

Мороз Н. В., Фролов С. В., Щербакова Л. О., Кулаков В. Ю.

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА А ПОДТИПА Н5

**Ключевые слова:** высокопатогенный грипп птиц, вакцина инактивированная, штамм «Ямал», вирус гриппа А подтипа Н5, заболеваемость, летальность, антитела.

**Резюме:** Изучены показатели, отражающие иммуногенность экспериментальной вакцины против гриппа птиц (Н5) инактивированной эмульсионной «АвиФлуВак» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ», испытанной в 1/5 и цельной дозах. Оценки поствакцинального титра антител к вирусу гриппа птиц (ГП) в РТГА с антигеном штамма «Ямал» через 21 сут после вакцинации соответственно испытанным дозам составили  $7,2 \pm 0,2$  и  $8,9 \pm 0,3$  ( $\log_2$ ). Полученные в остром опыте протективные коэффициенты ( $Pr = 1 - Ef/n$ , где:  $Ef$  – число птиц, демонстрирующих клинические признаки болезни или погибших;  $n$  – количество птиц в данной группе ( $n = 12$ )), для обеих испытанных доз вакцины имели значения  $Pr = 1$ . После искусственного заражения по данным ПЦР оральная экскреция вируса (прогнозируемый титр  $2 \lg$  ЭИД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>) продолжалась до 5 суток и прекращалась на 7 сутки. Коэффициент прироста титра антител в остром опыте через 14 суток был статистически не значим. Вакцину «АвиФлуВак» исследовали параллельно с коммерческим препаратом «ФлуПротектН5», который рассматривали как положительный контроль. По совокупности изученных показателей препарат «АвиФлуВак» превосходил коммерческий аналог.

### Введение

Проблема высокопатогенного гриппа птиц (ВППГ) сохраняет актуальность. По данным МЭБ (ОИЕ) в период с 2005 по 2019 гг. в 76 регионах мира было зарегистрировано 18620 вспышек ВППГ среди промышленных и домашних кур, что привело к гибели или вынужденному забою более 246 млн голов [1]. Распространение инфекции в последнее десятилетие существенно изменило международные потоки продукции птицеводства. Страны Юго-Восточной Азии в большинстве стали экспортерами только готового мяса птицы [2]. Единственным надежным способом борьбы с ВППГ является специфическая профилактика болезни [3, 4]. В этой связи совершенствование средств специфической профилактики ВППГ следует считать своевременным.

Цель настоящих исследований состояла в оценке иммунологических характеристик (показателей) экспериментальной вакцины против гриппа птиц А подтипа Н5 «АвиФлуВак».

### Схема опыта

Вакцину «АвиФлуВак» исследовали параллельно с коммерческим препаратом «ФлуПротектН5», который рассматривали как положительный контроль. В качестве тест-объектов использовали то-

варных цыплят, серонегативных к вирусу гриппа птиц (ГП). Вакцины испытывали в 1/5 и в цельной прививных дозах. Определяли и сравнивали следующие показатели:

– поствакцинальный титр антител к вирусу ГП через 21 сутки после иммунизации;

– протективный коэффициент в остром опыте (процент защищенных вакцинированных птиц после контрольного заражения вирусом ВППГ через 21 сутки после иммунизации);

– титр инфекционного вируса ВППГ в ротоглоточных и клоакальных пробах в остром опыте в динамике (через заданные интервалы времени в течение 14 суток после контрольного заражения);

– коэффициент прироста титра антител к вирусу ГП в остром опыте (показатель соотношения величин поствакцинального титра и титра, установленного через 14 суток после контрольного).

### Материалы и методы исследований

#### Вакцины:

– вакцина против гриппа птиц (Н5) инактивированная эмульгированная «ФлуПротектН5» (производство ФКП «Ставропольская биофабрика», г. Ставрополь);

– вакцина против гриппа птиц (Н5) инактивированная эмульсионная «АвиФ-

луВак» (экспериментальная серия, производство ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир).

