

Мороз Наталья Владимировна

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

4.2.3 «Инфекционные болезни и иммунология животных»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Научный консультант: **Ирза Виктор Николаевич**, доктор ветеринарных наук, доцент

Официальные оппоненты: **Джавадов Эдуард Джавадович**, академик РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры эпизоотологии имени Урбана В.П. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины»;

Гусев Анатолий Алексеевич, член-корреспондент РАН, доктор ветеринарных наук, профессор, научный консультант ООО «Ветпоставка»;

Ленёва Ирина Анатольевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Ведущая организация: ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

Защита состоится «___» _____ 2026 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, мкр. Юрьевец, ул. Гвардейская 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ». Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного консультанта размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Одной из ведущих отраслей сельского хозяйства, обеспечивающей продовольственную безопасность страны, является птицеводство. Мощности российского птицеводства полностью покрывают потребности россиян в яйце, а производство куриного мяса занимает почти половину от доли всей структуры мясной выработки в стране (Фисинин В.И., 2024).

Несмотря на быстрые темпы развития отрасли, постоянную угрозу представляют инфекционные заболевания, среди которых главенствующую роль играют особо опасные трансграничные болезни - высокопатогенный грипп птиц (ВГП) и болезнь Ньюкасла или ньюкаслская болезнь (НБ). Их возникновение приводит к существенным экономическим убыткам, обусловленным повышенным отходом птиц и снижением продуктивности, а также последующими ограничениями в сфере торговли (ВОЗЖ, 2023). Некоторые штаммы вирусов гриппа птиц и НБ имеют зоонозный потенциал (Clemmons E. A., 2021).

Научные исследования, проведенные в последние десятилетия, свидетельствуют о неуклонной эволюции вируса НБ. Штаммы новых генотипов часто проявляют себя как высоковирулентные (Yi J., 2011; Dimitrov K.M., 2017). Вирусы НБ генотипа VII распространились во многих странах с развитым птицеводством (Lomniczi B., 1998; Dimitrov K.M., 2017). В 2019г. в РФ был выделен вирус нового субгенотипа - VII 1.1 (VII L), который в последующие годы стал доминирующим (Guseva N.A., 2023; Фролов С.В., 2021).

В настоящее время определено более двадцати генотипов вируса ньюкаслской болезни (ВНБ) и часто вспышки НБ отмечаются у вакцинированных птиц (Dimitrov K.M., 2017; Hu Z., 2022; Steensels M., 2025). Применение вакцин против НБ, не соответствующих циркулирующему генотипу ВНБ, даже если предотвращает гибель и заболевание птиц, не исключает циркуляцию высоковирулентных вирусов в популяции, что может в дальнейшем привести к распространению болезни (Miller P.J., 2007; Hu Z., 2011; Yi J., 2011; Kapczynski D.R., 2013; Sultan H.A., 2021; Dewidar A.A., 2022; Steensels M., 2025). Miller P.J. и др. показали, что вакцины против НБ, созданные на основе вирусов, филогенетически близких к потенциальным вирусам-возбудителям, могут обеспечить более эффективный контроль НБ за счёт снижения выделения вируса инфицированными птицами (Miller P.J., 2007). В некоторых странах применение новых вакцин для домашней птицы, соответствующих генотипу, успешно подавляет циркуляцию вирулентных штаммов ВНБ в полевых условиях (Hu Z, 2009; Roohani K., 2015; Wajid A., 2018; Sultan H.A., 2020; Rohaim M.A., 2022; Amer A., 2023; Azab A.A., 2022; Hossain I., 2023; Haque M., 2024; Akmyrzaev N., 2025).

Вирус гриппа птиц представляет угрозу здоровью животных и человека (ФАО; Simancas-Racines D., 2025). С 2005 г. подтипы H5 и H7 стали причиной

многочисленных вспышек заболевания среди диких и домашних птиц и гибели по меньшей мере 600 млн голов сельскохозяйственной птицы. Вирусы гриппа H5Nx клады 2.3.4.4 генетической линии Gs/Gd/96 положили начало масштабному межконтинентальному распространению ВГП (ФАО). Подтип вируса H5N1 стал причиной значительного количества вспышек заболевания во многих странах Европы, Африки, Азии и Америки (ВОЗЖ).

Эпизоотическая ситуация по ВГП на территории Российской Федерации также является напряженной (Ирза В.Н., 2022; Волков М.С., 2022; Марченко В.Ю., 2024). 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.

Вирусы гриппа А птиц, особенно подтипа H5N1, представляют постоянную угрозу пандемии из-за их быстрой эволюции, расширения круга хозяев и растущего количества свидетельств передачи вируса между млекопитающими (Burrough E.R., 2024; Pulit-Penaloza J.A., 2024; Webby R.J. et Uyeki T.M., 2024; Peacock T.P., 2025; Kim Y., 2025; Arruda B., 2024; Eisfeld A.J., 2024; Mostafa A., 2024; Bhavesh, 2025; Chothe S.K., 2025; Mena-Vasquez J., 2025). Традиционные меры контроля - биобезопасность, стемпинг-аут и ограничение передвижения - могут оказаться недостаточными (Brown I., 2022; ВОЗЖ, 2023; Swayne D., 2023; Alvarez J., 2025). Международные организации (ВОЗЖ, ФАО, EFSA) допускают, что профилактическая вакцинация позволит свести к минимуму количество вспышек, 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, и рекомендуется как часть комплексного подхода в борьбе со вспышками гриппа птиц (Brown I., 2022; ВОЗЖ, 2023; Swayne D., 2023).

Учитывая постоянные угрозы заноса новых вариантов вируса гриппа А птиц и вируса НБ на территорию РФ, изучение эффективности существующих вакцинных препаратов против циркулирующих на территории страны вирусов НБ и ВГП, и разработка высокоэффективных вакцин против вышеуказанных заболеваний подчеркивают актуальность заявленной темы.

Степень разработанности темы. Разработке вакцинных препаратов против НБ и ВГП посвящено множество отечественных и зарубежных публикаций (Ирза В.Н. 2013-2017; Webster R.G., 1992, 2006; Alexander D.J., 2000-2012; Swayne D.E. 2003; Bublot M., 2006-2007; Perozo F., 2008; Capua I. и Alexander D.J., 2009; Kapczynski D.R., 2009-2017; Hu Z., 2011; Swayne 2012, 2023; Lee D.-H., 2013-2014; Miller P.J., 2013; Bertran K., 2016-2017; Suarez D.L. и Pantin-Jackwood M.J., 2017; Kim Sh., 2020; Liu M., 2023; Brown I., 2024; Steensels M., 2025). 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.

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 НБ и ВГП 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 НБ и ВГП 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 «НБ-Эн» и штамм «Ямал» вируса гриппа птиц 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 полиштамменной 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 «НБ-Эн».

Изучены протективные свойства отечественных серийно выпускаемых вакцин «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» и живой вакцины из штамма «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 двумя патентами РФ на изобретения: RU 2796987 C1 и RU 2821028 C1.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты научных изысканий легли в основу разработки новых вакцин, которые были зарегистрированы и внедрены в ветеринарную практику. Испытания препаратов проведены комиссионно, а нормативные документы утверждены в установленном порядке. Справки о депонировании трёх штаммов вирусов, СТО на четыре вакцины, три методические рекомендации указаны в разделе «Заключение. Практические предложения», а копии титульных листов документов представлены в виде приложений в диссертации.

Методология и методы исследований. При проведении анализа эпизоотической ситуации использовали официальные данные о регистрации случаев заболеваний ВГП и НБ в России в 2005-2024 гг. 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 гриппа птиц Н5 в лабораторных и производственных условиях.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты проведенных исследований получены на большом объеме экспериментального материала. Степень достоверности полученных экспериментальных данных подтверждена обработкой их классическими методами статистического анализа и результатами комиссионных испытаний.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2020-2024 гг.), Международных и национальных научно-практических конференциях и семинарах (Владимир, 2021 - 2025 гг.; Москва, 2021 - 2024 гг.; Санкт-Петербург 2021, 2024 гг.; Челябинск 2021, 2022 гг.; Самарканд, 2021 г.; Ереван 2021 г.; Алтай 2022 г.; Уфа 2022 г.; Минск 2023, 2025 гг.; Новосибирск 2023 - 2025 гг.; Кострома 2024 г.; Нальчик, 2024 г.; Ставрополь 2024 г.; Астана 2024 г.).

Личный вклад автора в выполнение работы. Научные исследования, изложенные в диссертации, выполнены автором самостоятельно и являются результатом работы за период с 2020 по 2025 год. В ходе проведения отдельных этапов работы помощь оказывали сотрудники: лаборатории профилактики болезней птиц; референтной лаборатории вирусных болезней птиц; информационно-аналитического центра Управления ветнадзора; экспериментально-биологической лаборатории по работе с животными, за что автор выражает свою благодарность. Участие соавторов отражено в совместно изданных научных публикациях.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 18 научных работ, из них в рецензируемых изданиях, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертации - 10 статей и два патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 417 страницах компьютерного текста, содержит введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение. Диссертация иллюстрирована 82 таблицами и 28 рисунками. Список использованной литературы включает 545 источников. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты проделанной работы.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали следующие материалы и методы.

2.1 Материалы

Вирусы. *Изоляты вируса НБ генотипа VII:* «Калининград» NDV/chicken/Rus/Kaliningrad/184/13, «Крым» NDV/chicken/Rus/Crimea/54/17, «Краснодар» NDV/chicken/Rus/Krasnodar/9/19, NDV/chicken/Rus/Khanty-Mansy/1240-1/21 субгенотип VII.1.1 (VII L). *Вирусы НБ:* вирус НБ 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 «НБ-Эн». *Высоковирулентные 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 2.3.4.4b (в тексте – ВГП H5N8 штамм «КЧР»); подтип H5N1 штамм A/chicken/Stavropol/2077-6/21 вируса ВГП; подтип H5N1 штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1. *Низковирулентный вирус гриппа птиц*: штамм «Ямал» вируса гриппа H5N1.

Животные. Коммерческие куры кроссов «Хайсекс коричневый», «Хайсекс белый», «Ross-308», «Декалб уайт», утки пекинской породы, гуси и индейки от одного до 120-суточного возраста, полученные из благополучных по инфекционным болезням хозяйств, использовались в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33215-2014.

Куриные эмбрионы. 9-10-суточные СПФ-куриные эмбрионы категории СПФ фирм «Valo Biomedica» (Германия) и «БЕНКЕС» (Индия), а также эмбрионы кроссов «Хайсекс белый», «Ross-308», «Декалб уайт», полученные из благополучных по инфекционным болезням хозяйств.

Вакцины. Вакцина против НБ из штамма «Ла-Сота» живая (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); «Вектормун ND» рекомбинантная вакцина (Сева, Венгрия); «Севак Витапест L» («Сева», Венгрия); «Севак NEW L» («Сева», Франция); «Хиправиар S», «Хиправиар B1», «Хиправиар-Клон» («Хипра»); «Авинью Хатчпак» («Берингер Ингельхайм»); «Gallimune ND» инактивированная («Берингер Ингельхайм»); вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»; ассоциированная вакцина против НБ и низкопатогенного гриппа птиц H9N2 «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти». Вакцина против гриппа птиц инактивированная «ФлуПротект H5» («Ставропольская биофабрика»); инактивированная вакцина против гриппа птиц H5 из штамма «Приморский» и вакцина «АвиФлуВак» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Диагностические наборы. Для выявления антител к вирусу НБ в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), и для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в РТГА использовали наборы ФГБУ «ВНИИЗЖ», для выделения суммарной РНК - набор «РИБО-сорб». Обратнo-транскриптазную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили в одну стадию с набором OneStep RT-PCR Kit (Qiagen).

2.2 Методы исследований

Культивирование вируса проводили в 9-10-суточных эмбрионах кур СПФ или товарных, полученных из благополучных хозяйств.

