal*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 186. DOI: 10.1186/s12985-017-0857-7.
400. Qiu, X. Full-length genome analysis of two genotype III velogenic Newcastle diseases virus strains reveals their close relationship with vaccine Mukteswar / X. Qiu, Q. Sun, C. Yao et al. // *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica*. – 2009. – Vol. 49. – № 3. – P. 302-308.
401. Rajab, M.K. Comparison of HVT-ND recombinant and convection-based Newcastle disease vaccination programs in the protection against the genotype VII NDV challenges: an experimental study / M.K. Rajab, M.H.B. Fard, A. Ghalyanchilangeroudi et al. // *Virus Genes*. – 2024. – Vol. 60. – № 2. – P. 126-133. DOI: 10.1007/s11262-023-02038-3.

402. Raji, A.A. Virus-like particles in poultry disease: an approach to effective and safe vaccination / A.A. Raji, P.Z. Dastjerdi, A.R. Omar // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2024. – Vol. 11. – P. 1405605. DOI: 10.3389/fvets.2024.1405605.
403. Ramey, A.M. Assessment of contemporary genetic diversity and inter-taxa/inter-region exchange of avian paramyxovirus serotype 1 in wild birds sampled in North America / A.M. Ramey, I.V. Goraichuk, J.T. Hicks et al. // *Virology Journal*. – 2017. – Vol. 14. – № 1. – P. 43. DOI: 10.1186/s12985-017-0714-8.
404. Rauf, I. Immunoprotective role of LaSota vaccine under immunosuppressive conditions in chicken challenged with velogenic avian avulavirus-1 / I. Rauf, A. Wajid, I. Hussain et al. // *Tropical Animal Health and Production*. – 2019. – Vol. 51. – № 6. – P. 1357-1365. DOI: 10.1007/s11250-019-01814-4.
405. Rauw, F. Efficacy of rHVT-AI Vector Vaccine in Broilers with Passive Immunity Against Challenge with Two Antigenically Divergent Egyptian Clade 2.2.1 HPAI H5N1 Strains / F. Rauw, V. Palya, Y. Gardin et al. // *Avian Diseases*. – 2012. – Vol. 56. – № 4s1. – P. 913-922. DOI: 10.1637/10172-041012-Reg.1.
406. Ravikumar, R. Vaccines against Major Poultry Viral Diseases: Strategies to Improve the Breadth and Protective Efficacy / R. Ravikumar, J. Chan, M. Prabakaran // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 6. – P. 1195. DOI: 10.3390/v14061195.
407. Reemers, S. A broad spectrum HVT-H5 avian influenza vector vaccine which induces a rapid onset of immunity / S. Reemers, I. Versteegen, S. Basten et al. // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39. – № 7. – P. 1072-1079. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.01.018.
408. Regmi, S. Clinicopathological and Molecular Investigation of Newcastle Disease Outbreaks in Vaccinated and Non-Vaccinated Broiler Chicken Flocks in Nepal / S. Regmi, R. Bhatta, P. Pal et al. // *Animals*. – 2024. – Vol. 14. – № 16. – P. 2423. DOI: 10.3390/ani14162423.
409. Rehmani, S.F. Presence of Virulent Newcastle Disease Virus in Vaccinated Chickens in Farms in Pakistan / S.F. Rehmani, A. Wajid, T. Bibi et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – Vol. 53. – № 5. – P. 1715-1718. DOI: 10.1128/JCM.02818-14.
410. Rohaim, M.A. Evolutionary Trajectories of Avian Avulaviruses and Vaccines Compatibilities in Poultry / M.A. Rohaim, M.Q. Al-Natour, R.F. El Naggar et al. // *Vaccines*. – 2022. – Vol. 10. – № 11. – P. 1862. DOI: 10.3390/vaccines10111862.
411. Romanutti, C. Current status of virus-vectored vaccines against pathogens that affect poultry / C. Romanutti, L. Keller, F.A. Zanetti // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38. – № 45. – P. 6990-7001. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.09.013.
412. Roohani, K. Characterisation of genotype VII Newcastle disease virus (NDV) isolated from NDV vaccinated chickens, and the efficacy of LaSota and recombinant

genotype VII vaccines against challenge with velogenic NDV / K. Roohani, S.W. Tan, S.K. Yeap et al. // *Journal of Veterinary Science*. – 2015. – Vol. 16. – № 4. – P. 447. DOI: 10.4142/jvs.2015.16.4.447.

413. Ross, C.S. Game Birds Can Act as Intermediaries of Virulent Genotype VII Avian Orthoavulavirus-1 between Wild Birds and Domestic Poultry / C.S. Ross, P. Skinner, D. Sutton et al. // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 536. DOI: 10.3390/v15020536.

414. Ross, K.F. Autonomous immunity in mucosal epithelial cells: fortifying the barrier against infection / K.F. Ross, M.C. Herzberg // *Microbes and Infection*. – 2016. – Vol. 18. – № 6. – P. 387-398. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.03.008.

415. Rtishchev, A. An Outbreak of Newcastle Disease Virus in the Moscow Region in the Summer of 2022 / A. Rtishchev, A. Treshchalina, E. Shustova et al. // *Veterinary Sciences*. – 2023. – Vol. 10. – № 6. – P. 404. DOI: 10.3390/vetsci10060404.

416. Ruan, B. Generation and evaluation of a vaccine candidate of attenuated and heat-resistant genotype VIII Newcastle disease virus / B. Ruan, Q. Liu, Y. Chen et al. // *Poultry Science*. – 2020. – Vol. 99. – № 7. – P. 3437-3444. DOI: 10.1016/j.psj.2020.01.034.

417. Sabouri, F. Characterization of a novel VIII sub-genotype of Newcastle disease virus circulating in Iran / F. Sabouri, M. Vasfi Marandi, M. Bashashati // *Avian Pathology*. – 2018. – Vol. 47. – № 1. – P. 90-99. DOI: 10.1080/03079457.2017.1376735.

418. Said, M. Efficacy of Bivalent Inactivated Vaccine Containing Insect Cell–Expressed Avian Influenza H5 and Egg-Based Newcastle Disease Virus (NDV) Against Dual Infection with Highly Pathogenic H5N1 and Velogenic NDV in Chickens / M. Said, M.A. Soliman, S. Mousa et al. // *Avian Diseases*. – 2019. – Vol. 63. – № 3. – P. 474. DOI: 10.1637/12017-122618-Reg.1.

419. Samad, A. Newcastle Disease in Poultry, its diagnosis, prevention and Control Strategies / A. Samad, M. Hamza, A. Muazzam et al. // *International Journal of Medical, Pharmacy and Drug Research*. – 2022. – Vol. 6. – № 2. – P. 25-28. DOI: 10.22161/ijmpd.6.2.3.

420. Sarfati-Mizrahi, D. Protective Dose of a Recombinant Newcastle Disease LaSota–Avian Influenza Virus H5 Vaccine Against H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and Velogenic Viscerotropic Newcastle Disease Virus in Broilers with High Maternal Antibody Levels / D. Sarfati-Mizrahi, B. Lozano-Dubernard, E. Soto-Priante et al. // *Avian Diseases*. – 2010. – Vol. 54. – № s1. – P. 239-241. DOI: 10.1637/8735-032509-Reg.1.

421. Savill, N.J. Silent spread of H5N1 in vaccinated poultry / N.J. Savill, S.G. St Rose, M.J. Keeling, M.E.J. Woolhouse // *Nature*. – 2006. – Vol. 442. – № 7104. – P. 757-757. DOI: 10.1038/442757a.