**Птица.** В эксперименте использовали 60 гол. цыплят яичного направления, в возрасте 47 сут, серонегативных к ВГП, полученных из благополучного по острым инфекционным болезням птиц хозяйства. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с ГОСТ 33215-2014, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU по охране животных, используемых в научных целях. Соответственно тестируемым дозам и препаратам птиц разделили по 12 голов на четыре опытных группы («ФлуПротектН5»-1/5D; «ФлуПротектН5»-1D; «АвиФлуВак»-1/5D; «АвиФлуВак»-1D), и одну группу отрицательного контроля (К).

**Вакцинация птицы.** Вакцины вводили подкожно в дорсальную часть верхней трети шеи, в объёмах 0,1 см<sup>3</sup> (1/5 дозы) и 0,5 см<sup>3</sup> (1 доза). Птиц группы К не вакцинировали.

**Контрольное заражение.** Для контрольного заражения использовали штамм A/chicken/Stavropol/2077-6/21 H5N1 вируса ВПП А подтипа Н5. Заражение птиц проводили через 21 сут после вакцинации в дозе более 6 lgЭИД<sub>50</sub> методом выпойки в объёме 1,0 см<sup>3</sup>. Наблюдения клинического состояния заражённой птицы продолжали в течение 14 суток.

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** В образцах сывороток крови птиц определяли титр антител к вирусу ГП. Использовали диагностические наборы для выявления антител к вирусу ГП в РТГА производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Реакцию проводили с антигеном вируса ГП Н5, прилагаемому к набору (Аг-Стандарт), а также с антигеном вируса ГП Н5 шт. «Ямал» (Аг-Ямал).

**Отбор проб для серологических исследований.** В каждой группе птиц до вакцинации (0 сут), через 21 сут после вакцинации и через 14 суток после контрольного заражения (кроме группы К), отбирали пробы крови для исследований сывороток в РТГА. Таким образом получали групповые выборки значений ( $n = 12$ ) титров антител к вирусу ГП.

**Отбор проб для молекулярно-биологических исследований.** Через сутки после контрольного заражения в каждой группе птиц, в случайном порядке, у шести голов ( $n = 6$ ) производили отбор образцов (ротоглоточных и клоакальных мазков) для исследования в ПЦР.

**Выделение РНК.** Выделение суммар-

ной РНК осуществляли набором «SV 96 Total RNA isolation system (Promega)», согласно инструкции производителя.

**Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).** ОТ-ПЦР-РВ проводили в одну стадию с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, кат. № 210212), 25 мМ раствора хлорида магния (Promega, в наборе с кат. № М8296) и систем праймеров на ген М и гены Н, N подтипа Н5N8. Собирали реакционную смесь объёмом 25 мкл, содержащую 1х буфер для ОТ-ПЦР, 1,25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ дНТФ, по 0,4 пмоль/мкл прямого и обратного праймеров, 0,3 пмоль/мкл флуоресцентного зонда, 1 мкл смеси ферментов обратной транскриптазы и полимеразы (Qiagen, кат. № 210212), 5 мкл раствора суммарной РНК. Обратную транскрипцию проводили 30 мин при 50 °С. Для амплификации применяли следующие температурно-временные параметры: 95 °С – 10 мин (активация полимеразы), далее 39 циклов, каждый из которых состоит из трёх шагов (95 °С – 10 с, 55 °С – 35 с, 72 °С – 10 с). Регистрировали пороговый цикл (Сt). Результат реакции считали положительным, если для детекции генома вируса ГП требовалось не более 39 циклов (пороговый цикл положительной реакции Сt < 39).

**Опосредованная оценка титра инфекционного вируса ГП по результатам ПЦР.** Для прогноза величины титра вируса ГП в образцах, которые тестировали в ПЦР, использовали эмпирическое уравнение вида  $\langle T/0,1 \text{ см}^3 = (-0,163) \rangle \text{St} + 7,847$ , где: Т – ожидаемый титр вируса ГП (lg ЭИД<sub>50</sub>) соответственно установленной оценке порогового цикла амплификации (Сt).