Определение инфекционной активности (титра) вируса. В качестве чувствительных тест-объектов использовали развивающиеся 9-10-суточные СПФ-эмбрионы кур, инфицированные в аллантоисную полость разведениями

вирусодержущего материала. Величину инфекционного титра рассчитывали по Спирмену – Керберу.

Определение безвредности вакцин. Живую вакцину проверяли на 10-14-суточных цыплятах интраназально в 10-кратной дозе, инаktivированную вводили 30-120-суточным птицам в двукратной дозе внутримышечно в объеме 1,0 см³.

Определение антигенной активности вакцин. Поствакцинальные титры антител к вирусам ГП и НБ исследовали через заданные интервалы времени в РТГА.

Определение гемагглютинирующей активности вируса в реакции гемагглютинации (РГА) проводили по общепринятой методике.

Определение индекса интрацеребральной патогенности (ICPI) вируса для суточных цыплят и индекса внутривенной патогенности (IVPI) для 6-недельных цыплят проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗЖ (глава 3.3.10 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам).

Оценка результатов контрольного заражения вакцинированных птиц. Через 28 суток после вакцинации в группах иммунизированных и интактных птиц проводили контрольное заражение и в течение 8-10 суток регистрировали количество больных и погибших птиц, а также сроки обнаружения генома вирусов заражения у вакцинированной птицы методом ОТ-ПЦР.

Определение протективной активности инаktivированных вакцин проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по оценке титра 50-процентных протективных доз (PD₅₀) для инаktivированных вакцин против вирусных болезней птиц» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2024 г.). Готовили образцы вакцины, содержащие цельный антиген и в разведениях 1:25, 1:50 и 1:100. Для вычисления показателя PD₅₀ применяли регрессионный анализ.

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

Статистическая обработка данных. Использовали стандартные методы обработки выборок n-числа варьирующих переменных. Определяли средние оценки, стандартные отклонения выборок и стандартные отклонения средних. Статистические различия эмпирических средних оценок считали существенными при $p \leq 0,05$. 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 РФ

С 2005 по 2018 гг. болезнь Ньюкасла практически ежегодно регистрировали в популяциях домашней птицы в 15 субъектах РФ (рисунок 1). Вспышки регистрировали преимущественно в ЛПХ на невакцинированном поголовье. Важно отметить вспышки НБ в Республике Крым в 2015-2016 гг., где впервые на территории РФ был выделен вирус НБ субгенотипа VII i.



Рисунок 1 – Неблагополучные пункты по болезни Ньюкасла на территории РФ в 2005-2023 гг.

За 2019 г. было зарегистрировано 18 неблагополучных пунктов по НБ в девяти регионах страны. Выделенные изоляты вируса НБ были генетически гомогенны и относились к новому субгенотипу VII L, впервые описанному в 2017г. в Иране. До 2019 г. высоковирулентные изоляты ВНБ, выделяемые на территории РФ, относились к субгенотипам VII d, VII h и VII i.

В 2020 г. новый для России ВНБ субгенотипа VII.1.1 (VII L) продолжил свое распространение и было зарегистрировано 15 неблагополучных пунктов. В 2021 г. зарегистрировано пять вспышек НБ в стадах домашних кур в Центральном, Дальневосточном и Уральском федеральных округах. В 2022 г. на территории РФ

установлено 16 неблагополучных пунктов в шести регионах, а в 2023 г. - 13 неблагополучных пунктов по НБ в семи регионах страны.

Таким образом, можно сделать вывод, что возбудитель НБ распространен практически на всей территории страны. С 2019 г. по настоящее время выявленные вирусы НБ отнесены к субгенотипу VII L.

По ВГП эпизоотическая ситуация как в мире, так и в России, остается крайне напряженной. Первая волна эпизоотии (2005-2007 гг.) была обусловлена вирусом ВГП подтипа H5N1 клады 2.2. В результате было уничтожено около трех млн голов птиц с/х назначения. С 2007 по 2024 гг. на территории РФ нотифицировано 290 неблагополучных пунктов по ВГП в ЛПХ, 103 вспышки заболевания дикой птицы и карантинировано 49 птицефабрик (рисунок 2).

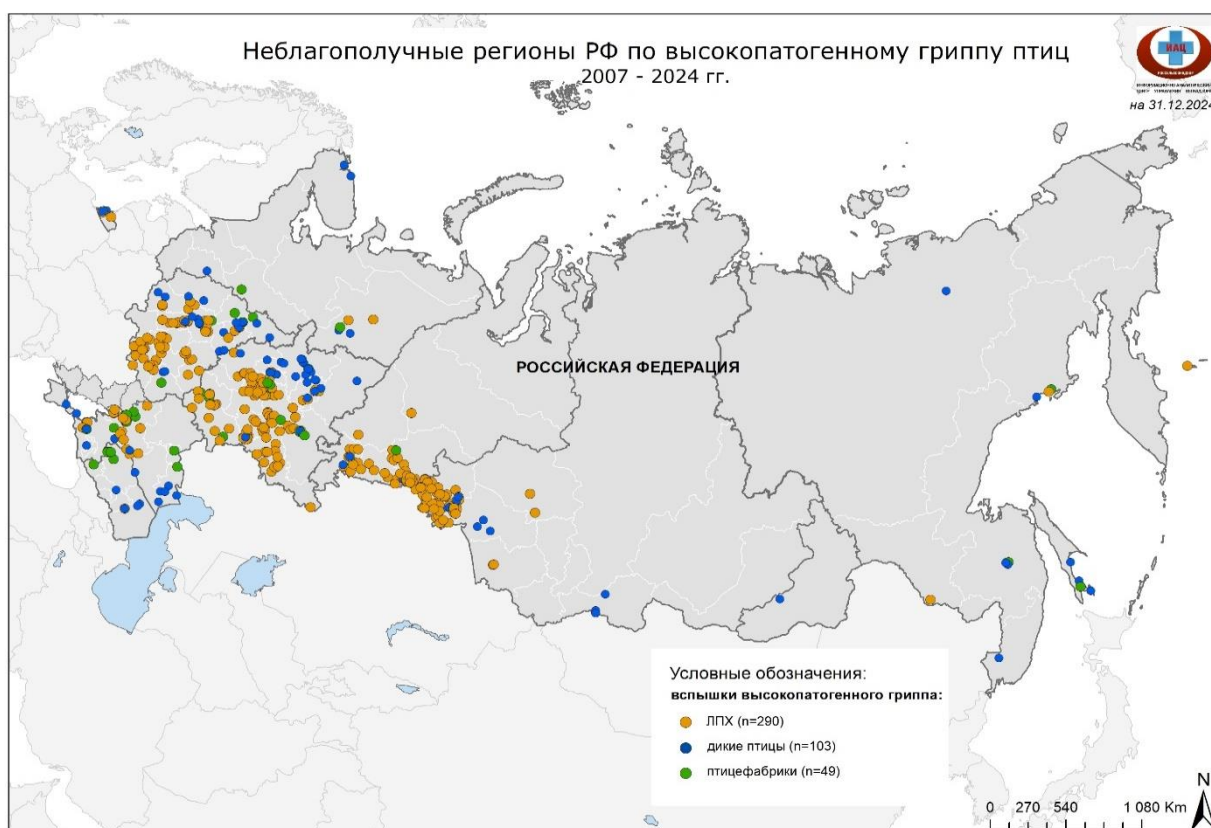


Рисунок 2 – Неблагополучные пункты по высокопатогенному гриппу птиц на территории РФ в 2007-2024 гг.

Несмотря на принятую в стране стратегию ограниченной целевой вакцинации птиц в ЛПХ, не удаётся полностью предотвратить распространение вируса и его занос в крупные промышленные предприятия закрытого типа. В 2016-2025 гг. случаи ВГП в РФ вызваны вирусами клады 2.3.4.4b (H5N8, H5N2, H5N5 и H5N1). С 2021 г. превалирует вирус H5N1. Всего с 2016 по 2024 гг. пало и уничтожено из-за ВГП более 20 млн голов птицы.

Анализ ситуации в стране по ВГП (Н5) и НБ (субгенотип VII L) показывает, что эпизоотический процесс продолжается с разной степенью интенсивности по регионам и временным периодам.

3.2 Эффективность вакцин против болезни Ньюкасла в отношении актуальных вирусов VII генотипа

Обострение эпизоотической ситуации по НБ в 2019 г. и распространение вируса генотипа VII на территории РФ послужили основанием для проведения экспериментов с заражением птиц актуальными изолятами вируса НБ субгенотипа VII L для оценки протективной активности живых и инактивированных вакцин при разных схемах применения.

Было сформировано три опытных группы 14-суточных цыплят яичного направления (по 30 гол.) и одна контрольная (90 гол.). Группа №1 была привита однократно живой вакциной против НБ из штамма «Ла-Сота», группа №2 двукратно этой же вакциной, группа №3 двукратно живой вакциной и однократно инактивированной ассоциированной вакциной, содержащей антиген НБ. Живую вакцину применяли интраназально в одной иммунизирующей дозе $6,7 \lg \text{ЭИД}_{50}$, а инактивированный препарат - внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$.

Контрольное заражение цыплят проводили в соответствии с «Руководством ВОЗЖ по диагностическим тестам и вакцинам» через 21 день после иммунизации живыми вакцинами и через 28 дней после инактивированной. Использовали три изолята ВНБ VII генотипа: «Калининград», «Крым», «Краснодар» в дозах $5,9$; $6,6$ и $6,9 \lg \text{ЭИД}_{50}$, соответственно, внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$. Срок наблюдения после заражения составил 8 дней.

После контрольного заражения регистрировали клиническое проявление НБ, гибель заболевших особей и определяли показатель иммунной защиты - протективный индекс (Pr). В таблице 1 представлены результаты исследований.

Таблица 1 – Протективный эффект различных схем вакцинации против ньюкаслской болезни при заражении цыплят вирусами НБ генотипа VII

Схема вакцинации цыплят	Протективный индекс (Pr)* при заражении вирулентным штаммом вируса НБ		
	«Крым»	«Краснодар»	«Калининград»
Однократно живая «Ла-Сота»	8/10** (Pr = 0,80)	4/10 (Pr = 0,40)	10/10 (Pr = 1)
Двукратно живая «Ла-Сота»	10/10 (Pr = 1)	10/10 (Pr = 1)	10/10 (Pr = 1)
Двукратно живая «Ла-Сота» и инакт. вакцина	10/10 (Pr = 1)	10/10 (Pr = 1)	10/10 (Pr = 1)
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 числа защищенных к общему количеству зараженных цыплят.

Из данных, представленных в таблице 1, следует что во всех контрольных группах при проведении трёх этапов заражения наблюдали гибель всех невакцинированных цыплят (в интервале от трех до семи суток после заражения). Все испытанные изоляты ВНБ генотипа VII были высоковирулентными.

Эффективность защиты после однократной вакцинации в группах цыплят, заражённых высоковирулентными ВНБ, варьировала от 40 до 100% и, очевидно, зависела от конкретного вируса для заражения. Наибольший протективный индекс после однократной вакцинации был отмечен в отношении изолята «Калининград» субгенотипа VII h ($Pr=1$), наименьшую защиту наблюдали в отношении вируса «Краснодар» субгенотипа VII L ($Pr=0,4$).

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

В таблице 2 представлены результаты изучения гуморального иммунитета.

Таблица 2 – Динамика титров антител у цыплят, иммунизированных с использованием различных схем вакцинации против НБ

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

Приведенные в таблице 2 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 $\log_2$), не имели статистической разницы ($p>0,05$). Дополнительная иммунизация цыплят инактивированной вакциной приводила к значительному приросту титров антител ($p<0,001$).

Для схем вакцинации с использованием только живых вакцин наблюдался статистически значимый ($p<0,001$) прирост титров антител после контрольного заражения. При использовании бустерной вакцинации изменений титра антител после контрольного заражения не происходило.

Таким образом, было установлено, что изучаемые вакцины эффективны для профилактики НБ, вызываемой вирулентным вирусом НБ VII генотипа при использовании в определённой схеме вакцинации. Схема с двукратным использованием живых вакцин предотвращала гибель птиц и клиническое проявление болезни, но не предотвращала репродукцию вируса. Схема бустерной вакцинации с использованием живых и инактивированной вакцин предотвращала гибель, клинические признаки болезни и репликацию вирулентного вируса.