422. Seal, B.S. The avian response to Newcastle disease virus / B.S. Seal, D.J. King, H.S. Sellers // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2000. – Vol. 24. – № 2-3. – P. 257-268. DOI: 10.1016/S0145-305X(99)00077-4.
423. Sedeik, M.E. Comparative efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines against Newcastle disease virus genotype VII in broiler chickens / M.E. Sedeik, A.R. Elbestawy, N.A. El-shall et al. // *Poultry Science*. – 2019. – Vol. 98. – № 5. – P. 2000-2007. DOI: 10.3382/ps/pey559.
424. Sergeeva, M. H5N1 influenza vaccine quality is affected by hemagglutinin conformational stability / M. Sergeeva, A. Krokhin, M. Matrosovich et al. // *Microbiology Independent Research Journal (MIR Journal)*. – 2014. – Vol. 1. – № 1. – URL: <https://scienceopen.com/hosted-document?doi=10.18527/2500-2236-2014-1-1-12-26> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
425. Shabbir, M.Z. Genomic Diversity and Evolutionary Insights of Avian Paramyxovirus-1 in Avian Populations in Pakistan / M.Z. Shabbir, S. Mahmood, A. Ul-Rahman et al. // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16. – № 9. – P. 1414. DOI: 10.3390/v16091414.
426. Shahr, E. Newcastle disease virus: is an updated attenuated vaccine needed? / E. Shahr, R. Haddas, D. Goldenberg et al. // *Avian Pathology*. – 2018. – Vol. 47. – Newcastle disease virus. – № 5. – P. 467-478. DOI: 10.1080/03079457.2018.1488240.
427. Shahid Mahmood, M. Thermostable vaccines for Newcastle disease: a review / M. Shahid Mahmood, F. Siddique, I. Hussain et al. // *World's Poultry Science Journal*. – 2014. – Vol. 70. – № 4. – P. 829-838. DOI: 10.1017/S0043933914000889.
428. Shahid, N. Early Stage Development of a Newcastle Disease Vaccine Candidate in Corn / N. Shahid, T.R. Samiullah, S. Shakoor et al. // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – Vol. 7. – P. 499. DOI: 10.3389/fvets.2020.00499.
429. Shahsavandi, S. The predominance of Newcastle disease virus genotype VII: genome diversity or poor cross-immunity of non-matched vaccines / S. Shahsavandi, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, M.M. Ebrahimi et al. // *Vaccine Research*. – 2021. – Vol. 8. – № 2. – P. 4-16. DOI: 10.52547/vacres.8.2.4.
430. Shi, B. Long-Term Protection against Virulent Newcastle Disease Virus (NDV) in Chickens Immunized with a Single Dose of Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing NDV F Protein / B. Shi, G. Yang, Y. Xiao et al. // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12. – № 6. – P. 604. DOI: 10.3390/vaccines12060604.
431. Shi, J. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies / J. Shi, X. Zeng, P. Cui et al. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 2155072. DOI: 10.1080/22221751.2022.2155072.

432. Shichinohe, S. Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against a challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza viruses in chickens / S. Shichinohe, M. Okamatsu, N. Yamamoto et al. // *Veterinary Microbiology*. – 2013. – Vol. 164. – № 1-2. – P. 39-45. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.01.041.
433. Shortridge, K.F. Characterization of Avian H5N1 Influenza Viruses from Poultry in Hong Kong / K.F. Shortridge, N.N. Zhou, Y. Guan et al. // *Virology*. – 1998. – Vol. 252. – № 2. – P. 331-342. DOI: 10.1006/viro.1998.9488.
434. Simancas-Racines, A. H5N1 Avian Influenza: A Narrative Review of Scientific Advances and Global Policy Challenges / A. Simancas-Racines, C. Reytor-González, M. Toral, D. Simancas-Racines // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17. – № 7. – P. 927. DOI: 10.3390/v17070927.
435. Sims, L.D. Avian influenza: past, present and future: -EN- Avian influenza: past, present and future -FR- Influenza aviaire : passé, présent et futur -ES- Influenza aviar: pasado, presente y futuro / L.D. Sims // *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. – 2024. – Vol. Special Edition. – P. 83-88. DOI: 10.20506/rst.SE.3562.
436. Śmietanka, K. A Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing F and HN Genes of Avian Avulavirus-1 (AAvV-1) Genotype VI Confers Cross-Protection against Challenge with Virulent AAvV-1 Genotypes IV and VII in Chickens / K. Śmietanka, J. Tyborowska, M. Olszewska-Tomczyk et al. // *Viruses*. – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 784. DOI: 10.3390/v11090784.
437. Sondermeijer, P.J.A. Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens / P.J.A. Sondermeijer, J.A.J. Claessens, P.E. Jenniskens et al. // *Vaccine*. – 1993. – Vol. 11. – № 3. – P. 349-358. DOI: 10.1016/0264-410X(93)90198-7.
438. SOP: VI.437 Edition 12. The Intravenous Pathogenicity Index Test for Avian Influenza. / WOAHP. – 2020. – URL: https://science.vla.gov.uk/flu-lab-net/Documents/english/protocol_IntravenousPathogenicity.pdf– Текст: электронный.
439. SOP: VI.438 Edition 10 (07.02.2019)ion 10. Newcastle Disease Virus: The Intracerebral Pathogenicity (ICPI) Test for Newcastle Disease Virus (NDV). / WOAHP – 2019. – URL: https://science.vla.gov.uk/flu-lab-net/Documents/english/protocol_IntracerebralPathogenicity.pdf. – Текст: электронный.
440. Sorrell, E.M. Adaptation of Influenza A/Mallard/Potsdam/178-4/83 H2N2 Virus in Japanese Quail Leads to Infection and Transmission in Chickens / E.M. Sorrell, D.R. Perez // *Avian Diseases*. – 2007. – Vol. 51. – № s1. – P. 264-268. DOI: 10.1637/7538-032906R.1.
441. Spackman, E. Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology / E. Spackman, D.E. Swayne //

Virus Research. – 2013. – Vol. 178.– № 1. – P. 121-132. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.03.004.

442. Spickler, A.R. The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses / A.R. Spickler, D.W. Trampel, J.A. Roth // Avian Pathology. – 2008. – Vol. 37. – № 6. – P. 555-577. DOI: 10.1080/03079450802499118.

443. Steel, J. Live Attenuated Influenza Viruses Containing NS1 Truncations as Vaccine Candidates against H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza / J. Steel, A.C. Lowen, L. Pena et al. // Journal of Virology. – 2009. – Vol. 83. – № 4. – P. 1742-1753. DOI: 10.1128/JVI.01920-08.

444. Steensels, M. Prime–boost vaccination with a fowlpox vector and an inactivated avian influenza vaccine is highly immunogenic in Pekin ducks challenged with Asian H5N1 HPAI / M. Steensels, M. Bublot, S. Van Borm et al. // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – № 5. – P. 646-654. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.11.044.

445. Steensels, M. Protection Afforded by a Recombinant Turkey Herpesvirus-H5 Vaccine Against the 2014 European Highly Pathogenic H5N8 Avian Influenza Strain / M. Steensels, F. Rauw, Th. Van Den Berg et al. // Avian Diseases. – 2016. – Vol. 60. – № 1s. – P. 202-209. DOI: 10.1637/11126-050615-Reg.1.

446. Steensels, M. Protective efficacy of classical vaccines and vaccination protocols against an exotic Newcastle disease virus genotype VII.2 in Belgian layer and broiler chickens / M. Steensels, C. Soldan, F. Rauw et al. // Poultry Science. – 2025. – Vol. 104. – № 1. – P. 104604. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104604.

447. Steensels, M. Efficacy of an Inactivated and a Fowlpox-Vectored Vaccine in Muscovy Ducks Against an Asian H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viral Challenge / M. Steensels, S. Van Borm, B. Lambrecht et al. // Avian Diseases. – 2007. – Vol. 51. – № s1. – P. 325-331. DOI: 10.1637/7628-042806R.1.

448. Steensels, M. Molecular and virological characterization of the first poultry outbreaks of Genotype VII.2 velogenic avian orthoavulavirus type 1 (NDV) in North-West Europe, BeNeLux, 2018 / M. Steensels, S. Van Borm, I. Mertens et al. // Transboundary and Emerging Diseases. – 2021. – Vol. 68. – № 4. – P. 2147-2160. DOI: 10.1111/tbed.13863.

449. Steglich, C. Chimeric Newcastle Disease Virus Protects Chickens against Avian Influenza in the Presence of Maternally Derived NDV Immunity / C. Steglich, C. Grund, K. Ramp et al. // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 9. – P. e72530. DOI: 10.1371/journal.pone.0072530.

450. Steinhauer, D.A. Rapid Evolution of RNA Viruses / D.A. Steinhauer, J.J. Holland // Annual Review of Microbiology. – 1987. – Vol. 41. – № 1. – P. 409-431. DOI: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002205.