**Обработка данных.** Использовали стандартные методы обработки выборок варьирующих переменных (х). Определяли средние оценки ( $\sum x/n$ ) и стандартные отклонения средних вида  $s = \sqrt{Q / ((n - 1) n)}$ , где  $Q = (\sum x^2) - (\sum x)^2 / n$ . Статистический анализ проводили по Стьюденту. Существенным считали уровень  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Соответственно тестируемым препаратам и заданным прививным дозам, через 21 сут после вакцинации, исследовали напряжённость гуморального иммунитета птиц. В РТГА с антигенами «Стандарт» и «Ямал» определяли титры антител к вирусу ГП. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что:

**Таблица 1. Титры\* антител к вирусу ГП, установленные через 21 сут. после вакцинации соответственно испытанной вакцины, прививной дозы (D) и использованного в РТГА антигена (Ag)**

Вакцина	1/5D		1D	
	Ag-«Стандарт»	Ag-«Ямал»	Ag-«Стандарт»	Ag-«Ямал»
ФлуПротектH5	3,0 ± 0,4**	4,5 ± 0,3	4,2 ± 0,3	6,0 ± 0,5
АвиФлуВак	3,7 ± 0,5	7,2 ± 0,2	4,1 ± 0,3	8,9 ± 0,3

Примечания: \* - средние логарифмические значения титров

\*\* - дана средняя оценка (n=12) и стандартное отклонение средней

– антиген «Ямал» во всех случаях обусловил достоверно большую чувствительность РТГА. Разность соответствующих значений титров ( $\log_2$ ) для препарата «ФлуПротектH5» находилась в диапазоне (1,5 ± 0,5) ч (1,8 ± 0,6), для «АвиФлуВак» – (3,5 ± 0,5) ч (4,8 ± 0,4). В арифметической размерности чувствительность реакции различалась, приближенно, от 3 до 28 раз. Очевидно, что наблюдаемое явление было обусловлено различиями структуры гемагглютина стандартного антигена и антигена шт. «Ямал»;

– для обоих препаратов гуморальный иммунный ответ, очевидно, был положительно зависим от прививной дозы. По результатам реакции с антигеном «Ямал» возрастание титра антител ( $\log_2$ ) с повышением дозы для препарата «ФлуПротектH5» составило 1,5 ± 0,6, для «АвиФлуВак» аналогичный показатель был равен 1,7 ± 0,4. Обе оценки были достоверны. Это означало, что для обеих вакцин увеличение прививной дозы в пять раз соответствовало приближенно трехкратному возрастанию титра антител;

– антигенная активность вакцины «АвиФлуВак» в трёх из четырёх позиций сравнения была выше относительно вакцины «ФлуПротектH5». По результатам

реакции с антигеном «Ямал» разность значений титров ( $\log_2$ ) для 1/5 дозы и цельной вакцины составила 2,7 ± 0,4 и 2,9 ± 0,6 соответственно. Обе оценки были достоверны. Таким образом, по антигенной активности препарат «АвиФлуВак», в зависимости от прививной дозы, превосходил коммерческий аналог в 6,5 и 7,5 раза;

В остром опыте оценивали протективное действие вакцин. Через 21 сут после вакцинации всех птиц подвергли контрольному заражению. В течение 14 суток, ежедневно во всех группах проводили клинический осмотр. Регистрировали клинические признаки гриппа или гибель птицы. Специфичность гибели подтверждали патологоанатомическим исследованием. Соответственно группам птиц определяли протективные коэффициенты вида  $Pr = 1 - Ef/n$ , где: Ef – число особей, демонстрирующих клинические признаки болезни или погибших; n – количество птиц в данной группе. Использованный коэффициент был равен единице ( $Pr = 1$ ), если все птицы были защищены или имели значение нуля ( $Pr = 0$ ), если все птицы заболели или погибли. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Данные табл. 2 демонстрируют, что независимо от величины прививной дозы все

**Таблица 2. Результаты определения протективного действия исследуемых вакцин после искусственного заражения иммунизированных птиц**

Протективные коэффициенты (Pr)*, установленные соответственно использованных прививных доз (D) вакцин		
Вакцина	1/5D	1D
ФлуПротектH5	1	1
АвиФлуВак	1	1
Контроль вируса**	0	

Примечания:

\* -  $Pr = 1 - Ef/n$ , где: Ef - число птиц, демонстрирующих клинические признаки болезни или погибших; n - количество птиц в данной группе (n = 12)

\*\* - не вакцинированные птицы

вакцинированные птицы были защищены от искусственного заражения вирусом ВППП Н5, т. е. оба испытанных препарата обладали выраженным протективным действием. При этом не вакцинированные цыплята (контроль вируса) пали в интервале 4-5 суток после заражения с признаками острого проявления болезни: синюшность гребня, бородачок и лап, конъюнктивит, отёк подчелюстного пространства, повышенная саливация, растяжение зоба, кровенаполненность серозных оболочек железистого желудка, кишечника и сердца, кровоизлияния на слизистой железистого желудка, прямой кишки.