Полученные данные свидетельствуют о возрастании вирулентности циркулирующего в настоящее время возбудителя НБ и способности вируса субгенотипа VII L преодолевать поствакцинальный иммунитет, создаваемый живыми вакцинами. Научный интерес представляло изучение вакцин против НБ других производителей в опыте с заражением изолятом НБ субгенотипа VII L.

Во втором опыте было сформировано шесть опытных групп цыплят яичного направления в возрасте от 0 до 15 суток. Цыплята группы № 1 были привиты вакциной «Вектормун ND» в день вывода однократно внутримышечно. В возрасте 15 суток цыплята группы № 2 были привиты вакциной «Хиправиар S» однократно методом выпаивания, группы № 3 вакциной «Севак Витапест L» однократно окурально, групп № 4-5 вакциной «Ла-Сота» методом выпаивания. Цыплят группы №5 прививали повторно вакциной «Ла-Сота» тем же методом в возрасте 25 суток.

Иммуногенность вакцин оценивали по результатам контрольного заражения цыплят в возрасте 35 суток вирусом НБ субгенотипа VII L «Краснодар».

Соответственно, образованным группам определяли показатели смертности (Le), клинического индекса (C) и протективного индекса вакцин ($Pr=1-C$). Кроме этого, определяли титры антител к ВНБ до (T_0) и после заражения (T_1), на основании которых вычисляли коэффициент прироста антител ($K = T_1/T_0$), как показателя репродукции вируса в иммунном организме. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Протективное действие коммерческих вакцин против НБ после заражения цыплят ВНБ изолят «Краснодар» субгенотипа VII L

Показатель	Вакцины (прививные дозы, lg ЭИД ₅₀)					
	Вектормун (-)	Хиправиар (≥ 6,5)	Севак Витапест * (≥ 5,5)	Ла-Сота однократно (≥ 7,7)	Ла-Сота двукратно (≥ 7,7)	Контроль
Le	2/4** (50%)	4/5 (80%)	4/4 (100%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)
C	4/9 (44%)	5/10 (50%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	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
log ₂ T ₀	2,3±0,2	4,4±0,6	2,8±0,5	4,8±0,5	6,5±0,5	-
log ₂ T ₁	7,3±0,5	11,7±0,2	10,5±1,0	11,2±0,4	11,0±0,4	-
log ₂ K	5,0±0,5	7,3±0,6	7,7±1,1	6,4±0,6	4,5±0,6	-

Примечания: * - вакцинацию проводили окурально согласно инструкции по применению;

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

Из данных таблицы 3 следует, что изолят «Краснодар» ВНБ вызывал 100% смертность в интервале от пяти до семи суток после заражения для не вакцинированных цыплят. Возбудитель способен был преодолеть поствакцинальный иммунитет в четырех из пяти случаев по показателю заболеваемости. Исключение составила двукратная прививка вакциной из штамма

«Ла-Сота» - отмечали абсолютную 100% защиту от гибели. В отношении тестируемого штамма из изученных препаратов наименьшую эффективность показала вакцина «Хиправиар» при пероральном применении в дозе 6,5 lg ЭИД₅₀ (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 привитых векторной вакциной из девяти цыплят заболело пять, из которых два погибло в ходе опыта (одна голова выбыла из опыта до контрольного заражения). В группе птиц иммунизированных однократно вакциной «Ла-Сота» гибели птиц не отмечено, однако два цыпленка из 10 заболели. Наибольшей иммунной активностью обладала птица, привитая двукратно вакциной «Ла-Сота» - после заражения все птицы были здоровы.

В следующем опыте изучали эффективность различных схем вакцинаций против НБ при комбинации векторной или инактивированной вакцин с живыми препаратами. Для этого 210 голов бройлеров суточного возраста разделили на семь групп по 30 голов. Схема опыта представлена в таблице 4.

В опыте использовали следующие вакцины против НБ: «Gallimune ND» (далее Галлимун) - инактивированная на основе ВНБ штамма «Ulster 2C» с добавлением масляного адьюванта; «Авинью Хатчпак» (далее Авинью) - живая на основе штамма «VG-GA»; «Векормун ND» (далее Векормун) - живая, векторная на основе штамма герпес вируса индеек с экспрессией фрагмента генома ВНБ, кодирующего белок F; «Хиправиар В1» (далее В1Хипра) - живая на основе штамма «В1»; «Хиправиар-Клон» - живая на основе клонированного штамма «Ла-Сота».

Таблица 4 – Схема опыта по изучению эффективности комбинаций вакцин против НБ в отношении субгенотипа VII L

Номер группы	Возраст вакцинации, сут.	Метод вакцинации	Возраст заражения, сут.
№1. Отрицательный контроль	-	-	-
№2. Контроль вируса	-	-	13
№3. Контроль вируса	-	-	28
№4. Галлимун+Авинью	1	Подкожно+интраокулярно	13
№ 5. Галлимун +Авинью +Авинью	1 +14 Авинью	Подкожно +спрей + интраокулярно	28
№ 6. Векормун +В1Хипра	1	Подкожно+интраокулярно	13
№7. Векормун +В1Хипра+ХипраКлон	1 +14 Хипра	Подкожно+спрей +интраокулярно	28

Контрольное заражение цыплят в возрасте 13 и 28 суток, проводили вирусом НБ NDV/chicken/Rus/Khanty-Mansy/1240-1/21 генетической группы VII L внутримышечно в дозе 6,4 lg ЭИД₅₀/0,5см³ (таблица 5).

Данные таблицы 5 демонстрируют, что после заражения в возрасте 13 суток патогенное действие ВНБ для опытных групп было выражено в разной степени: в группе №2 летальность составила 84%, что, вероятно, было связано с наличием остаточного материнского иммунитета; в группе №4 протективный индекс составил величину 0,16 при летальности 57%; в группе №6 протективный индекс составил также 0,16, но при значении летальности 76%.

Таким образом, вакцинированные цыплята были не защищены от заражения вирулентным вирусом НБ субгенотипа VII L. Однако, смертность цыплят в группе №4 была ниже, чем в группе №6.

Таблица 5 – Протективное действие комбинаций вакцин против болезни Ньюкасла при заражении цыплят вирусом НБ субгенотипа VII L

Номер группы	Летальность, %	Клинический индекс (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 +В1Хипра+ХипраКлон	13/21 (61%)	21/27 (C ₁ =0,78)	6/27 (Pr=0,22)

Примечание: * - $P = (C_0 - C_1)/C_0$, где: C₀ - клинический индекс в контрольной группе; C₁ - тоже в вакцинированной группе; ** - в числителе частота признака, в знаменателе - общее число исследований.

После заражения цыплят в возрасте 28 суток патогенное действие ВНБ для подопытных групп также было выражено по разному: в группе №3 погибло 100% птицы; в группе №5 протективный индекс составил 0,52 при значении летальности 57%; в группе №7 протективный индекс составил 0,22 при летальности 61%.

Из полученных данных следует, что наиболее эффективная схема вакцинации против НБ была применена в группе №5, где сохранность была наиболее высокой. Можно сделать вывод, что схемы вакцинации с применением живых и инактивированных вакцин являются более эффективными для защиты цыплят-бройлеров от заражения ВНБ субгенотипа VII L.

В таблице 6 представлены данные серологических исследований к вирусу НБ, которые показывают, что у цыплят всех групп отрицательного контроля происходило снижение материнского иммунитета. У цыплят групп №4 и №5, вакцинированных инактивированной вакциной, наблюдали увеличение титров

специфических антител, а в группах №6 и №7 цыплят, вакцинированных векторной вакциной, титр антител был сопоставим с уровнем у трехсуточных цыплят.

В группах цыплят №2, №4 и №6, заражённых в 13-суточном возрасте вирулентным ВНБ, происходило достаточно резкое нарастание титров антител на фоне высокой смертности, как результат гуморального ответа на заражение. Более высокая сохранность наблюдали в группах №5 и №7, где цыплята были вакцинированы двукратно, перед заражением в 28 суток. К этому моменту титр поствакцинальных антител достиг более высокого уровня, что обеспечило повышение сохранности в группах. Наиболее высоких показателей к 28 суткам титр достигал в группе №5 (вакцинированы инактивированной и двукратно живыми вакцинами), что обеспечило наибольшую сохранность после заражения.

Таблица 6 - Динамика гуморального иммунного ответа цыплят, привитых вакцинами против НБ в различных комбинациях

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

Анализируя данные серологических тестов пришли к заключению, что уровень антител 5 $\log_2$, принятый как защищающий птицу от падежа (Allan W.H. et al., 1978), при заражении вакцинированной птицы вирусом НБ субгенотипа VII L оказался недостаточным.

По данным ПЦР исследований было установлено, что у птиц после контрольного заражения, независимо от использованных схем вакцинации, геном высоковирулентного ВНБ выделялся в ротоглоточных и клоакальных пробах, а также в помете в течение 7-10 суток после заражения. Наибольшая концентрация выделенного генетического материала вируса НБ, независимо от способа вакцинации, отмечалась в первые четверо суток после заражения. Однако, при использовании схемы с двукратной вакцинацией вирулентный вирус элиминировался из организма птицы быстрее, чем при использовании однократной вакцинации, на фоне меньшей заболеваемости и смертности. При исследовании положительных проб методом секвенирования во всех пробах был выявлен геном ВНБ VII генотипа, что говорит об элиминации вакцинных живых штаммов в

организме птицы к моменту контрольного заражения и активной репликации вируса-пробойника в первые сутки после заражения в тканях вакцинированной птицы независимо от схемы вакцинации.

Представленные опыты по изучению протективного действия различных вакцин для профилактики НБ против субгенотипа VII L свидетельствуют о необходимости разработки новых иммунобиологических препаратов.

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

Задачей настоящих исследований являлась сравнительная оценка иммунологических свойств двух вариантов инаktivированных вакцин, изготовленных на основе антигенов штамма «ВНИИЗЖ G7» субгенотипа VII L и штамма «Ла-Сота» генотипа II ВНБ.

Антигены НБ «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» содержали 8 и 10 $\log_2$ ГАЕ, с инфекционной активностью до инаktivации 9,25 и 10,25 ЭИД₅₀/см³, соответственно. На основе антигенов и адьюванта Montanide ISA70 готовили образцы вакцин, имеющие следующую концентрацию антигена (D): 1(цельный); 1:25, 1:50 и 1:100.

Цыплятам яичного кросса в возрасте четырёх недель вводили образцы вакцин внутримышечно в объеме 0,5 см³. Заражение проводили через 28 суток ВНБ NDV/by/chicken/612/2021 в дозе 6,0 lg ЭИД₅₀/0,5 см³ внутримышечно.

Результаты наблюдений после контрольного заражения выражали в виде клинических показателей и индексов защиты. Из результатов следует: а) антигенная активность и протективный эффект обоих препаратов зависели от концентрации антигенов в прививном объеме; б) титры антител всегда были выше при использовании в РТГА гомологичных антигенов; в) препарат на основе антигена «ВНИИЗЖ G7» (гомологичный заражающему штамму) демонстрировал высокий протективный эффект (таблица 7).

Строили регрессионные модели (Pr по lgD), используя которые вычисляли дозы антигена, обеспечивающие защиту 50% (PD50). Установили, что прививной объем цельной вакцины на основе антигена «ВНИИЗЖ G7» содержал 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 выше.