451. Stettler, M. RNA replicon vaccination confers long-lasting protection against H5N1 avian influenza in 23 zoo bird species / M. Stettler, S. Hoby, C. Wenker et al. // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16. – № 1. – P. 9245. DOI: 10.1038/s41467-025-64301-5.
452. Stone, H.D. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza / H.D. Stone // *Avian Diseases*. – 1993. – Vol. 37. – № 2. – P. 399-405.
453. Stone, H.D. Efficacy of oil-emulsion vaccines prepared with pigeon paramyxovirus-1, Ulster, and La Sota Newcastle disease viruses / H.D. Stone // *Avian Diseases*. – 1989. – Vol. 33. – № 1. – P. 157-162.
454. Suarez, D. Immunology of avian influenza virus: a review / D. Suarez // *Developmental & Comparative Immunology*. – 2000. – Vol. 24. – Immunology of avian influenza virus. – № 2-3. – P. 269-283. DOI: 10.1016/S0145-305X(99)00078-6.
455. Suarez, D.L. DIVA Vaccination Strategies for Avian Influenza Virus / D.L. Suarez // *Avian Diseases*. – 2012. – Vol. 56. – № 4s1. – P. 836-844. DOI: 10.1637/10207-041512-Review.1.
456. Suarez, D.L. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections / D.L. Suarez, P.J. Miller, G. Koch et al. // *Diseases of Poultry* / D.E. Swayne et al. eds. – Wiley, 2020. – P. 109-166. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119371199.ch3> (date of access: 17.10.2025). – Текст: электронный.
457. Suarez, D.L. Overview of avian influenza DIVA test strategies / D.L. Suarez // *Biologicals*. – 2005. – Vol. 33. – № 4. – P. 221-226. DOI: 10.1016/j.biologicals.2005.08.003.
458. Suarez, D.L. Recombinant viral-vectored vaccines for the control of avian influenza in poultry / D.L. Suarez, M.J. Pantin-Jackwood // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 206. – P. 144-151. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.11.025.
459. Sultan, H.A. Efficacy of the Newcastle Disease Virus Genotype VII.1.1-Matched Vaccines in Commercial Broilers / H.A. Sultan, W.K. Elfeil, A.A. Nour et al. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 10. – № 1. – P. 29. DOI: 10.3390/vaccines10010029.
460. Sultan, H.A. Protective efficacy of the Newcastle disease virus genotype VII-matched vaccine in commercial layers / H.A. Sultan, S. Talaat, W.K. Elfeil et al. // *Poultry Science*. – 2020. – Vol. 99. – № 3. – P. 1275-1286. DOI: 10.1016/j.psj.2019.10.063.
461. Susta, L. Pathologic Characterization of Genotypes XIV and XVII Newcastle Disease Viruses and Efficacy of Classical Vaccination on Specific Pathogen-Free Birds / L. Susta, M.E.B. Jones, G. Cattoli et al. // *Veterinary Pathology*. – 2015. – Vol. 52. – № 1. – P. 120-131. DOI: 10.1177/0300985814521247.

462. Swayne, D.E. Avian influenza / D.E. Swayne. – Blackwell Pub., 2008. – 605 p.
463. Swayne, D.E. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines / D.E. Swayne, J.R. Beck, M. Garcia, H.D. Stone // Avian Pathology. – 1999. – Vol. 28. – № 3. – P. 245-255. DOI: 10.1080/03079459994731.
464. Swayne, D.E. Failure of a Recombinant Fowl Poxvirus Vaccine Containing an Avian Influenza Hemagglutinin Gene to Provide Consistent Protection against Influenza in Chickens Preimmunized with a Fowl Pox Vaccine / D.E. Swayne, J.R. Beck, N. Kinney // Avian Diseases. – 2000. – Vol. 44. – № 1. – P. 132. DOI: 10.2307/1592516.
465. Swayne, D.E. Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus / D.E. Swayne, J.R. Beck, T.R. Mickle // Avian Diseases. – 1997. – Vol. 41. – № 4. – P. 910-922.
466. Swayne, D.E. Impact of Vaccines and Vaccination on Global Control of Avian Influenza / D.E. Swayne // Avian Diseases. – 2012. – Vol. 56. – № 4s1. – P. 818-828. DOI: 10.1637/10183-041012-Review.1.
467. Swayne, D.E. Vaccines, Vaccination, and Immunology for Avian Influenza Viruses in Poultry / D.E. Swayne, D.R. Kapczynski // Avian Influenza / D.E. Swayne ed. – Wiley, 2008. – P. 407-451. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780813818634.ch19> (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
468. Swayne, D.E. Laboratory Methods for Assessing and Licensing Influenza Vaccines for Poultry / D.E. Swayne // Animal Influenza Virus : Methods in Molecular Biology / E. Spackman ed. . – New York, NY : Springer US, 2020. – Vol. 2123. – P. 211-225. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-0346-8_16 (date of access: 12.10.2025). – Текст: электронный.
469. Swayne, D.E. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus / D.E. Swayne, C.-W. Lee, E. Spackman // Avian Pathology. – 2006. – Vol. 35. – № 2. – P. 141-146. DOI: 10.1080/03079450600597956.
470. Swayne, D.E. Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and lowpathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination / D.E. Swayne, G. Pavade, K. Hamilton et al. // Revue Scientifique et Technique de l'OIE. – 2011. – Vol. 30. – № 3. – P. 839-870. DOI: 10.20506/rst.30.3.2081.
471. Swayne, D.E. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert / D.E. Swayne // Vaccine. – 2000. – Vol. 18. – № 11-12. – P. 1088-1095. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00369-2.

472. Swayne, D.E. Avian influenza / D.E. Swayne, Sims L. // *Veterinary vaccines : principles and applications*. – Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2020. – P. 229-251.
473. Swayne, D.E. Technical Item. Strategic challenges in the global control of high pathogenicity avian influenza. / D.E. Swayne, Sims L., Brown I. et al. – WOAHA, 2023. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2023/05/a-90sg-8.pdf> – Текст: электронный.
474. Swayne, D.E. Strategic challenges in the global control of high pathogenicity avian influenza / D.E. Swayne, L.D. Sims, I. Brown et al. // *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. – 2024. – Vol. Special Edition. – P. 89-102. DOI: 10.20506/rst.SE.3563.
475. Swayne, D.E. Recombinant Paramyxovirus Type 1-Avian Influenza-H7 Virus as a Vaccine for Protection of Chickens Against Influenza and Newcastle Disease / D.E. Swayne, D.L. Suarez, S. Schultz-Cherry et al. // *Avian Diseases*. – 2003. – Vol. 47. – № s3. – P. 1047-1050. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.1047.
476. Swayne, D.E. Antibody Titer Has Positive Predictive Value for Vaccine Protection against Challenge with Natural Antigenic-Drift Variants of H5N1 High-Pathogenicity Avian Influenza Viruses from Indonesia / D.E. Swayne, D.L. Suarez, E. Spackman et al. // *Journal of Virology*. – 2015. – Vol. 89. – № 7. – P. 3746-3762. DOI: 10.1128/JVI.00025-15.
477. Swayne, D.E. Vaccines for List A poultry diseases: emphasis on avian influenza / D.E. Swayne // *Developments in Biologicals*. – 2003. – Vol. 114. – Vaccines for List A poultry diseases. – P. 201-212.
478. Takada, A. Protective immune response of chickens against Newcastle disease, induced by the intranasal vaccination with inactivated virus / A. Takada, H. Kida // *Veterinary Microbiology*. – 1996. – Vol. 50. – № 1-2. – P. 17-25. DOI: 10.1016/0378-1135(96)00004-1.
479. Tamura, S. Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines / S. Tamura, T. Tanimoto, T. Kurata // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2005. – Vol. 58. – № 4. – P. 195-207.
480. Tang, N. A simple and rapid approach to develop recombinant avian herpesvirus vectored vaccines using CRISPR/Cas9 system / N. Tang, Y. Zhang, M. Pedrera et al. // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36. – № 5. – P. 716-722. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.12.025.
481. Tang, N. Generation of A Triple Insert Live Avian Herpesvirus Vectored Vaccine Using CRISPR/Cas9-Based Gene Editing / N. Tang, Y. Zhang, Y. Sadigh et al. // *Vaccines*. – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. 97. DOI: 10.3390/vaccines8010097.
482. Taylor, J. Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens / J. Taylor, C. Edbauer, A. Rey-Senelongue et

- al. // *Journal of Virology*. – 1990. – Vol. 64. – № 4. – P. 1441-1450. DOI: 10.1128/jvi.64.4.1441-1450.1990.
483. Taylor, J. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant / J. Taylor, R. Weinberg, Y. Kawaoka et al. // *Vaccine*. – 1988. – Vol. 6. – № 6. – P. 504-508. DOI: 10.1016/0264-410X(88)90101-6.
484. Taylor, T.L. Repeated Challenge with Virulent Newcastle Disease Virus Does Not Decrease the Efficacy of Vaccines / T.L. Taylor, P.J. Miller, T.L. Olivier et al. // *Avian Diseases*. – 2017. – Vol. 61. – № 2. – P. 245-249. DOI: 10.1637/11555-120816-ResNote.1.
485. Thornton, D.H. Potency of live newcastle disease vaccines / D.H. Thornton, I.G. Hopkins, C.N. Hebert // *Avian Pathology*. – 1980. – Vol. 9. – № 3. – P. 457-464. DOI: 10.1080/03079458008418429.
486. Tian, J. H5 low pathogenic avian influenza viruses maintained in wild birds in China / J. Tian, M. Li, X. Bai et al. // *Veterinary Microbiology*. – 2021. – Vol. 263. – P. 109268. DOI: 10.1016/j.vetmic.2021.109268.
487. Tong, S. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al. // *PLoS Pathogens*. – 2013. – Vol. 9. – № 10. – P. e1003657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003657.
488. Tran, T.H.G. Detection and molecular characterization of virulent Newcastle disease virus (subgenotype VII.2) in broiler chickens in Northern Vietnam / T.H.G. Tran, V.H. Dong, V.T. Le et al. // *Veterinary World*. – 2023. – P. 2086-2095. DOI: 10.14202/vetworld.2023.2086-2095.
489. Tseng, L.-P. The influence of liposomal adjuvant on intranasal vaccination of chickens against Newcastle disease / L.-P. Tseng, H.-J. Liang, M.-C. Deng et al. // *The Veterinary Journal*. – 2010. – Vol. 185. – № 2. – P. 204-210. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.05.019.
490. Tumpey, T.M. Diagnostic Approach for Differentiating Infected from Vaccinated Poultry on the Basis of Antibodies to NS1, the Nonstructural Protein of Influenza A Virus / T.M. Tumpey, R. Alvarez, D.E. Swayne, D.L. Suarez // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – Vol. 43. – № 2. – P. 676-683. DOI: 10.1128/JCM.43.2.676-683.2005.
491. Turan, N. Identification of Newcastle disease virus subgenotype VII.2 in wild birds in Turkey / N. Turan, C. Ozsemir, A. Yilmaz et al. // *BMC Veterinary Research*. – 2020. – Vol. 16. – № 1. – P. 277. DOI: 10.1186/s12917-020-02503-3.
492. Uchida, Y. Application of Reverse Genetics for Producing Attenuated Vaccine Strains against Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses / Y. Uchida, N. Takemae, T.