Исследовали вирусвыделение у птиц после искусственного заражения. Через сутки после инфицирования в каждой группе в случайном порядке у шести голуб (n = 6) производили отбор образцов (ротоглоточных и клоакальных мазков) для исследования в ПЦР на присутствие генома вируса ГП. В тестируемых образцах определяли пороговые циклы амплификации (Ct). Отбор образцов проводили в течение 10 суток. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Анализ данных проводили при соблюдении следующих условий:

- величина Ct имеет обратную зависимость от исходной концентрации вирусного генома в тестируемом образце;

- при сопоставлении выборок оценки Ct в порядке их получения (положения по строкам в таблице) рассматривали как парные значения. Показателем различий пары однократных измерений (например, оценок Ct<sub>1</sub> и Ct<sub>2</sub>) служила величина разности ( $d = Ct_1 - Ct_2$ ). Результатом сравнения двух выборок являлся средняя разность ( $\langle d = \sum d_i/n$ ) и ее стандартная ошибка ( $\pm s$ ). Для проверки существенности различий средних тенденций в выборках использовали неравенство вида  $\langle d/s \geq t_p$ , где  $t_p$  – коэффициент Стьюдента.

Из данных таблицы 3 следует, что:

- использованный для искусственного заражения вирус ВППП был способен к репродукции в ротоглоточной области птицы и накапливаться в экскретах на слизистых оболочках. В контрольной группе от первых до третьих суток после инфицирования (п/и), к моменту гибели птицы, экскреция вируса существенно возросла ( $\langle d = 7,74 \pm 3,03$ ;  $p < 0,05$ ).

- у вакцинированных птиц во всех позициях сравнения с контролем оценки Ct на первые сут после инфицирования (п/и) не имели существенных различий, тогда как

на третьи сутки п/и Ct значительно отличались от контрольных ( $p < 0,05$ );

- концентрация вирусного генома в пробах от вакцинированных птиц в процессе наблюдений снижалась. Продолжительность экскреции возбудителя у птиц, иммунизированных препаратом «ФлуПротектН5» для обеих испытанных доз составила не менее семи суток п/и, аналогичный показатель у препарата «АвиФлуВак» для 1/5D также равнялся семи суткам, а для 1D – пяти суткам п/и.

- у обоих препаратов связь между величиной прививной дозы вакцины и накоплением вирусного генома в ротоглоточной области после заражения была выражена слабо: при сравнении выборок Ct между группами 1/5D и 1D ни в одной из позиций существенных различий не установлено;

- при сравнении иммунологического действия одинаковых доз тестируемых препаратов, существенно большая активность ( $p < 0,05$ ) была зафиксирована у вакцины «АвиФлуВак» на пятые сутки п/и. В сравнении с препаратом «ФлуПротектН5» для 1/5D и 1D средние разности оценок Ct были достоверны и составили значения  $\langle d = 4,33 \pm 0,61$  и  $\langle d = 2,71 \pm 0,54$ , соответственно.

На основании данных табл. 3 определяли ожидаемую величину титра инфекционного вируса ВППП ( $T$ , Ig ЭИД<sub>50</sub>/0,1см<sup>3</sup>) в образцах ротоглоточного экскрета птиц после искусственного заражения. Использовали эмпирическую модель связи параметров Ct и T, которая для данного метода постановки ПЦР имела вид:  $T = (-0,163) \cdot Ct + 7,847$ . Полученные результаты представлены на рис. 1.