Таблица 7 - Иммуногенность инактивированных вакцин на основе антигенов НБ «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» при заражении цыплят ВНБ VII L

Вакцина на основе антигена	Доза антигена (D)	Результаты РТГА соответственно антигену, $\log_2(T \pm s)$		Клинический индекс С $C = (\sum C + \sum L_e) / n$	Протективный индекс Pr $Pr = 1 - C$
		«Ла-Сота»	«ВНИИЗЖ G7»		
«ВНИИЗЖ G7»	1	3,55±0,3	5,60±0,6	0/10	1,0
	1:25	3,33±0,3	5,67±0,6	0/10	1,0
	1:50	3,43±0,5	5,43±0,7	3/10	0,7
	1:100	1,25±0,3	3,00±0,6	5/10	0,5
«Ла-Сота»	1	6,00±0,4	3,61±0,4	0/10	1,0
	1:25	6,00±0,6	3,44±0,4	2/10	0,8
	1:50	4,33±0,4	2,83±0,4	7/10	0,3
	1:100	3,50±0,8	1,83±0,3	7/10	0,3
Контроль	не вакцин.	2,10±1,6	1,8±1,2	10/10	0,0

Таким образом, установлено, что эмульсионная инактивированная вакцина против НБ, изготовленная на основе антигена «ВНИИЗЖ G7», по интенсивности гуморальной иммунной реакции и протективному действию против высоковирулентного вируса субгенотипа VII L, распространенного в РФ с 2019 г., продемонстрировала более высокую эффективность, чем аналогичный препарат на основе антигена из штамма «Ла-Сота». На основании полученных данных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» было принято решение о разработке инактивированных вакцин против НБ, включающих в свой состав актуальный для РФ вирус НБ субгенотипа VII L.

3.4 Разработка инактивированной вакцины против болезни Ньюкасла субгенотипа VII L «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Следующим этапом исследований являлась разработка нового препарата, способного защитить птицу от циркулирующих на территории РФ высоковирулентных изолятов ВНБ. В результате был выделен изолят ВНБ субгенотипа VII L и изучены его иммунобиологические свойства. Полученный изолят адаптирован к системам промышленного культивирования и депонирован во Всероссийскую государственную коллекцию экзотических типов вируса ящура и других патогенов животных в качестве производственного штамма «ВНИИЗЖ G7».

В процессе разработки новых препаратов были проведены исследования по определению оптимального состава, способа 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 ВНБ штамма «ВНИИЗЖ G7» ($8 \log_2$ ГАЕ) и штамма «Ла-Сота» ($10 \log_2$ ГАЕ), а также антиген

вируса ГП смеси штаммов «A/chicken/Amursky/03/12/H9N2» и «Челябинск-20» ($9 \log_2$ ГАЕ). Инфекционная активность вирусов НБ штаммов «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» до инаktivации составляла $9,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и $10,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. Соотношение материалов разных штаммов гриппа птиц («A/chicken/Amursky/03/12/H9N2» и «Челябинск-20» с инфекционной активностью до инаktivации $9,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и $9,5 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, 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 с адьювантом в весовом соотношении 30:70.

Птицу опытных групп кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 50 суток иммунизировали в прививном объеме $0,5 \text{ см}^3$ соответственно номеру образца вакцины, контрольная группа оставалась интактной. Через 28 суток в РТГА оценивали титры антител к испытанным антигенам (таблица 8).

Таблица 8 - Активность сывороток в РТГА соответственно пропорции антигенных компонентов «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти»

Номер группы	Объемное соотношение антигенов	Титр антител ($T \pm s, \log_2$) к вирусам		
		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.

Было установлено, что на 28 сутки после прививки у птицы сформировался напряженный иммунитет, индуцированный антигенами, входящими в состав испытуемых препаратов. При этом гуморальный иммунный ответ в группах к разным штаммам вирусов был не одинаков. Величина титра антител к вирусу ГП возрастала с увеличением количества антигена, в среднем от $7,0$ до $9,1 \log_2$. Увеличение объема антигена ГП в образце №4 на 15 % усилило интенсивность антителообразования у птицы до 4,2 раз. Титры антител к штамму «Ла-Сота» ВНБ в вакцинированных группах находились в значительно более узком диапазоне, границы которого составляли $8,9 \div 10,2 \log_2$. Изменение объема антигена «ВНИИЗЖ G7» в большую сторону, как и в случае с антигеном ГП, привело к усилению гуморальной иммунной реакции птицы. Наибольшую концентрацию антител наблюдали в группе №3 с максимальным количеством антигена G7 ВНБ.

Таким образом, наиболее эффективным и экономически обоснованным является вариант вакцины с соотношением антигенов 40:20:40.

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

на птице кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 1, 15, 30 и 70 суток при условии разной вариации прививной дозы (0,25 см³, 0,5 см³, и 1 см³). До иммунизации и через 7, 14, 21 и 28 суток после прививки отбирали кровь для исследований.

Использованная в эксперименте коммерческая птица до вакцинации имела высокий уровень гуморального иммунитета против НБ, который, очевидно, не влиял на развитие поствакцинальной иммунной реакции (таблица 9).

Таблица 9 – Динамика гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» соответственно составляющим антигенам, возрастным группам птиц и дозам

Возраст, сутки	Прививная доза	Титр антител в РТГА (log ₂ T±s) после вакцинации, сутки				
		0	7	14	21	28
Антиген вируса НБ штамма «Ла-Сота»						
1	0,25	6,9±0,5	5,5±0,3	6,4±0,2	7,7±0,2	8,8±0,2
	0,5		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	7,3±0,5	6,4±0,4	5,9±0,2	7,8±0,3	9,8±0,2
	0,5		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	6,4±0,4	5,9±0,2	6,2±0,2	6,5±0,2	7,6±0,2
	0,5		6,3±0,3	6,6±0,2	8,1±0,2	9,8±0,2
	1,0		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	0,5	5,8±0,4	5,4±0,2	6,8±0,3	8,0±0,2	9,4±0,2
	1,0		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 НБ штамма «ВНИЗЖ G7»						
1	0,25	5,4±0,2	4,4±0,4	3,7±0,3	7,3±0,3	7,9±0,2
	0,5		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
15	0,25	5,3±0,5	4,4±0,5	4,4±0,4	7,2±0,4	7,8±0,2
	0,5		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	5,0±0,4	3,9±0,5	4,6±0,2	4,9±0,2	4,3±0,3
	0,5		4,3±0,3	4,8±0,2	7,0±0,2	7,7±0,2
	1,0		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	0,5	4,6±0,5	3,9±0,4	4,9±0,4	7,2±0,3	7,3±0,1
	1,0		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	н/о	н/о	4,0±0,2	6,8±0,3	7,6±0,2
	0,5		н/о	4,5±0,2	6,6±0,3	7,6±0,2

15	0,25	н/о	н/о	3,9±0,4	6,5±0,1	7,7±0,2
	0,5		н/о	4,1±0,3	6,1±0,2	7,4±0,2
30	0,25	н/о	н/о	3,9±0,3	4,5±0,3	4,5±0,2
	0,5		н/о	4,3±0,3	6,4±0,1	7,5±0,1
	1,0		н/о	3,7±0,3	6,3±0,3	7,8±0,3
70	0,5	н/о	н/о	4,0±0,3	6,6±0,3	6,7±0,2
	1,0		н/о	4,2±0,2	6,4±0,2	7,1±0,2
Контроль		н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Наибольшие титры антител были отмечены через 28 суток после вакцинации. Величины титров антител 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, по сравнению с дозами в объемах 0,5 и 1,0 см³. Достижение протективного титра против ВНБ (5,0 log₂), учитывая регрессию титров в контроле, к вирусу «Ла-Сота» наступало через 14 суток после прививки и через 21 сутки к вирусу G7. Аналогичный показатель против вируса ГП (4,0 log₂) в большинстве позиций имел место после 14 суток.

Данные таблицы 9 позволяют считать, что «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» может индуцировать гуморальную реакцию птицы против НБ и ГП при всех заданных условиях. Однако, для 30-суточного возраста вакцина проявляет слабую антигенную активность в прививном объеме 0,25 см³, поэтому целесообразно выбрать рабочий объем вакцины 0,5 см³. Птице суточного возраста для выработки минимально необходимого уровня антител достаточно прививного объема 0,25 см³.

Оценка продолжительности поствакцинального гуморального иммунитета после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти». Опытная группа птиц (20 гол.) кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 30 суток была иммунизирована вакциной внутримышечно в объеме 0,5 см³. Контроль (10 гол.) не вакцинировали. Через 28, 90, 180, 270 и 360 суток определяли титры антител в РТГА. Результаты представлены на рисунке 3.

Данные рисунка 3 демонстрируют, что титры антител, установленные через 180 суток (log₂T: 10,2 – НБ «Ла-Сота»; 9,4 – НБ «ВНИИЗЖ G7»; ГП Н9N2 – 9,2), значительно превышали величины, обеспечивающие протективный эффект против НБ (log₂T ≥ 5,0) и против ГП (log₂T ≥ 4,0). Исследования, проведенные через 270 суток, показали, что оценки титров РТГА с антигеном «Ла-Сота» не изменились, титр с антигеном «ВНИИЗЖ G7» снизился на 1 log₂ (p<0.05) и значительно сократился с антигеном ГП Н9N2 (p<<0.05). Полученные через 360 суток данные титров антител соответственно антигенов составили (log₂): НБ «Ла-Сота» - 9,5; НБ «ВНИИЗЖ G7» – 7,9; ГП Н9N2 – 3,5.

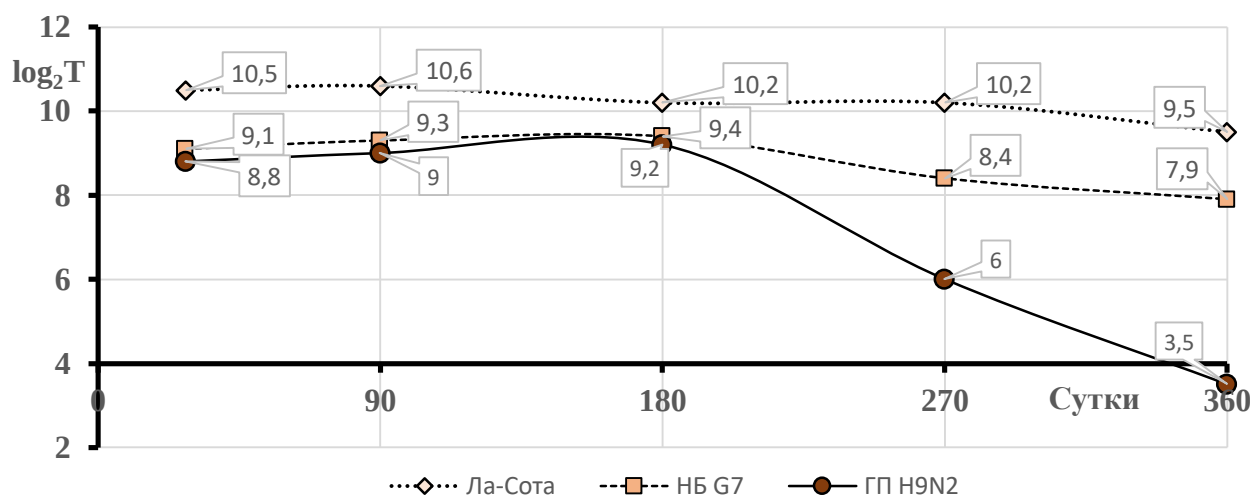


Рисунок 3 – Динамика титров антител в РТГА ($\log_2 T$) после иммунизации птиц вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти», соответственно антигенам: НБ Ла-Сота, НБ G7, ГП Н9N2. Горизонтальная ось координат построена из точки $\log_2 T=4$, которая соответствует нижней критической границе протективного титра антител к вирусу ГП. Оценки титров антител в контрольной группе не достигали положительных величин ($\log_2 T < 2,0$).

Так как, уровень антител к ГП Н9N2 через 360 суток был ниже границы протективного уровня, то считали, что вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» способна обеспечить протективный гуморальный иммунитет по всем составляющим валентностям в течение не менее 270 суток, т.е. девять месяцев после прививки.

Определение безвредности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти». Птицам кросса «Хайсекс Браун» 30, 80 и 120-суточного возраста подкожно и внутримышечно вводили образец вакцины в двукратном прививном объёме 1,0 см³. Клинические наблюдения за птицами в течение 21 суток не выявили каких-либо изменений в их поведении и общем состоянии. При патологоанатомическом осмотре мест введения вакцины каких-либо изменений в тканях в области инъекции не установлено. Таким образом, вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» при применении в повышенной дозе безвредна для птиц.