Saito // Journal of Veterinary Medical Science. – 2014. – Vol. 76. – № 8. – P. 1111-1117. DOI: 10.1292/jvms.13-0620.

493. Ullah, S. DNA Vaccines against Avian Influenza: current research and future prospects / S. Ullah, N. Riaz, S. Umar, M.A.A. Shah // World's Poultry Science Journal. – 2013. – Vol. 69. – DNA Vaccines against Avian Influenza. – № 1. – P. 125-134. DOI: 10.1017/S0043933913000111.

494. Ul-Rahman, A. Zoonotic potential of Newcastle disease virus: Old and novel perspectives related to public health / A. Ul-Rahman, H.M. Ishaq, M.A. Raza, M.Z. Shabbir // Reviews in Medical Virology. – 2022. – Vol. 32. – № 1. – P. e2246. DOI: 10.1002/rmv.2246.

495. Umer Chhargari, M. Prevention and Control of Newcastle Disease / M. Umer Chhargari // International Journal of Agriculture Innovations and Research Volume 3, Issue 2, ISSN (Online) 2319-1473 (IJTIR). – 2014. – Vol. 3. – P. 444-460.

496. Uyeki, T.M. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Infection in a Dairy Farm Worker / T.M. Uyeki, S. Milton, C. Abdul Hamid et al. // New England Journal of Medicine. – 2024. – Vol. 390. – № 21. – P. 2028-2029. DOI: 10.1056/NEJMc2405371.

497. Valentin, J. Protection conferred by an H5 DNA vaccine against highly pathogenic avian influenza in chickens: The effect of vaccination schedules / J. Valentin, F. Ingraio, F. Rauw, B. Lambrecht // Vaccine. – 2024. – Vol. 42. – № 7. – P. 1487-1497. DOI: 10.1016/j.vaccine.2023.11.058.

498. Van Borm, S. Further evidence for the widespread co-circulation of lineages 4b and 7 velogenic Newcastle disease viruses in rural Nigeria / S. Van Borm, E. Obishakin†, T. Joannis et al. // Avian Pathology. – 2012. – Vol. 41. – № 4. – P. 377-382. DOI: 10.1080/03079457.2012.696311.

499. Van Boven, M. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination / M. Van Boven, A. Bouma, T.H.F. Fabri et al. // Avian Pathology. – 2008. – Vol. 37. – № 1. – P. 1-5. DOI: 10.1080/03079450701772391.

500. Van Den Berg, T. Influenza vaccines and vaccination strategies in birds / T. Van Den Berg, B. Lambrecht, S. Marché et al. // Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 31. – № 2-3. – P. 121-165. DOI: 10.1016/j.cimid.2007.07.004.

501. Van Der Goot, J.A. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens / J.A. Van Der Goot, G. Koch, M.C.M. De Jong, M. Van Boven // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2005. – Vol. 102. – № 50. – P. 18141-18146. DOI: 10.1073/pnas.0505098102.

502. Van Eck, J.H.H. An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: Vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines / J.H.H. Van Eck, E. Goren // *Avian Pathology*. – 1991. – Vol. 20. – № 3. – P. 497-507. DOI: 10.1080/03079459108418787.
503. Vilela, J. Application of CRISPR/Cas9 in Understanding Avian Viruses and Developing Poultry Vaccines / J. Vilela, M.A. Rohaim, M. Munir // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 581504. DOI: 10.3389/fcimb.2020.581504.
504. Wajid, A. Comparison of protection and viral shedding following vaccination with Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation / A. Wajid, A. Basharat, T. Bibi, S.F. Rehmani // *Tropical Animal Health and Production*. – 2018. – Vol. 50. – № 7. – P. 1645-1651. DOI: 10.1007/s11250-018-1607-6.
505. Wajid, A. Repeated isolation of virulent Newcastle disease viruses in poultry and captive non-poultry avian species in Pakistan from 2011 to 2016 / A. Wajid, K.M. Dimitrov, M. Wasim et al. // *Preventive Veterinary Medicine*. – 2017. – Vol. 142. – P. 1-6. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2017.04.010.
506. Wajid, A. Complete Genome Sequence of a Recent Panzootic Virulent Newcastle Disease Virus from Pakistan / A. Wajid, M. Wasim, S.F. Rehmani et al. // *Genome Announcements*. – 2015. – Vol. 3. – № 3. – P. e00658-15. DOI: 10.1128/genomeA.00658-15.
507. Wang, T. Emerging Role of Mucosal Vaccine in Preventing Infection with Avian Influenza A Viruses / T. Wang, F. Wei, J. Liu // *Viruses*. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – P. 862. DOI: 10.3390/v12080862.
508. Wang, X. Development and Evaluation of a Novel Chimeric Genotype VII Newcastle Disease Vaccine: Overcoming Maternal Antibody Interference and Spray Administration / X. Wang, Y. Yao, W. Yang et al. // *Veterinary Sciences*. – 2024. – Vol. 11. – № 11. – P. 532. DOI: 10.3390/vetsci11110532.
509. Wang, Z. Increased substitution rate in H5N1 avian influenza viruses during mass vaccination of poultry / Z. Wang, W. Jiang, S. Liu et al. // *Chinese Science Bulletin*. – 2012. – Vol. 57. – № 19. – P. 2419-2424. DOI: 10.1007/s11434-012-5215-y.
510. Webby, R.J. An Update on Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus, Clade 2.3.4.4b / R.J. Webby, T.M. Uyeki // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 230. – № 3. – P. 533-542. DOI: 10.1093/infdis/jiae379.
511. Webster, R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses / R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman et al. // *Microbiological Reviews*. – 1992. – Vol. 56. – № 1. – P. 152-179. DOI: 10.1128/mr.56.1.152-179.1992.

512. Webster, R.G. H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza / R.G. Webster, M. Peiris, H. Chen, Y. Guan // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 12. – № 1. – P. 3-8. DOI: 10.3201/eid1201.051024.
513. Westbury, H.A. Comparison of the residual virulence of Newcastle disease vaccine strains V4, Hitchner B1 and La Sota / H.A. Westbury, G. Parsons, W.H. Allan // *Australian Veterinary Journal*. – 1984. – Vol. 61. – № 2. – P. 47-49. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1984.tb07190.x.
514. WHO. Considerations for use of avian influenza A(H5) vaccines during the interpandemic and emergence periods: report of a WHO virtual scientific consultation. / WHO. – 2024. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240111462>. – Текст: электронный.
515. WHO. Updated joint FAO/WHO/WOAH public health assessment of recent influenza A(H5) virus events in animals and people / WHO. – 2025. – URL: [https://www.who.int/publications/m/item/updated-joint-fao-who-woah-public-health-assessment-of-recent-influenza-a\(h5\)-virus-events-in-animals-and-people-july2025](https://www.who.int/publications/m/item/updated-joint-fao-who-woah-public-health-assessment-of-recent-influenza-a(h5)-virus-events-in-animals-and-people-july2025). – Текст: электронный.
516. Wilksinson, L. The development of the virus concept as reflected in corpora of studies on individual pathogens. 1. Beginnings at the turn of the century / L. Wilksinson, A.P. Waterson // *Medical History*. – 1975. – Vol. 19. – № 1. – P. 52-72. DOI: 10.1017/S0025727300019931.
517. Winterfield, R.W. Vaccination of Chickens against Newcastle Disease with Live and Inactivated Newcastle Disease Virus / R.W. Winterfield, A.S. Dhillon, L.J. Alby // *Poultry Science*. – 1980. – Vol. 59. – № 2. – P. 240-246. DOI: 10.3382/ps.0590240.
518. WOAH. Avian influenza (including infection with pathogenicity avian influenza viruses) Chapter 3.3.4 / WOAH // *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. – 2021.
519. WOAH. Avian influenza vaccination: why it should not be a barrier to safe trade. / WOAH. – 2023. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2023/12/en-woah-policybrief-avianinfluenzavaccinationandtrade.pdf>. – Текст: электронный.
520. WOAH. Considerations for emergency vaccination of wild birds against high pathogenicity avian influenza in specific situations. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2024/01/vaccination-wild-birds-hpai-outbreak-dec2023.pdf> / WOAH. – 2013. – Текст: электронный.
521. WOAH. High Pathogenicity Avian Influenza in Cattle. / WOAH. – URL: <https://www.woah.org/en/high-pathogenicity-avian-influenza-in-cattle>. – Текст: электронный.