Диаграмма на рис. 1 демонстрирует следующее:

- контрольная группа птиц (не вакцинированные птицы) в течение 3-х сут п/и (до наступления 100 % летального эффекта) показала прогрессирующее развитие инфекционного процесса, который характеризовался накоплением в ротоглоточных экскретах инфекционного вируса до 4,29 IgЭИД<sub>50</sub>/0,1см<sup>3</sup>;

- в группах вакцинированных птиц до 5 сут п/и концентрация инфекционного вируса не поднималась больше 2,3 IgЭИД<sub>50</sub>/0,1см<sup>3</sup>, и в последующие 3 – 4 суток сокращалась до предела обнаружения. Таким образом, тестируемые вакцины были способны ограничивать накопление вируса в ротоглоточной области птицы более чем на два порядка относительно контроля;

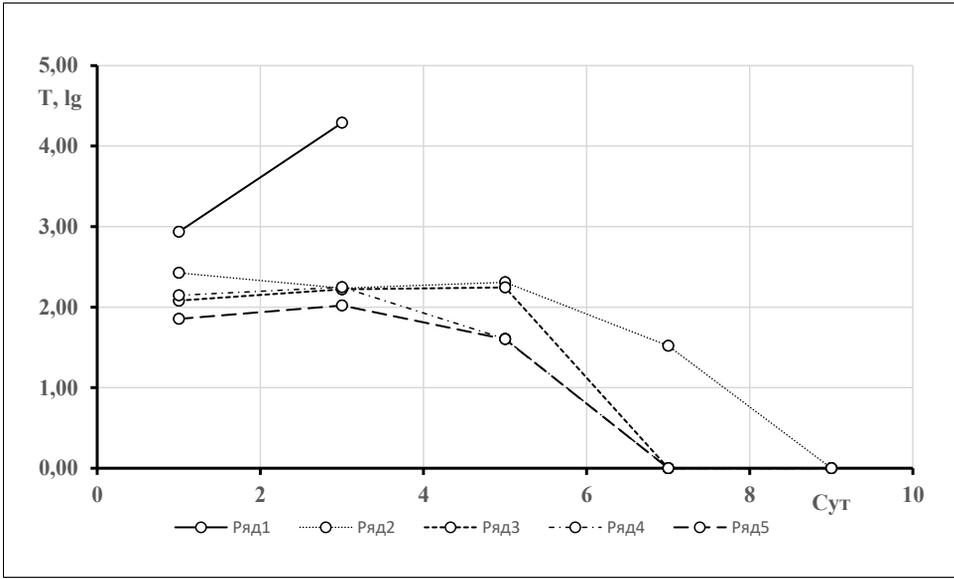
**Таблица 3. Результаты детекции генома вируса ГП, установленные в ОТ-ПЦР-РВ в образцах ротоглоточных мазков, взятых у иммунизированных птиц после искусственного заражения**

Значения пороговых циклов амплификации (Ct) соответственно испытанной вакцины, прививной дозы (D) и времени отбора образцов (сут).					
Сут	Вакцина				Контроль
	ФлуПротектН5		АвиФлуВак		
	1/5D	1D	1/5D	1D	
1	31,46	33,15	36,55	38,41	36,74
	30,05	36,18	36,19	36,37	25,88
	33,76	35,32	35,78	38,69	26,17
	33,16	34,20	31,96	31,09	32,12
	33,33	39,00	29,73	37,15	34,66
	34,09	35,51	34,16	36,12	21,15
M <sub>(u<sup>-</sup>÷u<sup>+</sup>)</sub>	33,25 (30,05÷33,76)*	35,32 (33,15÷36,18)	34,97 (29,73÷36,19)	36,76 (31,09÷38,41)	30,13 (25,88÷34,66)
3	35,51	34,29	31,00	35,28	28,92
	32,30	34,03	35,07	38,77	23,94
	33,20	35,86	34,81	32,36	19,15
	39,00	34,54	31,47	33,89	21,66
	33,27	32,21	30,16	38,12	22,00
	35,36	35,86	34,22	36,19	28,14
M <sub>(u<sup>-</sup>÷u<sup>+</sup>)</sub>	34,32 (32,30÷35,51)	34,42 (32,21÷35,86)	34,35 (32,21÷35,86)	35,74 (32,36÷38,12)	21,83 (19,15÷23,94)
5	33,18	36,93	38,00	39,00	-/-
	33,46	33,65	38,59	38,12	-/-
	34,47	33,22	39,00**	36,27	-/-
	34,57	35,10	36,53	36,19	-/-
	32,35	37,35	38,57	39,00	-/-
	34,55	33,23	37,84	37,18	-/-
M <sub>(u<sup>-</sup>÷u<sup>+</sup>)</sub>	33,97 (32,35÷34,55)	34,38 (33,22÷36,93)	38,29 (36,53÷38,59)	38,31 (36,27÷39,00)	
7	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	37,12	39,00	37,11	39,00	-/-
	38,62	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	37,32	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	38,31	38,12	39,00	39,00	-/-
M <sub>(u<sup>-</sup>÷u<sup>+</sup>)</sub>	38,81 (37,12÷39,00)	39,00 (37,32÷39,00)	39,00 (37,11÷39,00)	39,00	
9	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
	39,00	39,00	39,00	39,00	-/-
M	39,00	39,00	39,00	39,00	