Клинические испытания вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в производственных условиях. Исследования проводили на ремонтном молодняке кросса «Ross-308» 43-45-суточного возраста в количестве 120154 головы в производственных условиях ЦРМ «Бутырки-1» липецкого филиала АО «Куриное царство» (АО «КЦ»). Птице внутримышечно вводили вакцину в объёме 0,5 см³.

После вакцинации у привитых птиц не наблюдали каких-либо изменений в клиническом состоянии и воспалительные реакции в местах введения препарата. В промышленных условиях вакцина обусловила напряженный иммунитет к вирусам ГП Н9 и НБ у 99% поголовья (рисунок 4).

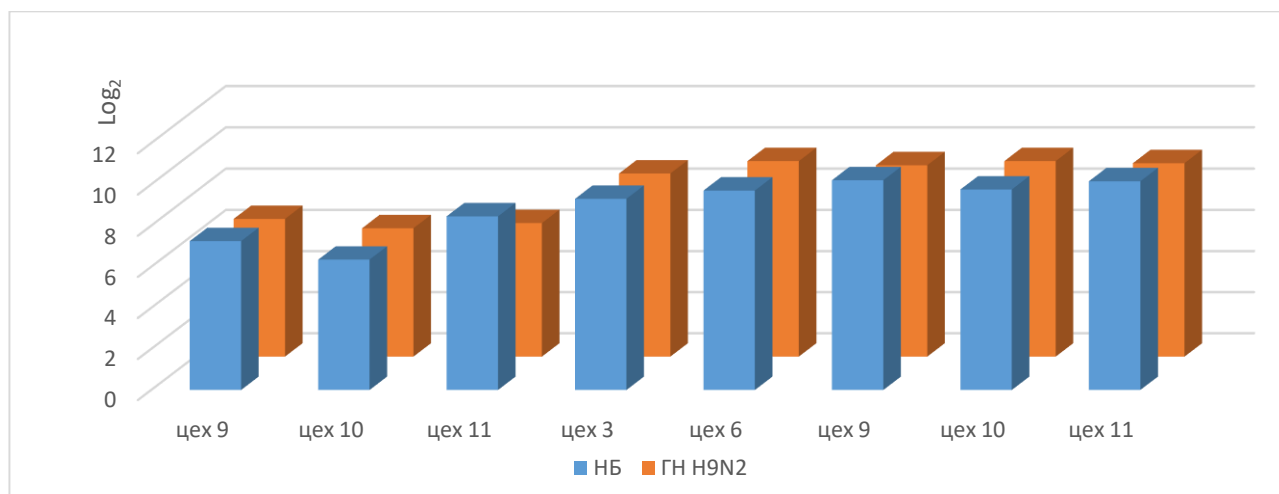


Рисунок 4 – Оценка гуморального иммунитета к вирусам НБ и ГП Н9 у кур через 28 суток после применения вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» в условиях хозяйства ЦРМ «Бутырки-1»

Применение вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» оказало положительное влияние на сохранность иммунизированного поголовья птиц, которая составила 96,5-98,6%.

На основании 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»». Препарат зарегистрирован 06.02.2024 г.

3.5 Разработка инактивированной вакцины с ВНБ субгенотипа VII L «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Для обеспечения птицефабрик, не применяющих вакцинацию против низкопатогенного гриппа птиц Н9Н2, высокоэффективными средствами профилактики против актуального ВНБ субгенотипа VII L, была разработана полиштаммовая вакцина («Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7») против НБ «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти».

Обоснование оптимального компонентного состава вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти». В эксперименте использовали антигены вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ G7» и штамма «Ла-Сота» с активностью в РГА и титром инфекционной активности до инактивации $8 \log_2$ ГАЕ и $9,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ и $10 \log_2$ ГАЕ, и $10,25 \text{ ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, соответственно. Было приготовлено три образца вакцины с заданными объемными долями антигенов НБ «ВНИИЗЖ G7» и НБ «Ла-Сота»: 30:70; 50:50 и 70:30, соответственно.

Птицу кросса «Хайсекс Браун» 50-суточного возраста иммунизировали вакциной в прививном объеме $0,5 \text{ см}^3$, соответственно номеру образца препарата. Контрольная группа оставалась интактной. Через 28 суток в РТГА оценивали титры антител к испытанным антигенам. Полученные результаты приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Активность сывороток в РТГА соответственно пропорции антигенных компонентов, входящих в состав образцов вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Номер группы	Соотношение антигенов НБ G7 : НБ«Ла-Сота»	Титр антител ($\log_2 T$) к антигенам вирусов	
	Объемные %	НБ G7	НБ «Ла-Сота»
1	30:70	7,0 $\pm$ 0,37	10,6 $\pm$ 0,48
2	50:50	8,4 $\pm$ 0,34	9,9 $\pm$ 0,55
3	70:30	8,9 $\pm$ 0,28	9,0 $\pm$ 0,37
Контроль		1,3 $\pm$ 0,37	1,7 $\pm$ 0,21

Из данных таблицы 10 следует, что после вакцинации диапазон групповых титров к антигену «ВНИИЗЖ G7» составил от 7,0 до 8,9 $\log_2$, к «Ла-Сота» - от 9,0 до 10,6 $\log_2$. При увеличении доли антигена величина титров антител возрастала.

Пришли к заключению, что оптимальным соотношением антигенов НБ «ВНИИЗЖ G7»:НБ «Ла-Сота» в вакцине «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» следует считать 70:30.

Исследование динамики поствакцинальной гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти». Исследования проводили на птице кросса «Хайсекс Браун» разных возрастных групп (1-, 15-, 30- и 70-суток) общим количеством 140 голов. Вакцину вводили в дозе 0,25 см³, 0,5 см³ и 1,0 см³. Коммерческая птица до вакцинации обладала гуморальным иммунитетом против НБ различной напряженности, который, очевидно, не оказал влияния на развитие поствакцинальной иммунной реакции (таблица 11).

Таблица 11 - Динамика гуморальной иммунной реакции после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», соответственно составляющим антигенам, возрастным группам и иммунизирующим дозам

Возраст, сутки	Прививная доза, см ³	Титр антител в РТГА (log ₂ T±s) после вакцинации, сутки				
		До вакц.	7	14	21	28
Антиген вируса НБ штамма «Ла-Сота»						
1	0,25	6,3±0,3	5,3±0,1	6,5±0,2	7,1±0,2	8,4±0,2
	0,5		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	5,8±0,3	6,1±0,3	5,6±0,2	8,0±0,2	9,3±0,2
	0,5		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	5,5±0,2	5,4±0,3	6,2±0,2	6,4±0,3	7,2±0,1
	0,5		5,8±0,2	6,5±0,1	7,8±0,1	9,4±0,2
	1,0		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	5,0±0,3	5,8±0,2	5,4±0,2	6,6±0,2	6,6±0,2
	0,5		5,3±0,2	5,6±0,3	8,4±0,2	9,2±0,2
	1,0		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	4,4±0,3	5,3±0,1	3,6±0,2	6,6±0,2	7,6±0,3
	0,5		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	3,6±0,4	6,1±0,3	4,3±0,1	6,6±0,2	7,5±0,3
	0,5		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	3,5±0,6	5,4±0,3	4,5±0,2	5,0±0,2	7,2±0,1
	0,5		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	3,8±0,3	5,8±0,2	4,6±0,1	5,2±0,3	6,4±0,3
	0,5		5,3±0,2	5,0±0,1	6,7±0,1	7,0±0,1
	1,0		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

Наибольшая напряженность поствакцинального иммунитета наблюдалась на 28 сутки после вакцинации. Величина прививной дозы антигена 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 $\log_2$) был на 7-е сутки после вакцинации (возможно в совокупности с предшествующими антителами), для антигена «ВНИИЗЖ G7» - на 14 сутки.

Вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», при всех испытанных условиях, через 14 суток после прививки создавала у птиц гуморальный иммунитет против НБ на протективном уровне.

Оценка продолжительности поствакцинального гуморального иммунитета после прививки вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти». Птице кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 30 суток (20 гол.) вводили вакцину внутримышечно в объеме 0,5 см³. Контроль (10 гол.) не вакцинировали. Через 28, 90, 180, 270 и 360 суток определяли титры антител к вирусу НБ с антигенами «Ла-Сота» и G7. Результаты в графическом виде представлены на рисунке 5.

Таким образом, в интервале 180 -360 суток происходило снижение уровня антител, что было более выражено для антигена G7. На конец испытаний значения титров составили к антигену «Ла-Сота» - 8,4 $\log_2$, к «ВНИИЗЖ G7» -7,1 $\log_2$. Оба полученных 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 ($\log_2 T < 2,0$).

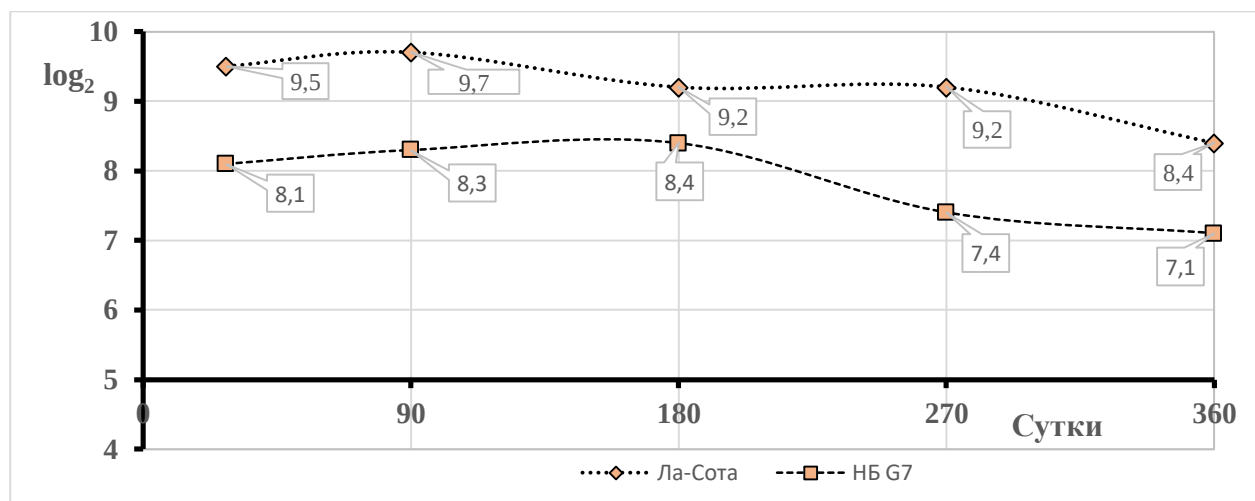


Рисунок 5 – Динамика титров антител в РТГА (Т, log₂) после иммунизации птиц вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», соответственно антигенам НБ «Ла-Сота» и НБ G7. Горизонтальная ось пересекает вертикальную в точке log₂T_{prot}=5, которая соответствует границе протективного титра антител к вирусу НБ.

Определение безвредности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти». Птицам кросса «Хайсекс Браун» трех возрастных групп (1-, 30- и 70-суток), каждая из которых была разделена на две подгруппы для подкожного и внутримышечного введения, вводили образец вакцины в двукратном прививном объеме 1,0 см³ цыплятам в возрасте 30 и 70 суток, суточным цыплятам – в объеме 0,5 см³ в две точки введения. Клинические наблюдения не выявили каких-либо изменений в общем состоянии птиц. Патологоанатомический осмотр мест введения вакцины не показал каких-либо патологических изменений в тканях в области инъекции.

Сделали заключение, что вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» безвредна для птиц как при подкожном, так и при внутримышечном введении.

Клинические исследования вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» в производственных условиях проводили на площадке АО «Птицефабрика Роскар». Использовали птиц ремонтного молодняка кросса «Ross-308» 135-суточного возраста в количестве 15 тыс. голов, и промышленных кур-несушек кросса «Хайсекс» в возрасте 60 суток в количестве 185 тыс. голов. Птице внутримышечно вводили вакцину в прививном объеме 0,5 см³.