522. WOA. Highly pathogenic avian influenza. Vaccination rules in the EU. WOA 90th General Session. / WOA. – 2023. – URL: https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-06/ad_cm_ai_event-woah_20230522_pres_vaccination.pdf. – Текст: электронный.
523. WOA. Import risk analysis // Terrestrial Animal Health Code. Chapter 2.1. – 2024. – URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2023/chapitre_import_risk_analysis.pdf. – Текст: электронный.
524. WOA. Infection with Newcastle disease virus / WOA // Terrestrial Animal Health Code. Chapter 10.9. – 2022. – Vol. 2. – P. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/en_chapitre_nd.htm. – Текст: электронный.
525. WOA. Newcastle disease. – URL: <https://www.woah.org/en/disease/newcastle-disease>. – Текст: электронный.
526. WOA. Newcastle disease. Chapter 3.3.14. / WOA // Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.3.14. – 2021.
527. WOA. Recommendations applicable to OIE Listed diseases of importance to international trade/ Terrestrial Animal Health Code. Vol. 2. / OIE. - 29th ed. - Paris, 2021 / WOA. – 2021.
528. WOA. Self-declaration by France on the recovery of freedom from highly pathogenic avian influenza in poultry. – 2024. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2024/04/2024-03-france-hpai-selfd-eng.pdf>. – Текст: электронный
529. WOA. Self-declaration of the recovery of a zone (Great Britain) free from infection with high pathogenicity avian influenza viruses (HPAI) in poultry by the United Kingdom. – 2024. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2024/05/2024-05uk-hpai-selfd-eng.pdf> – Текст: электронный.
530. WOA. Self-declaration of the recovery of country freedom from infection with high pathogenicity avian influenza viruses (HPAI) by Ireland / WOA. 2022. – URL: <https://www.woah.org/app/uploads/2022/12/2022-12-ireland-hpai-selfd.pdf>. – Текст: электронный.
531. WOA. “Unprecedented Biodiversity Loss” as HPAI Devastates Wildlife Globally / WOA. – 2025. – URL: <https://www.woah.org/en/statement-on-the-impact-of-hpai-on-wildlife-worldwide>. – Текст: электронный.
532. WOA. World Animal Health Information System (WAHIS) / WOA. – P. <https://wahis.woah.org/#/home>.

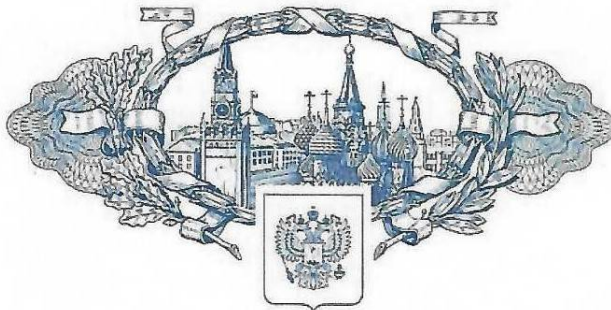
533. Worobey, M. Preliminary report on genomic epidemiology of the 2024 H5N1 influenza A virus outbreak in U.S. cattle (Part 1 of 2) / M. Worobey, Gangavarapu Karthik, J.E. Pekar et al. – 2024. – URL: <https://virological.org/t/preliminary-report-on-genomic-epidemiology-of-the-2024-h5n1-influenza-a-virus-outbreak-in-u-s-cattle-part-1-of-2/970>. – Текст: электронный.
534. Wu, J. Establishment of reverse genetics for genotype VII Newcastle disease virus and altering the cell tropism by inserting TMPRSS2 into the viral genome / J. Wu, R. Lu, J. Wang et al. // *Virus Genes*. – 2023. – Vol. 59. – № 4. – P. 572-581. DOI: 10.1007/s11262-023-01999-9.
535. Xiao, S. Generation by Reverse Genetics of an Effective, Stable, Live-Attenuated Newcastle Disease Virus Vaccine Based on a Currently Circulating, Highly Virulent Indonesian Strain / S. Xiao, B. Nayak, A. Samuel et al. // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e52751. DOI: 10.1371/journal.pone.0052751.
536. Xie, Z. Clade 2.3.4.4b highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses: knowns, unknowns, and challenges / Z. Xie, J. Yang, W. Jiao et al. // *Journal of Virology*. – 2025. – Vol. 99. – № 6. – P. e00424-25. DOI: 10.1128/jvi.00424-25.
537. Xu, T. Construction and Evaluation of the Immunogenicity and Protective Efficacy of Recombinant Replication-Deficient Human Adenovirus-5 Expressing Genotype VII Newcastle Disease Virus F Protein and Infectious Bursal Disease Virus VP2 Protein / T. Xu, T. Xiong, W. Xie et al. // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11. – № 6. – P. 1051. DOI: 10.3390/vaccines11061051.
538. Xu, X. A genotype VII Newcastle disease virus-like particles confer full protection with reduced virus load and decreased virus shedding / X. Xu, Z. Ding, Q. Yuan et al. // *Vaccine*. – 2019. – Vol. 37. – № 3. – P. 444-451. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.11.068.
539. Yakovlev, V.A. Immunogenic and Protective Properties of mRNA Vaccine Encoding Hemagglutinin of Avian Influenza A/H5N8 Virus, Delivered by Lipid Nanoparticles and Needle-Free Jet Injection / V.A. Yakovlev, V.R. Litvinova, N.B. Rudometova et al. // *Vaccines*. – 2025. – Vol. 13. – № 8. – P. 883. DOI: 10.3390/vaccines13080883.
540. Yang, H. Antigenic variation of LaSota and genotype VII Newcastle disease virus (NDV) and their efficacy against challenge with velogenic NDV / H. Yang, J. Zhao, J. Xue et al. // *Vaccine*. – 2017. – Vol. 35. – № 1. – P. 27-32. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.048.
541. Yang, Y.-H. Investigation of Avian Influenza H5N6 Virus-like Particles as a Broad-Spectrum Vaccine Candidate against H5Nx Viruses / Y.-H. Yang, C.-H. Tai, D. Cheng et al. // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14. – № 5. – P. 925. DOI: 10.3390/v14050925.

542. Yehia, N. Common viral and bacterial avian respiratory infections: an updated review / N. Yehia, H.M. Salem, Y. Mahmmmod et al. // *Poultry Science*. – 2023. – Vol. 102. – № 5. – P. 102553. DOI: 10.1016/j.psj.2023.102553.
543. Yi, J. Molecular Characterization of a Virulent Genotype VII_d Strain of Newcastle Disease Virus from Farmed Chickens in Shanghai / J. Yi, C. Liu, B. Chen, S. Wu // *Avian Diseases*. – 2011. – Vol. 55. – № 2. – P. 279-284. DOI: 10.1637/9383-042710-Reg.1.
544. Zhao, P. Newcastle disease virus from domestic mink, China, 2014 / P. Zhao, L. Sun, X. Sun et al. // *Veterinary Microbiology*. – 2017. – Vol. 198. – P. 104-107. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.12.003.
545. Zou, Z. Construction of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated duck enteritis virus-based vaccine against H5N1 avian influenza virus and duck Tembusu virus infection / Z. Zou, K. Huang, Y. Wei et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1478. DOI: 10.1038/s41598-017-01554-1.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2796987

**Штамм "Ямал" вируса гриппа птиц рода
Alphainfluenzavirus вида Influenza A virus подтипа H5N1
для изготовления биопрепаратов для специфической
профилактики гриппа птиц типа А подтипа H5**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных"*
(ФГБУ "ВНИИЗЖ") (RU)

Авторы: *Мороз Наталья Владимировна (RU), Фролов Сергей
Владимирович (RU), Жестков Павел Дмитриевич (RU),
Андрейчук Дмитрий Борисович (RU), Чвала Илья Александрович
(RU), Ручнова Ольга Ивановна (RU)*

Заявка № 2022121292

Приоритет изобретения 03 августа 2022 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 30 мая 2023 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 03 августа 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2 796 987⁽¹³⁾ C1(51) МПК
C12N 7/00 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(52) СПК
C12N 7/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022121292, 03.08.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.08.2022Дата регистрации:
30.05.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.08.2022

(45) Опубликовано: 30.05.2023 Бюл. № 16

Адрес для переписки:
600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ
"ВНИИЗЖ", Р.Н. Рыбину

(72) Автор(ы):

Мороз Наталья Владимировна (RU),
Фролов Сергей Владимирович (RU),
Жестков Павел Дмитриевич (RU),
Андрейчук Дмитрий Борисович (RU),
Чвала Илья Александрович (RU),
Ручнова Ольга Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны
здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ")
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2323740 C1, 10.05.20. RU 2309983
C2, 10.11.200. ZECCHIN B. et al. Evolutionary
dynamics of H5 highly pathogenic avian
influenza viruses (clade 2.3.4.4B) circulating in
Bulgaria in 2019-2021. Viruses. 2021; 13:2086(54) Штамм "Ямал" вируса гриппа птиц рода Alphainfluenzavirus вида Influenza A virus подтипа H5N1 для
изготовления биопрепаратов для специфической профилактики гриппа птиц типа А подтипа H5

(57) Формула изобретения

Штамм «Ямал» вируса гриппа птиц семейства Orthomyxoviridae рода Alphainfluenzavirus вида Influenza A virus подтипа H5, депонированный в Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вирусов ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» под регистрационным номером: №366 - деп/20-28-ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ», для изготовления биопрепаратов для специфической профилактики гриппа птиц типа А подтипа H5.