Примечания:

\* - представлены медианы выборок (в скобках указаны границы доверительных интервалов медиан для  $p = 0,05$ ).

\*\* - реакция отрицательная



**Рис. 1. Прогнозируемые величины титра инфекционного вируса ВПП (Т, lg ЭИД<sub>50</sub>/0,1см<sup>3</sup>) в ротоглоточных мазках вакцинированных птиц после искусственного заражения, рассчитанные по результатам ПЦР соответственно времени после инфицирования (сут), использованного препарата и прививной дозе (D).**

Вычисления выполнены по уравнению  $T = (-0,163) \cdot Ct + 7,847$ , где 'Ct – медианы групповых выборок пороговых циклов (см. табл. 3). Приведены оценки, установленные для следующих групп: контроля (1); «ФлуПротектН5» 1/5D (2); «ФлуПротектН5» 1D (3); «АвиФлуВак» 1/5D (4); «АвиФлуВак» 1D (5)

– формально (без учёта статистических характеристик), по критерию вирус-выделения после искусственного заражения, иммунологическое действие препарата «АвиФлуВак» для испытанных прививных доз было более выраженным.

Результаты исследования в ПЦР клоакальных образцов были слабо информативны. В контрольной группе птиц накопление вирусного генома на первые и третьи сутки п/и характеризовалось медианными оценками 36,75<sub>(36,12ч39,00)</sub> и 35,44<sub>(34,15ч39,00)</sub>, соответственно. При этом положительными по выборкам (Ct <39) были 3/6 и 4/6 исследованных проб. При парном сопоставлении статистической разницы между показателями данных выборок не установлено.

В группе птиц, вакцинированных «ФлуПротектН5» 1/5D на первые сут п/и медиана Ct-значений составила величину 37,00<sub>(32,51ч39,00)</sub>, при этом только 3/6 исследованных проб были положительными. Далее, на протяжении всего эксперимента, в клоакальных образцах от всех вакцинированных птиц геном вируса ВПП выявлен не был.

Через 14 сут после контрольного заражения провели ретроспективный анализ распространения вируса ВПП в организ-

ме вакцинированных птиц. Оценивали степень антигенной презентации иммунной системе. Использовали РТГА с антигеном «Ямал» вируса ГП. В подопытных группах птиц определяли логарифмические коэффициенты прироста титров антител вида:  $k = \log_2 T_1 - \log_2 T_0$ , где  $T_0$  – титр антител перед заражением;  $T_1$  – титр антител после заражения. Полученные результаты приведены в табл. 4.

Данные табл. 4 позволили считать, что незначительный, но достоверный прирост ( $p < 0,05$ ) концентрации антител к вирусу ГП ( $k = 1,9 \pm 0,8$ ) наблюдали только в группе, вакцинированной 1/5 дозы препарата «ФлуПротектН5». В остальных группах коэффициенты прироста статистической значимости не имели.

Полученные в ходе исследований результаты сравнивали с аналогичными данными, опубликованными в научных изданиях.