На протяжении 28 суток после вакцинации у птиц не наблюдали каких-либо изменений в поведении и клиническом состоянии. Для оценки тканевых реакций проводили осмотр мест введения препарата у 25 голов из каждого птичника. Каких-либо патологических изменений тканей в области инъекции ни у одной птицы выявлено не было. Таким образом, было показано, что вакцина безвредна для птиц.

Результаты серологических исследований привитого поголовья показали высокие уровни антител к вирусу НБ двух штаммов, входящих в состав вакцины «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» (рисунок 6).

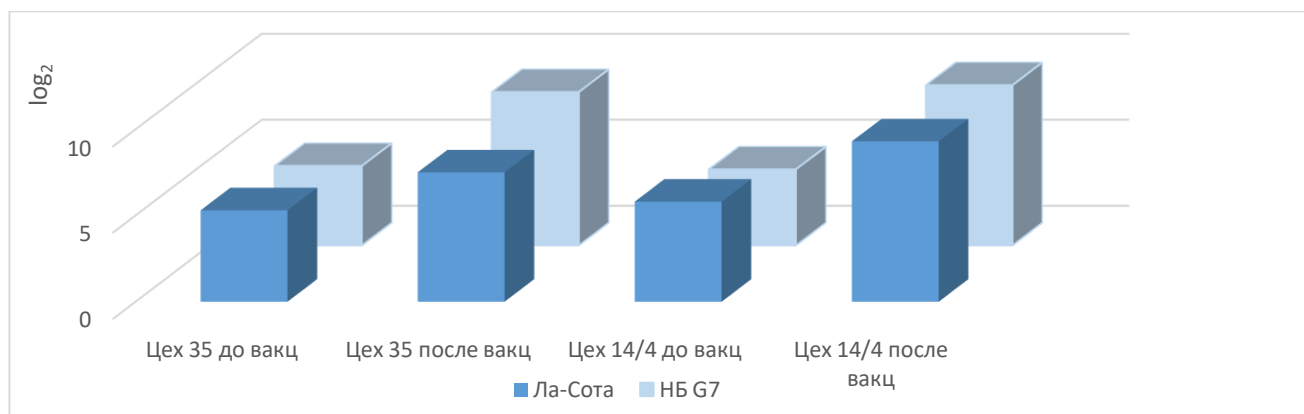


Рисунок 6 – Титры антител к вирусам НБ штаммов «Ла-Сота» и «ВНИИЗЖ G7» в сыворотках крови кур ПФ «Роскар» привитых вакциной «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти»

Проведенные эксперименты позволили сделать заключение, что вакцина «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти» является безвредным и иммуногенным препаратом.

На основании 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»». Вакцина зарегистрирована 19.02.2024 г.

3.6 Разработка живой вакцины против НБ из штамма «НБ-эн»

Параллельно с разработкой инактивированных вакцин из ВНБ субгенотипа VII L проводился поиск кандидата штамма для живой вакцины. Изолят ВНБ был выделен в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из образцов материала от инфицированных бройлеров Кемеровской области РФ. Вирус был адаптирован к развивающимся СПФ-эмбрионам кур. Индекс интрацеребральной патогенности (ICPI) вируса составил величину 0,16, что позволяло отнести штамм к лентогенным вариантам. Вирус был депонирован как штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн», обладающий наследуемым природно-ослабленным фенотипом. При изучении тропизма вируса по результатам ПЦР было установлено, что штамм «НБ-Эн» ВНБ имеет преимущественный аффинитет для кишечной ткани, в которой накопление вирусного генома существенно выше ($p < 0,005$), чем в тканях респираторной системы.

Для изучения протективной функции поствакцинального иммунитета трем группам цыплятам 10-суточного возраста яичного кросса вводили ВНБ штамм «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в дозах ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 3,5, 4,5 и 5,5 перорально в объеме 1,0 см³. В качестве референта использовали вакцину из штамма «Ла-Сота» в дозах ($\lg \text{ЭИД}_{50}$): 6,7 (доза, регламентированная инструкцией по применению), 5,7 и 4,7. Одну группу цыплят не иммунизировали (отрицательный контроль). Через 21 сутки после вакцинации во всех группах провели заражение вирулентным вирусом НБ субгенотипа VII L. Полученные результаты исследований приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Протективное действие различных прививных доз вакцинных штаммов «ВНИИЗЖ НБ-Эн» и «Ла-Сота» против ВНБ субгенотипа VII L

Иммунизирующий вирус НБ	D	n	Σc	C	Pr
Штамм «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: приведены величина прививной дозы (D, lg ЭИД₅₀), количество птиц в опытной группе (n); показатель клинических патологий ($C = (\Sigma c)/n$, где Σc – 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 патологий в контроле; C_1 - тоже в опыте).

Представленные в таблице 12 результаты показали, что вирус штамма «НБ-Эн» способен создать в организме птицы протективный иммунитет к НБ. При этом достаточная напряженность иммунитета (защита более 90% птиц) может быть обеспечена прививной дозой 5,5 lg ЭИД₅₀. При пероральном введении вируса штамма «НБ-Эн» в дозе 5,5 lg ЭИД₅₀ через 15 суток титр антител к вирусу НБ составил величину 4 log₂, что согласуется с рекомендациями ВОЗЖ для живых вакцин.

Выбор оптимального способа введения вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Опытную группу №1 серонегативных цыплят 10-суточного возраста иммунизировали выпойкой вакцины в объеме 1 см³; группу №2 – окулярно (0,1 см³), группу №3 – спрей-методом по 5 см³/гол. Независимо от способа применения вакцины в одной прививной дозе содержалось 5,5 lg ЭИД₅₀ штамма «НБ-Эн» ВНБ.

Через 21 сутки после прививки средний логарифмический титр антител в РТГА в группах №1 - 3 составил (log₂): 4,9±0,28; 5,4±0,29 и 4,7±0,22, соответственно. Так как разница была статистически не достоверна ($p > 0,05$) живую вакцину «ВНИИЗЖ НБ-Эн» можно рекомендовать к применению всеми изученными способами.

Изучение продолжительности гуморального иммунитета после применения вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Опытную группу цыплят иммунизировали вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» в одной прививной дозе 5,5 lg ЭИД₅₀, группа контроля оставалась интактной. Через 30, 45 и 60 суток после вакцинации отбирали кровь для исследований сывороток в РТГА (рисунок 7).

Наиболее интенсивное развитие гуморальной иммунной реакции у привитых птиц наблюдалось в период до 30 суток, средняя оценка титра антител находилась в границах доверительного интервала (log₂) 3,82÷6,18. В период 30-45 суток наблюдали стабилизацию процесса антителообразования. В течение 45 суток после вакцинации титр антител в исследуемых пробах в РТГА превосходил оценку 1:8. Далее, очевидно, происходило угасание гуморальной иммунной реакции.

Определение безвредности вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Серонегативным

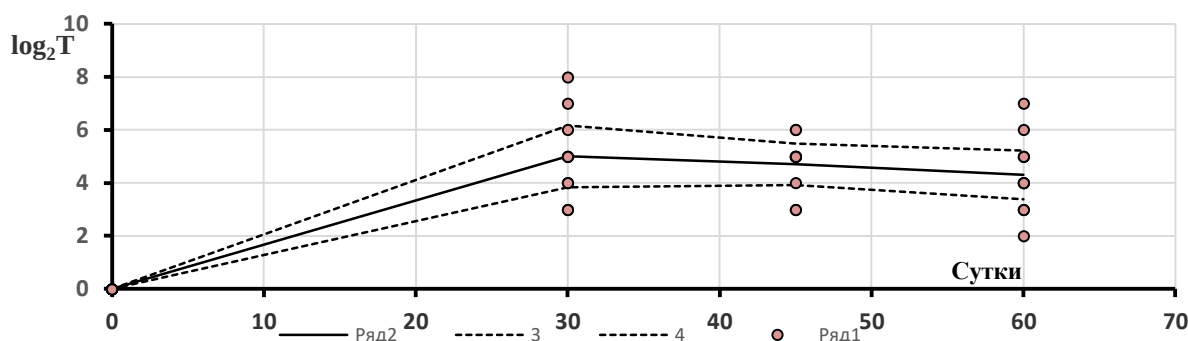


Рисунок 7 - Динамика напряженности гуморального иммунитета против после прививки цыплят вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Соответственно заданным отрезкам времени после вакцинации приведены установленные в РТГА однократные оценки титров антител к вирусу НБ (ряд 1, ○). Сплошная линия показывает среднюю тенденцию. Пунктиром показаны верхняя и нижняя границы доверительных интервалов ($p \leq 0,05$).

цыплятам 10-суточного возраста интраназально вводили 6,5 lg ЭИД₅₀ штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» ВНБ (10-кратная доза) в объеме 0,1 см³. Контрольной птице инокулировали физраствор.

В течение 10 суток наблюдений птица оставалась активной, какие-либо проявления НБ или другие патологические признаки отсутствовали. При вскрытии патологоанатомических изменений не отмечено. Данные результаты свидетельствуют о безвредности вакцины из штамма «НБ-Эн».

Клинические испытания вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн». Клинические испытания вакцины против НБ из штамма «НБ-Эн» проводили на цыплятах-бройлерах кросса «Ross-308» на птицефабриках ГК «Черкизово» АО «КЦ» и ГАП «Ресурс». В АО «КЦ» испытания проходили на птице «Узловской птицефабрики» в количестве 1,0 млн. голов и в бройлерном цехе №3 Курского филиала в количестве 1 000 015 голов. В ООО «Ставропольский бройлер» в филиале «Благодарненский» на площадке «Бурлацкая» в испытаниях участвовали 1600 тыс. голов, в подразделениях «Овощное» - 1200 тыс. голов и «Баевское» - 353 тыс. голов.

В условиях птицеводств АО «КЦ» было установлено, что иммунизация цыплят проведена успешно, каких-либо поствакцинальных реакций у птицы не наблюдалось. В течение 10 суток после прививки вся иммунизированная птица оставалась живой, без каких-либо отклонений от нормы. Признаков НБ у вакцинированной птицы не наблюдалось, патологоанатомическое вскрытие не требовалось. Производственные показатели поголовья иммунизированного вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн» не отличались от данных по хозяйству.

Вакцина «ВНИИЗЖ НБ-Эн» на площадке «Бурлацкая» ООО «Ставропольский бройлер» применялась спрей-методом на суточных бройлерах; в подразделении «Овощное» - на 11-суточных цыплятах интраокулярно; в «Баевское» - на 23-суточных бройлерах выпойкой. За время наблюдения каких-либо побочных явлений у птицы от применения вакцины и осложнений выявлено не было.

Согласно плановым работам после применения вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» проводили серомониторинг НБ, результаты которого представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Титры антител в РТГА к вирусу НБ в сыворотках крови бройлеров иммунизированных вакциной «ВНИИЗЖ НБ-Эн»

Пл*	Корп	n	Количество образцов соответственно величине титра							log ₂ (T±2S**)
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
I		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

Примечание: * - площадки «Бурлацкая» (I), «Овощная» (II) «Баевское» (III); **S - доверительный интервал.

Из данных таблицы 13 следует, что во всех корпусах средняя оценка титра антител была выше нижней границы показателя напряженности поствакцинального гуморального иммунитета к НБ (4,0 log₂), рекомендованного ВОЗЖ.

Исследовали влияние вакцины на эффективность производственного процесса (таблица 14). Применение вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн» по большинству показателей, характеризующих эффективность процесса выращивания бройлеров, в среднем по производственным площадкам, оказало положительное влияние. Интегральная оценка индекса производительности ЕРЕФ возросла на 17,901 пункта.