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

RU 2 796 987 C1

RU 2 796 987 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2821028

**Штамм "ВНИИЗЖ G7" вируса ньюкаслской болезни
птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики
и специфической профилактики ньюкаслской болезни
птиц**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных"*
ФГБУ "ВНИИЗЖ" (RU)

Авторы: *Мороз Наталья Владимировна (RU), Чвала Илья
Александрович (RU), Вершинина Мария Андреевна (RU), Долгов
Дмитрий Львович (RU), Ручнова Ольга Ивановна (RU), Гусева
Нелли Андреевна (RU), Комаров Илья Александрович (RU),
Андрейчук Дмитрий Борисович (RU)*

Заявка № 2024103509

Приоритет изобретения 13 февраля 2024 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации 17 июня 2024 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 13 февраля 2044 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 821 028**⁽¹³⁾ **C1**(51) МПК
C12N 7/00 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**(52) СПК
C12N 7/00 (2024.01)

(21)(22) Заявка: 2024103509, 13.02.2024

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.02.2024Дата регистрации:
17.06.2024

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.02.2024

(45) Опубликовано: 17.06.2024 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ
ВНИИЗЖ, Ручнова Ольга Ивановна

(72) Автор(ы):

Мороз Наталья Владимировна (RU),
Чвала Илья Александрович (RU),
Вершинина Мария Андреевна (RU),
Долгов Дмитрий Львович (RU),
Ручнова Ольга Ивановна (RU),
Гусева Нелли Андреевна (RU),
Комаров Илья Александрович (RU),
Андрейчук Дмитрий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны
здоровья животных" ФГБУ "ВНИИЗЖ" (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: UA 32180 U, 12.05.2008. RU 2192464
C2, 10.11.2002. KZ 31530 B, 30.09.2016. KG 2212
C1, 31.07.2020. RU 94015927 A1, 10.03.1997. RU
2259844 C1, 10.09.2005. CN 107412762 A,
01.12.2017. С.В. Фролов Эффективность вакцин
против ньюкаслской болезни производства
ФГБУ "ВНИИЗЖ"; в отношении актуальных
вирусов VII генотипа, ВЕТЕРИНАРИЯ
СЕГОДНЯ, МАРТ, N1 (см. прод.)(54) Штамм "ВНИИЗЖ G7" вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для
диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц

(57) Формула изобретения

Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц семейства *Paramyxoviridae*
рода *Orthoavulavirus* вида *Avian orthoavulavirus 1*, депонированный во Всероссийской
государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов
животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ», под регистрационным номером: №436 – деп
/ 22-70 – ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ» для изготовления биопрепаратов для диагностики
и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц.

(56) (продолжение):

(36) 2021 VETERINARY SCIENCE TODAY, MARCH, N1 (36) 2021, реферат.

Стр. 1

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

RU 2 821 028 C1

RU 2 821 028 C1



Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

микрорайон Юрвец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 15 » 11 20 23 г.

СПРАВКА №436 - деп / 22-70

о депонировании штамма «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни

Форма депонирования: «Гарантийное хранение».

Авторы штамма: Н.В. Мороз, Долгов Д.Л., С.В. Фролов, Н.А. Гусева.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Изолят «NDV / by / chicken / 612 / 2022» вируса ньюкаслской болезни выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала, полученного от цыплят-бройлеров птицефабрики «Белорусьнефть-Особино» Буда-Кошелевского района Гомельской области Республики Беларусь.

Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2022 г. при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве производственного.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрвец).

Регистрационный номер: №436 - деп / 22-70 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 08 февраля 2022 г.

Срок хранения штамма в депозитории: до 01.2033 г.

Начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.Б. Комолёнков

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный

КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Россельхознадзор

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

микрорайон Юрьевец, город Владимир, Владимирская область, Россия, 600901
тел.: (4922) 26-06-14, т./ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvs.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023301283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 20 » 06 20 23 г.

СПРАВКА №437 - деп / 22-71**о депонировании штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» вируса ньюкаслской болезни****Форма депонирования:** «Гарантийное хранение».**Авторы штамма:** Н.В. Мороз, Долгов Д.Л., С.В. Фролов, Н.А. Гусева.**Депозитор:** ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Изолят вируса ньюкаслской болезни выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб клинического материала, полученного от латентно инфицированных цыплят-бройлеров птицефабрики «Снежинская» Беловского района Кемеровской области РФ.

Изолят адаптировали к репродукции в развивающихся СПФ-эмбрионах кур. Изученные биологические свойства вируса характеризовали его слабо вирулентным, но при этом способным индуцировать активную специфическую иммунную реакцию птицы. После оценки иммунобиологических показателей в 2022 г. вирус был охарактеризован как штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн», обладающий наследуемым природно ослабленным фенотипом. Штамм был рассмотрен как перспективный для использования в качестве вакцинного варианта вируса ньюкаслской болезни.

Штамм предложен в качестве производственного.

Таксономия штамма вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Haploviricotina*, класс *Monjiviricetes*, отряд *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, подсемейство *Avulavirinae*, род *Orthoavulavirus*, вид *Avian orthoavulavirus 1*.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Регистрационный номер: №437 - деп / 22-71 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».**Дата депонирования штамма:** 08 февраля 2022 г.**Срок хранения штамма в депозитарии:** до 01.2033 г.

Начальник службы безопасности ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.Б. Комолёв

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный



КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Россельхознадзор

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

Региональная референтная лаборатория МЭБ по ящуру для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья.
Центр МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы,
Центральной Азии и Закавказья. Референтная лаборатория МЭБ по высокопатогенному гриппу птиц, низкопатогенному
гриппу птиц и болезни Ньюкасла. Референтный центр ФАО по ящуру.

600901, Россия, Владимирская область, город Владимир, микрорайон Юрьевец,
т.: (4922) 26-06-14, ф.: (4922) 26-38-77, e-mail: arriah@fsvps.gov.ru, сайт: www.arriah.ru
ОКПО: 00495527, ОГРН: 1023801283720, ИНН/КПП: 3327100048/332701001

« 28 » 01 20 22 г.

СПРАВКА №366 - деп / 21-27

**о депонировании штамма «Ямал» подтипа H5N1 вируса гриппа А
для целей патентной процедуры**

Форма депонирования: «Национальное патентное депонирование».

Авторы штамма: С.В. Фролов, Н.В. Мороз, И.А. Чвала, Д.Б. Андрейчук.

Депозитор: ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Вирус гриппа А выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из проб патологического материала, полученного от дикой утки и отобранного 30 июля 2021 г. на территории Ямало-Ненецкого автономного округа РФ.

Штамм «Ямал» подтипа H5N1 низкопатогенного вируса гриппа А получен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021 г. при проведении научно-исследовательской работы путем пассирования выделенного вируса на СПФ-эмбрионах кур методом предельных разведений. Штамм адаптирован к репродукции в 9-11-суточных эмбрионах кур.

Штамм предложен в качестве производственного.

Таксономия вируса: сфера *Riboviria*, царство *Orthornavirae*, тип *Negarnaviricota*, подтип *Polyploviricotina*, класс *Insthoviricetes*, отряд *Articulavirales*, семейство *Orthomyxoviridae*, род *Alphainfluenzavirus*, вид *Influenza A virus*, подтип H5N1.

Депозитарий: Всероссийская государственная коллекция экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ» (600901, Россия, Владимирская область, г. Владимир, мкр. Юрьевец).

Регистрационный номер: № 366 - деп / 21-28 - ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Дата депонирования штамма: 24 сентября 2021 г.

Срок хранения штамма в депозитарии: до 01.2046 г.