Таблица 14 - Продуктивность птицы ООО «Ставропольский бройлер» после применения вакцины «ВНИИЗЖ НБ-Эн»

Значения производственных показателей (х) соответственно площадкам до (х ₀) и после (х ₁) применения вакцины, а также оценка разности значений $z = x_1 - x_0$.									
Показатель	«Бурлацкая»			«Овощная»			«Баевская»		
	Х ₀	Х ₁	z=x ₁ -x ₀	Х ₀	Х ₁	z=x ₁ -x ₀	Х ₀	Х ₁	z=x ₁ -x ₀
Среднесут. привес, г	59,5	58,5	-1,0	60,8	65,2	4,4	60	60	0
Ср. вес головы W, кг	2,206	2,11	-0,095	2,192	2,529	0,337	2,175	2,152	-0,023
Конверсия корма	1,56	1,52	-0,040	1,49	1,52	0,03	1,5	1,48	-0,02
Сохранность, %	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.

Результаты исследований показали, что вакцина против НБ из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» является качественным препаратом, который можно безопасно и с высокой эффективностью использовать для профилактики НБ. На основании доклинических и клинических испытаний было разработано регистрационное досье «Вакцина против ньюкаслской болезни из штамма «ВНИИЗЖ НБ-Эн» сухая живая». Препарат зарегистрирован 16.10.2023 г.

3.7 Разработка вакцины против высокопатогенного гриппа птиц H5

Провели поиск изолятов вируса НГП H5N1, которые могли быть кандидатами для производства вакцин против ВГП. В 2021 г. был выделен вирусный изолят A/wildduck/YaNAO/956-12 из проб патологического материала дикой утки (Ямало-Ненецкий автономный округ). Было установлено, что это низковирулентный изолят ВГП подтипа H5 и дано рабочее название «Ямал».

Провели сравнение иммуногенности образцов инаktivированных вакцин на основе антигена изолята «Ямал» НГП H5 ($10 \log_2$ ГАЕ и титр $9,6 \lg$ ЭИД₅₀/см³ до инаktivации) и полученного ранее производственного препарата на основе антигена штамма «Приморский» ВГП H5N1 ($8 \log_2$ ГАЕ и $9,2 \lg$ ЭИД₅₀/см³) против актуальных для РФ высоковирулентных вариантов вируса ГП подтипа H5. На 4-недельных серонегативных цыплятах яичного кросса испытывали образцы вакцин, имеющие концентрацию антигена (D): 1(цельный); 1/25; 1/50 и 1/100.

Провели два эксперимента, в которых исследовали три комбинации вирусов для заражения и вакцин с разными прививными дозами антигенов.

Эксперимент I. Образцами препарата на основе НГП H5N1 штамм «Ямал» иммунизировали четыре группы птиц по 20 голов. Контрольные (n=10) были интактными. Через 28 суток после вакцинации проводили контрольное заражение вирусом ВГП H5N1 штамм «Приморский» в дозе $6,0 \lg$ ЭИД₅₀. В течение 10 суток после заражения регистрировали клиническое проявление гриппа, гибель заболевших особей и определяли протективные индексы (Pr) и соответствующие им линейные эквиваленты (Y). Результаты в таблице 15.

Таблица 15 – Протективный эффект вакцины на основе антигена НГП H5N1 штамма «Ямал» при заражении вирусом ВГП H5N1 штамма «Приморский»

Разведение антигена (D)	Титр антител, $\log_2 T \pm s$	Индекс защиты (Pr)*	Эквивалент индекса $Y = \log (Pr/(1 - Pr))$
1	$10,1 \pm 0,4$	20/20 (Pr ₁ = 0,99)***	1,996
1/25	$6,9 \pm 0,4$	17/20 (Pr = 0,85)	0,753
1/50	$6,7 \pm 0,5$	14/20 (Pr = 0,70)	0,368
1/100	$3,9 \pm 0,6$	7/20 (Pr ₀ = 0,35)	-0,269
Контроль	н/о	0/10 (н/о)	н/о

Примечания: * - $Pr = \sum e/n$, где $\sum e$ – число защищенных (клинически здоровых) вакцинированных птиц на конец опыта; n – общее число птиц в данной группе; *** - условная оценка $Pr_1 = (1 - 1/5n)$.

Эксперимент II. Иммунизировали группы птиц образцами вакцин, содержащими заданные дозы антигенов НГП H5N1 штамм «Ямал» и ВГП H5N1 штамм «Приморский». Через 28 суток после вакцинации провели контрольное заражение вирусом ВГП H5N8 штамм «КЧР» в дозе $6,7 \lg$ ЭИД₅₀ (таблица 16).

Таблица 16 - Протективный эффект вакцин на основе вирусных антигенов НГП H5N1 штамм «Ямал» и ВГП H5N1 штамм «Приморский» при контрольном заражении птиц вирусом ВГП H5N8 штамм «КЧР»

Наименование вакцины	Разведение антигена (D)	Титр антител с гомологичным антигеном, $\log_2 T \pm s$	Индекс защиты (Pr)	Эквивалент индекса $Y = \log (Pr/(1 - Pr))$
НГП H5N1 штамм «Ямал»	1	$9,6 \pm 0,5$	9/9 (Pr = 0,98)	1,690
	1/25	$7,9 \pm 0,6$	9/9 (Pr = 0,98)	1,690
	1/50	$6,2 \pm 0,4$	6/9 (Pr = 0,67)	0,308
	1/100	$5,6 \pm 0,4$	5/9 (Pr = 0,56)	0,105
Контроль	-	н/о	0/10 (н/о)	н/о
ВГП H5N1 штамм «Приморский»	1	$9,8 \pm 0,4$	10/10 (Pr = 0,98)	1,690
	1/25	$6,5 \pm 0,5$	8/10 (Pr = 0,80)	0,602
	1/50	$5,6 \pm 0,5$	4/10 (Pr = 0,40)	-0,176
	1/100	$5,2 \pm 0,5$	2/10 (Pr = 0,2)	-0,602
Контроль	-	н/о	0/10 (н/о)	н/о

На следующем этапе исследований определяли «протективный потенциал» вакцинных препаратов в виде оценок PD_{50} , характеризующих концентрацию антигена, которая в прививном объеме вакцины способна обеспечить защиту 50% вакцинированных птиц (таблица 17).

Таблица 17 - Протективное действие вакцин на основе антигенов НГП H5N1 штамм «Ямал» и ВГП H5N1 штамма «Приморский»

Комбинация	$PD_{50} \{PD_{50} / 10^5 \div PD_{50} \times 10^5\}^*$
ВГП H5N1 «Приморский»/Антиген НГП H5N1 «Ямал»	88 {40,3 ÷ 192,4}
ВГП H5N8 штамм «КЧР»/Антиген НГП H5N1 «Ямал»	92 {64,1 ÷ 132,7}
ВГП H5N8 «КЧР»/Антиген ВГП H5N1 «Приморский»	41 {18,1 ÷ 94,8}

Примечание: * - показана оценка D_{50} и ее отклонения в границах ошибки регрессионной модели.

По данным таблицы 17 следует, что вакцина на основе антигена «Ямал» против вируса штамм «КЧР» имела показатель $PD_{50} = 92$, при этом препарат на основе антигена «Приморский» против указанного вируса показал меньшую оценку $PD_{50} = 41$. Вакцина на основе антигена «Ямал» против вируса штамм «Приморский» имела показатель $PD_{50} = 88$.

Таким образом, 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.

Результаты проведенных исследований по изучению иммуногенных свойств экспериментального препарата из НГП H5 для профилактики ВГП послужили основанием для последующей разработки вакцины с коммерческим названием «АвиФлуВак». 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».

Изучение динамики поствакцинальной иммунной реакции у цыплят при иммунизации препаратом «АвиФлуВак». В опыте использовали 100 голов цыплят, из которых 60 голов было вакцинировано подкожно в объеме 0,5 см³ и 40 голов были контрольными. Через интервалы 5, 10, 15, 20 и 25 суток после вакцинации отбирали по 12 вакцинированных и 8 контрольных птиц, которых подвергали контрольному заражению вирусом ВГП A/chicken/Stavropol/2077-6/21 H5N1 орально в дозе 7,1 lg ЭИД₅₀. Полученные данные приведены на рисунке 9.

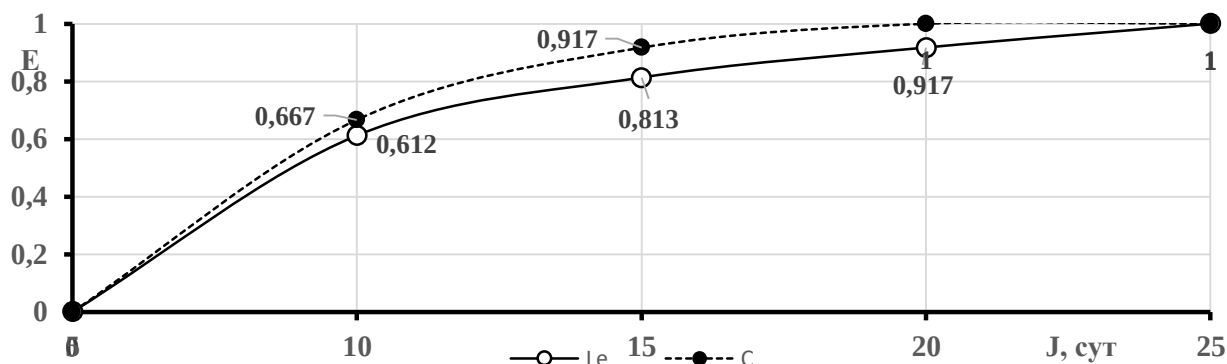


Рисунок 9 – Протективное действие вакцины «АвиФлуВак» после заражения вирусом ВГП подтипа H5N1 соответственно интервалам времени (J) после иммунизации по показателям защиты от заболеваемости (E_C) и смертности (E_{Le}).

Построенный график демонстрирует, что показатели E_C и E_{Le} имели положительный тренд. Синхронное возрастание показателей отражало хронологию развития у птиц поствакцинального иммунного ответа, который к 25 суткам обеспечил полную защиту при заражении ВГП.

Оценка длительности гуморального иммунитета после иммунизации вакциной «АвиФлуВак». Цыплят иммунизировали однократно в объеме 0,5 см³. Через 28, 90, 180, 240 и 270 суток брали пробы крови для исследований в РТГА к вирусу ГП Н5. Результаты приведены на рисунке 8.

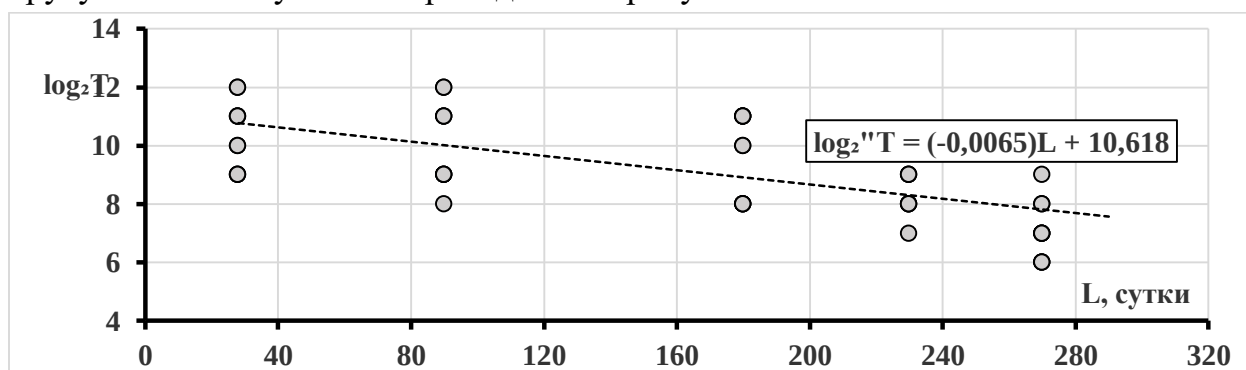


Рисунок 8 - Динамика напряженности гуморального иммунитета цыплят, привитых вакциной «АвиФлуВак». Пунктиром показана построенная по уравнению линия регрессии титров.

Динамика напряженности гуморального иммунитета цыплят после вакцинации демонстрировала определенный отрицательный тренд. Учитывая статистическую неопределенность, при протективном уровне титров антител не

менее $7,0 \log_2$, считали целесообразным принять допустимую продолжительность поствакцинального периода девять месяцев.

Оценка безвредности вакцины «АвиФлуВак». После вакцинации кур кросса «Хайсекс Браун» 1- и 30-суточного возраста в количестве 60 голов одной и двукратной прививными дозами, введенными подкожно и внутримышечно, каких-либо отклонений в общем состоянии птиц не установлено. После диагностического убоя цыплят патологоанатомический осмотр также не выявил каких-либо изменений в тканях в месте инъекции вакцины. Таким образом, пришли к заключению, что вакцина «АвиФлуВак» безвредна для птиц.

Определение PD_{50} в одном иммунизирующем объеме вакцины «АвиФлуВак». В качестве контроля использовали вакцину на основе антигена ВГП H5N1 штамма «Новосибирский». Концентрации антигенов (D) в прививном объеме вакцин регулировали путем разведения антигенов в соотношении: 1:25, 1:50 и 1:100. Каждый образец вакцины был введен отдельной группе птиц в возрасте 30 суток внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$. Через 28 суток после вакцинации проводили контрольное заражение вирусом ВГП H5N1 штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 в дозе $6,0 \lg \text{ЭИД}_{50}$ внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$. Результаты в таблице 18.

Таблица 18 - Иммуногенность образцов инактивированных вакцин против гриппа птиц на основе антигенов НГП и ВГП вируса H5N1

Антиген	Доза антигена (D)	Титр в РТГА, $\log_2$	Клинический показатель (C)*	Протективный индекс ($Pr=1-C$)
НГП	1	$6,67 \pm 0,31$	0/17	1,0
	1:25	$5,33 \pm 0,42$	1/10	0,9
	1:50	$4,33 \pm 0,45$	4/10	0,6
	1:100	$2,00 \pm 0,53$	6/10	0,4
ВГП	1	$6,33 \pm 0,29$	0/10	1,0
	1:25	$5,00 \pm 0,38$	3/10	0,7
	1:50	$2,00 \pm 0,47$	7/10	0,3
	1:100	$2,00 \pm 0,38$	7/10	0,3
Контроль		$0,47 \pm 0,35$	10/10	0,0

Примечания: * - $C = (\Sigma_c + \Sigma_{Le})/n$, где: Σ_c и Σ_{Le} - количество клинически больных и погибших птиц, соответственно; n – число птиц в группе до контрольного заражения.

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 ($\lg D$), а величины Pr преобразовывали в линейные эквиваленты по Берксону вида $Y = \lg (Pr/(1 - Pr))$.

По регрессионным уравнениям рассчитали дозы антигенов, обеспечивающих защиту 50% (PD_{50}) вакцинированных птиц. Было установлено, что прививной объем одной иммунизирующей дозы вакцины из НГП содержал 96 PD_{50} , из ВГП - 38 PD_{50} .

Таким образом, вакцина «АвиФлуВак» на основе антигена НГП и использованная в качестве контроля вакцина на основе антигена ВГП, обеспечили абсолютную защиту 100% иммунизированных птиц при введении одного прививного объема, что доказывает возможность их практического применения в соответствии с инструкциями. Однако, результаты регрессионного анализа показали, что прививной объем вакцины «АвиФлуВак» содержал 96 PD₅₀, а контрольного препарата - 38 PD₅₀. Это означало, что антигенный потенциал вакцины «АвиФлуВак» против штамма A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 превосходил контрольный препарат, в котором содержание антигена соответствовало нижней границе эффективного количества (35 PD₅₀).

Клинические исследования вакцины «АвиФлуВак» против ГП Н5 проводили на птицах в ЛПХ и хозяйствах открытого типа содержания.

При проведении иммунизации препаратом «АвиФлуВак» кур в количестве 68 голов в условиях ЛПХ на территории Кировской области установлено, что вакцина безопасна для домашней птицы, клиническое состояние, потребление корма и воды и продуктивность птицы оставались в норме после вакцинации. Результаты оценки антигенности вакцины через 28 дней после однократной иммунизации показали, что уровень антител к вирусу ГП Н5 находился в пределах $7,4 \div 8,3 \log_2$.

На гусеводческой ферме ООО «Башкирская птица» была проведена вакцинация молодняка однократно и родительского стада - двукратно. Результаты представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Титры антител к вирусу гриппа птиц Н5 в сыворотках крови гусей, привитых вакциной «АвиФлуВак»

Кратность вакцинации	Титры антител ($\log_2$) в разные сроки после вакцинации				
	д/в	1 мес.	2 мес.	7 мес.	10 мес.
Однократно	-	$3,7 \pm 0,6$ (16/33*, 48,5)	$1,9 \pm 0,4$ (7/30, 23,3)	-	-
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.

После однократной иммунизации вакцина индуцировала образование антител к вирусу ГП Н5 у 48,5% поголовья гусей через один месяц после вакцинации в титре $3,7 \log_2$, а через два месяца количество птицы с защитными титрами антител составило 23,3% и средний титр по группе составил $1,9 \log_2$. Высокий уровень антител ($\geq 5 \log_2$) к вирусу ГП Н5 наблюдался после двукратной вакцинации у 76-90% поголовья в течение 10 месяцев.

Клинические испытания вакцины против ГП Н5 «АвиФлуВак» позволили считать препарат безопасным и эффективным для разных видов птиц.

На основании проведённых доклинических и клинических испытаний приказом Россельхознадзора от 01.08.2022 № 1152 принято решение о государственной регистрации вакцины «АвиФлуВак». Вакцина разработана для реализации противоэпизоотических мероприятий в РФ и странах зарубежья и предназначена для профилактики гриппа А подтипа H5 у птиц.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 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 PD_{50}).

6. Выделены, депонированы и используются в изготовлении вакцин производственные штаммы вируса ньюкаслской болезни «ВНИИЗЖ G7» и «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 из штамма «НБ-Эн» «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.

4.2 Практические предложения

Осуществлено серийное производство инаktivированных вакцин против НБ «ВНИИЗЖ-АвиНьюФлу Мульти» и «ВНИИЗЖ-АвиНью Мульти», вакцины против ГП H5 «АвиФлуВак» с ежегодным выпуском препаратов не менее 250 млн доз и живой вакцины против НБ «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.

Депонированы штаммы НБ и ГП 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) инаktivированная 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 инаktivированная 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.).

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты, полученные в ходе научно-исследовательской работы активно используются в практике. Разработанные вакцины против ГП и НБ широко применяются в схемах специфической профилактики на промышленных птицеводческих предприятиях.

Эволюция возбудителей потребует дальнейших исследований по изучению их биологических свойств и оценке эффективности вакцин или разработке новых препаратов, адекватных возникающим угрозам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для опубликования основных научных результатов диссертации

1. 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. – № 1(36). – С. 44-51.
2. Иммунобиологические свойства инактивированных вакцин против высокопатогенного гриппа птиц, изготовленных на основе антигенов штаммов вируса гриппа подтипа А/Н5N1 различной вирулентности / С.В. Фролов, И.А. Чвала, **Н.В. Мороз**, Кулаков В.Ю., Сосипаторова В.Ю., Андрейчук Д.Б.// Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11, № 4. – С. 367-374.
3. Сравнение выборок титров антител ранговым методом / В.Ю. Кулаков, А.А. Пяткина, Т.Н. Зыбина, **Н.В. Мороз** // Ветеринарная патология. – 2022. – № 4(82). – С. 35-39.
4. Иммунологические характеристики экспериментальной инактивированной вакцины против гриппа а подтипа Н5 / **Н.В. Мороз**, С.В. Фролов, Л.О. Щербакова, В.Ю. Кулаков // Ветеринарная патология. – 2022. – № 3(81). – С. 5-13.
5. Analysis of Avian Orthoavulavirus 1 Detected in the Russian Federation between 2017 and 2021 / N.A. Guseva, S.N. Kolosov, N.G. Zinyakov, A.V. Andriyasov, Renfu

Yin, L.O. Scherbakova, E.V. Ovchinnikova, Z.B. Nikonova, D.B. Andreychuk, A.V. Sprygin, I.A. Chvala, **N.V. Moroz** // Vaccines. – 2023. – Vol. 11, No. 6. – P. 1032.

6. Патент № 2796987 С1 Российская Федерация, МПК С12N 7/00. 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: заявл. 03.08.2022: опубл. 30.05.2023 / **Н.В. Мороз**, С.В. Фролов, П.Д. Жестков, Д.Б. Андрейчук, И.А. Чвала, О.И. Ручнова.

7. Иммунологические свойства инаktivированных вакцин против ньюкаслской болезни на основе антигенов вируса VII и II генотипа / **Н.В. Мороз**, Д.Л. Долгов, И.А. Комаров, В.Ю. Кулаков, М.А. Вершинина // Международный вестник ветеринарии. – 2024. – № 1. – С. 41-47.

8. Применение вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» для индеек, гусей и уток / **Н.В. Мороз**, С.В. Фролов, В.Н. Ирза, Л.О. Щербакова, В.Ю. Кулаков // Ветеринария сегодня. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 248-254.

9. Иммунологические свойства лентогенного штамма «ВНИИЗЖ НБ-ЭН» вируса ньюкаслской болезни / Т.Н. Зыбина, А.А. Пяткина, **Н.В. Мороз**, В.Ю. Кулаков, Л.О. Щербакова // Ветеринария. – 2024. – № 4. – С. 39-44.

10. Патент № 2821028 С1 Российская Федерация, МПК С12N 7/00. Штамм «ВНИИЗЖ G7» вируса ньюкаслской болезни птиц для изготовления биопрепаратов для диагностики и специфической профилактики ньюкаслской болезни птиц: № 2024103509: заявл. 13.02.2024: опубл. 17.06.2024 / **Н.В. Мороз**, И.А. Чвала, М.А. Вершинина, Д.Л. Долгов, О.И. Ручнова, Н.А. Гусева, И.А. Комаров, Д.Б. Андрейчук.

11. Профилактика гриппа птиц H5N1: инаktivированная вакцина на основе антигена низкопатогенного варианта вируса против высокопатогенного штамма / **Н.В. Мороз**, Д.Л. Долгов, И.А. Чвала, С.В. Фролов, А.Д. Грехнева, В.Ю. Кулаков // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2025. – Т. 26, № 1. – С. 174-183.

12. Иммуногенная активность вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против актуального для России в 2023 году вируса высокопатогенного гриппа птиц H5N1 / **Мороз Н.В.**, Долгов Д.Л., Фролов С.В., А.Д. Грехнева, В.Ю. Кулаков // Ветеринария сегодня. – 2025. – Т. 14, № 1. – С. 47-544.

В научных журналах, сборниках и материалах конференций

13. Сравнительная оценка эффективности вакцин против ньюкаслской болезни, вызванной вирусом VII генотипа / **Н.В. Мороз**, С.В. Фролов, В.Ю. Кулаков, Н.А. Гусева // Эффективное животноводство. – 2022. – № 5(180). – С. 68-73.

14. Анализ процесса инаktivации вируса ньюкаслской болезни / Д.С. Гарькина, **Н.В. Мороз**, А.А. Пяткина, Т.Н. Зыбина, В.Ю. Кулаков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2022. – Т. 18. – С. 536-555.

15. Эффективность вакцин против вируса ньюкаслской болезни генотипа VII L/ **Н.В. Мороз**, С.В. Фролов, В.Ю. Кулаков, Н.А. Гусева // Эффективное животноводство. – 2023. – № 3(185). – С. 39-42.

16. 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.

17. 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. Вершинина, М. А.

18. Определение индекса интрацеребральной патогенности полевого изолята вируса болезни Ньюкасла VII генотипа / М.А. Вершинина, **Н.В. Мороз**, С.В. Фролов // Материалы междунар. науч. конф. молодых учёных и специалистов, посвящ. 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича: Сборник статей, Москва, 03–05 июня 2024 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, 2024. – С. 247-250.