Заместитель директора по производству ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Н.В. Мороз

Руководитель Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных ФГБУ «ВНИИЗЖ»

С.А. Похвальный

КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Руководителя
Федеральной службы по
ветеринарному и фитосанитарному надзору

И.А. Савенков
И.А. САВЕНКОВ

01 АВГ 2022

УТВЕРЖДАЮ

Начальник службы качества
ФГБУ «ВНИИЗЖ»

А.В. Константинов
А.В. Константинов

15 августа 2022 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ВАКЦИНА ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ (H5)
ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬСИОННАЯ

«АвиФлуВак»

СТО 00495527-0406-2022

Технические условия

Владимир
2022

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б. *Л.Б. Прохвятилова*

Ключевые слова: вакцина, грипп птиц (H5), инактивированная, эмульсионная, стерильность, стабильность эмульсии, вязкость, полнота инактивации, безвредность, антигенная активность.

Руководитель разработки:

Зав. лабораторией профилактики
болезней птиц


подпись

Н.В. Мороз

Ответственный исполнитель:

Ведущий научный сотрудник
лаборатории профилактики
болезней птиц


подпись

С.В. Фролов

Исполнители:

Ведущий научный сотрудник
лаборатории профилактики
болезней птиц


подпись

А.А. Пяткина

Согласовано:

Начальник отдела биологического и
технологического контроля
(испытательная лаборатория
ветпрепаратов)


подпись

Е.А. Яснева

/ Начальник отдела управления
качеством


подпись

М.П. Чепурная



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

**Регистрационное удостоверение
лекарственного препарата для ветеринарного применения**

№ **006720**

Номер регистрационного удостоверения:
12-1-20.22-4907 № ПВР-1-20.22/03746

Дата государственной регистрации: « **22** » **сентября** **20 23** г.

Наименование и адрес держателя или владельца регистрационного удостоверения
лекарственного препарата: **ФГБУ "ВНИИЗЖ" 600901, Владимирская обл., г.
Владимир, мкр. Юрьевец**

Наименование и адрес юридического лица - разработчика лекарственного препарата:
ФГБУ "ВНИИЗЖ" 600901, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец

Торговое наименование лекарственного препарата: **ВНИИЗЖ-АвиФлуВак**

Международное непатентованное, или группировочное, или химическое
наименование лекарственного препарата: **Вакцина против гриппа птиц (H5)
инактивированная эмульсионная**

Лекарственная форма: **эмульсия для инъекций**

Дозировка: **20 см³ (40 доз), 50 см³ (100 доз), 200 см³ (400 доз) или 500 см³ (1000
доз)**

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет
(нужное подчеркнуть) **до 01.08.2027**

Заместитель Руководителя
(должность)


(подпись)


М.П.

К.А. Савенков
(Ф.И.О.)

АО «ОПШОМ» Москва 2023 г. Б: Т314-74

КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б. 

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Руководителя
Федеральной службы по
ветеринарному и фитосанитарному
надзору



К.А. САВЕНКОВ

15 ОКТ 2023

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель руководителя службы
качества ФГБУ «ВНИИЗЖ»



А.В. Константинов

« 31 » Октября 20 23 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

**ВАКЦИНА ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ
ИЗ ШТАММА «ВНИИЗЖ НБ-Эн» СУХАЯ ЖИВАЯ**

«ВНИИЗЖ НБ-Эн»

СТО 00495527-0449-2023

Технические условия

Маслов М.В.

Владимир
2023

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

Л. Б. Прохвятилова

СТО 00495527-0449-2023

ОКС 11.220

ОКПД2 21.20.21.137

Ключевые слова: ньюкаслская болезнь, вакцина, вирус ньюкаслской болезни
штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн», вирус ньюкаслской болезни штамм
«Ла-Сота», лиофилизация, инфекционная активность,
безвредность, антигенная активность

Руководитель
разработки: зав. лабораторией профилактики
болезней птиц

Н.В. Мороз

Ответственный
исполнитель:

Заведующий сектором живых
вакцин ЛПБП

А.А. Пяткина

Исполнители:

Начальник отдела профилактики
болезней птиц ЛПБП

С.В. Фролов

Научный сотрудник СЖВ ЛПБП

Т.Н. Зыбина

Ведущий научный сотрудник СЖВ
ЛПБП

В.Ю. Кулаков

Вед. ветврач лаб. профилактики
болезней птиц

М.И. Маркина

Согласовано:

Руководитель испытательной
лаборатории ветпрепаратов

Е.А. Яснева

Начальник ОУК

М.П. Чепурная

Заместитель начальника ОУК

М.Г. Суровцева



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

**Регистрационное удостоверение
лекарственного препарата для ветеринарного применения**

№ **006758**

Номер регистрационного удостоверения:
12-1-28.23-5041 № ПВР-1-28.23/03855

Дата государственной регистрации: « **16** » октября 20 **23** г.

Наименование и адрес держателя или владельца регистрационного удостоверения
лекарственного препарата: **ФГБУ "ВНИИЗЖ" 600901, Российская Федерация,
Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец**

Наименование и адрес юридического лица - разработчика лекарственного препарата:
**ФГБУ "ВНИИЗЖ" 600901, Российская Федерация, Владимирская обл., г.
Владимир, мкр. Юрьевец**

Торговое наименование лекарственного препарата: **ВНИИЗЖ НБ-Эн**

Международное непатентованное, или группировочное, или химическое
наименование лекарственного препарата: **Вакцина против Ньюкаслской болезни
из штамма "ВНИИЗЖ НБ-Эн" сухая живая**

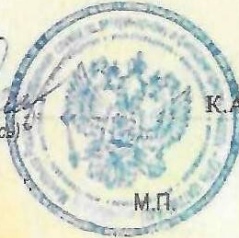
Лекарственная форма: **лиофилизат для приготовления суспензии для
перорального, интраназального (окулярного) применения и спрей-метода**

Дозировка: **4 см³ (5000 доз)**

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет
(нужное подчеркнуть)

Заместитель Руководителя
(должность)


(подпись)


М.П.

К.А. Савенков
(Ф.И.О.)

АО «ОИЗЖИМ», Москва, 2023 г. - Ф. 13 № 74

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б. 

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Руководителя
Федеральной службы по
ветеринарному и фитосанитарному
надзору


К.А. САВЕНКОВ
06 ФЕВ 2024

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя
службы качества ФГБУ «ВНИИЗЖ»


А.В. Константинов
« 01 » марта 2024 г.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ВАКЦИНА ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ (G7 и ЛА-СОТА)
И ГРИППА ПТИЦ H9N2 (Y280 и G1) АССОЦИИРОВАННАЯ
ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬСИОННАЯ

«ВНИИЗЖ- АвиНьюФлу Мульти»

Технические условия

СТО 00495527-0468-2024

Владимир - 2024

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



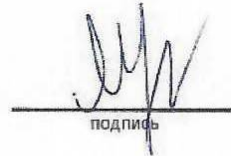
СТО 00495527-0468-2024

ОКС 11.220

ОКПД2 21.20.21.136

Ключевые слова: вакцина, ньюкасская болезнь, грипп птиц H9N2, инаktivированная, эмульсионная, стерильность, стабильность эмульсии, вязкость, полнота инаktivации, безвредность, антигенная активность.

Руководитель разработки:

Зав. лабораторией профилактики
болезней птиц

подпись

Н.В. Мороз

Ответственный исполнитель:

Заведующий сектором инаktivированных
вакцин
лаборатории профилактики
болезней птиц

подпись

Д.Л. Долгов

Исполнители:

Младший научный сотрудник
лаборатории профилактики
болезней птиц

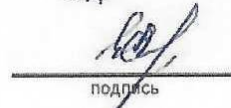
подпись

И.А. Комаров

Аспирант лаборатории
профилактики болезней птиц

подпись

М.А. Вершинина

Руководитель
Испытательной лаборатории
ветпрепаратов

подпись

Е.А. Яснева

Заведующий отделом
контроля качества
диагностических препаратов

подпись

С.К. Чугрова

Заведующий отделом контроля
качества вакцинных препаратов ИЛВ

подпись

Е.А. Константинова

Заместитель начальника отдела
управления качеством

подпись

М.Г. Суровцева

Главный специалист отдела управления
качеством

подпись

А.С. Лосева

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

Регистрационное удостоверение
лекарственного препарата для ветеринарного применения

№ 006923

Номер регистрационного удостоверения: _____

12-1-03.24-5101 № ПВР-1-03.24/03908

Дата государственной регистрации: « 06. » _____ февраля 20 24 г.

Наименование и адрес держателя или владельца регистрационного удостоверения
лекарственного препарата: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ" 600901,
Российская Федерация, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец

Наименование и адрес юридического лица - разработчика лекарственного препарата:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ" 600901,
Российская Федерация, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец

Торговое наименование лекарственного препарата: ВНИИЗЖ - АвиНьюФлу

Мульти

Международное непатентованное, или группировочное, или химическое
наименование лекарственного препарата: вакцина против ньюкаслской болезни
("G7" и "Ла-Сота") и гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) ассоциированная
инактивированная эмульсионная

Лекарственная форма: эмульсия для инъекций

Дозировка: 100 см³ (200 доз), 200 см³ (400 доз), 500 см³ (1000 доз)

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет
(нужное подчеркнуть)

Заместитель Руководителя _____
(должность)


(подпись)

К.А. Савенков
(Ф.И.О.)

М.П.

АО «СПИДОН», Москва, 2022 г., «Б» ТЗ № 74

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Руководителя
Федеральной службы по
ветеринарному и фитосанитарному
надзору



[Signature]
К.А. САВЕНКОВ
19 ФЕВ 2024

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя службы
качества ФГБУ «ВНИИЗЖ»



[Signature] А.В. Константинов
19 ФЕВ 2024

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

СТАНДАРТ ФГБУ «ВНИИЗЖ»

ВАКЦИНА ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ
ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬСИОННАЯ

«ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Технические условия

СТО 00495527-0483-2024

Владимир - 2024

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



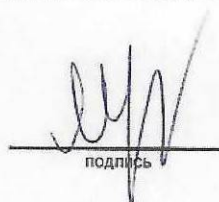
ОКС 11.220

ОКПД2 21.20.21.136

Ключевые слова: вакцина, ньюкасская болезнь, грипп птиц H9N2, инактивированная, эмульсионная, стерильность, стабильность эмульсии, вязкость, полнота инактивации, безвредность, антигенная активность.

Руководитель разработки:

Зав. лабораторией профилактики
болезней птиц



подпись

Н.В. Мороз

Ответственный исполнитель:

Заведующий сектором инактивированных
вакцин
лаборатории профилактики
болезней птиц



подпись

Д.Л. Долгов

Исполнители:

Младший научный сотрудник
лаборатории профилактики болезней
птиц



подпись

И.А. Комаров

Аспирант лаборатории
профилактики болезней птиц



подпись

М.А. Вершинина

Руководитель
Испытательной лаборатории
ветпрепаратов



подпись

Е.А. Яснева

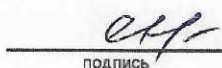
Заведующий отделом
контроля качества
диагностических препаратов



подпись

С.К. Чугрова

Заведующий отделом контроля
качества вакцинных препаратов ИЛВ



подпись

Е.А. Константинова

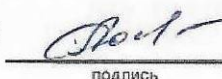
Заместитель начальника отдела
управления качеством



подпись

М.Г. Суровцева

Главный специалист отдела управления
качеством



подпись

А.С. Лосева

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

**Регистрационное удостоверение
лекарственного препарата для ветеринарного применения**

№ 006953

Номер регистрационного удостоверения: _____

12-1-04.24-5108 № ПВР-1-04.24/03915

Дата государственной регистрации: « 19 » _____ февраля 20 24

Наименование и адрес держателя или владельца регистрационного удостоверения
лекарственного препарата: ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ" 600901,
Российская Федерация, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец

Наименование и адрес юридического лица - разработчика лекарственного препарата:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ" 600901,
Российская Федерация, Владимирская обл., г. Владимир, мкр. Юрьевец

Торговое наименование лекарственного препарата: ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти

Международное непатентованное, или группировочное, или химическое
наименование лекарственного препарата: Вакцина против ньюкастской болезни
инактивированная эмульсионная

Лекарственная форма: эмульсия для инъекций

Дозировка: 100 см³ (200 доз), 200 см³ (400 до), 500 см³ (1000 доз)

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет
(нужное подчеркнуть)

Заместитель Руководителя
(должность) _____



К. А. Савенков
(Ф.И.О.)

М.П.

АО «ВЕТУСЧ», Москва, 2022 г., «Б», ТЗ № 74

КОПИЯ ВЕРНА
учёный секретарь
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по НИР
И.А. Чвала
«11» сентября 2024 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ОЦЕНКЕ ТИТРА 50-ПРОЦЕНТНЫХ ПРОТЕКТИВНЫХ ДОЗ (PD_{50}) ДЛЯ
ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ПТИЦ

Авторы: Мороз Н.В.
Пяткина А.А.
Долгов Д.Л.
Фролов С.В.
Кулаков В.Ю.
Константинов А.В.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 05
от «30» августа 2024 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 05
от «11» сентября 2024 г.

Владимир 2024

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по НИР

И.А. Чвала

2024 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ПЛАНИРОВАНИЮ И ПРОВЕДЕНИЮ МОНИТОРИНГОВЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ НА ГРИПП ПТИЦ И НЬЮКАСЛСКУЮ БОЛЕЗНЬ В
ДИКОЙ ОРНИТОФАУНЕ И В ПОПУЛЯЦИИ ДОМАШНИХ ПТИЦ
НАСЕЛЕННЫХ ПУНКТОВ

Авторы: Волков М.С.
Ирза В.Н.
Варкентин А.В.
Чвала И.А.
Мороз Н.В.
Варвашенко Д.В.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 04
от «13» июня 2024 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 04
от «13» июня 2024 г.

Владимир 2024

ФГБУ «ВНИИЗЖ»

« 27 » ноября 2024

Вх. № 32139

(Проект № 120379)

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по НИР



И.А. Чвала

2024 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО АКТИВНОМУ И ПАССИВНОМУ НАДЗОРУ ЗА
ВАКЦИНИРОВАННЫМ ПРОТИВ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА
ПТИЦ ПОГОЛОВЬЕМ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННЫХ
ПРЕДПРИЯТИЙ

Авторы: Волков М.С.
Ирза В.Н.
Варкептин А.В.
Чвала И.А.
Мороз Н.В.
Варвашенко Д.В.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 07
от «28» ноября 2024 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 07
от «29» ноября 2024 г.

Владимир 2024

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТИЛОВА Л. Б.



Министерство
сельского хозяйства
и лесного хозяйства
Российской Федерации

ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ 2022

XXIV ВСЕРОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

ДИПЛОМ

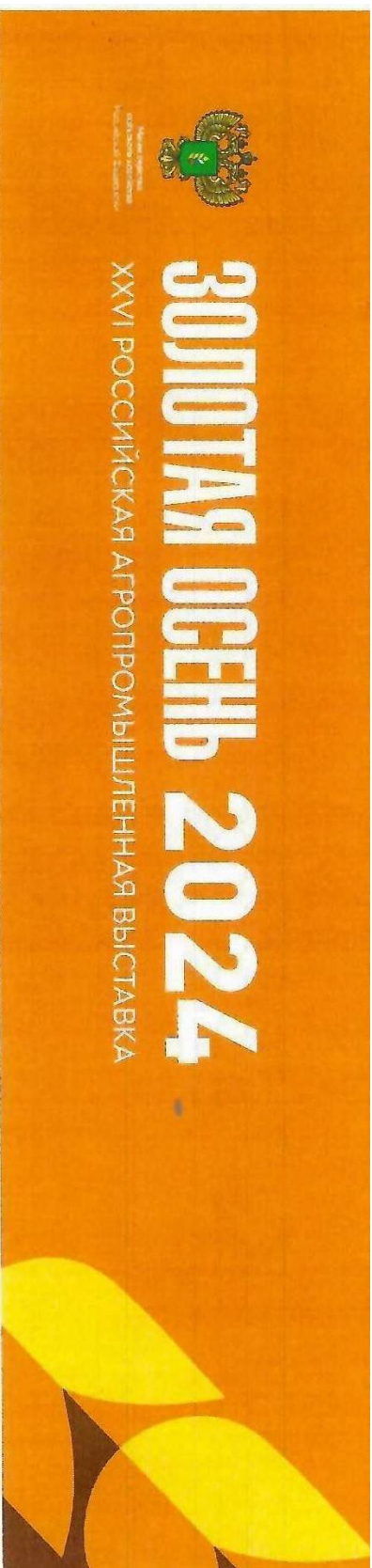
НАГРАЖДАЕТСЯ
ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир
«За разработку и производство вакцины против гриппа птиц (H5)
инактивированной эмульсионной «АвиФлуВак»»

МИНИСТР СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Д.Н. ПАТРУШЕВ

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТЯДОВА Л. Б.



ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ
ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир
«ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», против ньюкасской болезни инaktivированной эмульсионной
«За разработку и производство вакцин гриппа птиц H9N2 (Y280 и G1) ассоциированной
инактивированной эмульсионной – «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

ЗАМЕСТИТЕЛЬ МИНИСТРА СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

О.А. ГАТАЕВА

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТЛОВА Л. Б.



ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ 2025
XXVII РОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЮ

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир

«За разработку и производство вакцины против ньюкаслской болезни из штамма
«ВНИИЖ-НБ-Эн» сухой жидкой «ВНИИЖ НБ-Эн» и вакцины против метатантеновирусной
инфекции птиц из штамма «MPV-07BT» жидкой сухой»

ЗАМЕСТИТЕЛЬ МИНИСТРА СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

О.А. ГАТАГОВА

КОПИЯ ВЕРНА
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ПРОХВАТимова Л. Б.