Защита от инфекции вируса ГП в основном обеспечивается выработкой антител против гемагглютинаина [5]. Рекомендуемый МЭБ [4] уровень поствакцинального гуморального иммунитета, соответствующий титру антител в границах 5–7 ( $\log_2$ ), для вакцины «ФлуПротектН5» был достигнут при использовании цельной

**Таблица 4. Результаты анализа титров антител к вирусу ГП в группах вакцинированных цыплят после контрольного заражения**

Средние величины титров антител, установленные у птиц через 14 суток после контрольного заражения ( $\log_2 T_1^*$ ) соответственно испытанным вакцинам и прививным дозам (D), а также коэффициенты прироста титров вида $k = \log_2 T_1 - \log_2 T_0$ , где $T_0$ – титр антител перед заражением <sup>**</sup> ; $T_1$ – титр антител после заражения				
Вакцина	D	$\log_2 T_1$	$k = \log_2 T_1 - \log_2 T_0$	$2^k$
ФлуПротектН5	1/5	$6,4 \pm 0,7$	$k = (6,4 \pm 0,7) - (4,5 \pm 0,3) =$ <b><math>1,9 \pm 0,8^{\#}</math></b>	$4,7 (2,1 - 6,5)^{\#\#}$
	1	$6,9 \pm 0,3$	$k = (6,9 \pm 0,3) - (6,0 \pm 0,5) =$ $0,9 \pm 0,6$	$1,9 (1,2 - 2,8)$
АвиФлуВак	1/5	$8,2 \pm 0,4$	$k = (8,2 \pm 0,4) - (7,2 \pm 0,2) =$ $1,0 \pm 0,5$	$2,0 (1,4 - 2,8)$
	1	$9,0 \pm 0,4$	$k = (9,0 \pm 0,4) - (8,9 \pm 0,3) =$ $0,9 \pm 0,5$	$1,9 (1,3 - 2,6)$

Примечания:

- \* - величина титра в РТГА с антигеном «Ямал»;
- \*\* - данные из табл. 1 (через 21 сутки после вакцинации);
- # - жирным шрифтом выделена статистически значимая величина;
- ## - в скобках указаны границы диапазона стандартного отклонения коэффициента.

прививной дозы ( $6,0 \pm 0,5$ ), для препарата «АвиФлуВак» – при использовании 1/5 и цельной дозы ( $7,2 \pm 0,2$  и  $8,9 \pm 0,3$ ).

Однако, сопоставляя данные таблиц 1 и 2, следует отметить, что установленный в проведенном эксперименте абсолютный протективный эффект вакцин ( $Pr = 1$ ) соответствовал меньшим поствакцинальным титрам РТГА, чем нижняя граница диапазона рекомендованного МЭБ. Это обстоятельство позволяет предположить, что защитная функция иммунитета против ГП может обусловлена не только гуморальным фактором.

Известно, что поствакцинальный иммунитет влияет на выделение возбудителя из организма птицы, т. е. ограничивает контактную передачу вируса [6, 7]. Например, концентрация гемагглютинирующих антител равная  $5,2 \log_2$  до четырех порядков снижала оральную вирусную экскрецию [8]. Аналогичные по тематике исследования показали подобные результаты [9]. Препарат «АвиФлуВак», примененный в 1/5 прививной дозы, на третьи сутки после контрольного заражения, по сравнению с невакцинированной птицей, редуцировал более двух порядков вируса в оральных масках и на седьмые сутки полностью блокировал вирусвыделение.

Отсутствие прироста титра антител после искусственного заражения птиц, вакцинированных препаратом «АвиФлуВак»,

испытанного в 1/5 и в цельной дозах, свидетельствует о предотвращении генерализации вирусной инфекции в организме птицы.

#### Заключение

По изученным показателям, отражающим иммуногенность, вакцина против гриппа птиц (Н5) инактивированная эмульсионная «АвиФлуВак» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» не уступала коммерческому аналогу – вакцине «ФлуПротектН5», которая была использована в эксперименте в качестве контроля. При испытании в цельной и 1/5 от прививной дозы, по антигенному действию препарат «АвиФлуВак» достоверно превосходил контроль. Протективные коэффициенты, установленные после иммунизации в указанных дозах вакциной «АвиФлуВак» после искусственного заражения, полностью совпадали с контролем. При этом, препарат «АвиФлуВак» в 1/5 прививной дозы был эффективнее контроля по ограничению экскреции инфекционного вируса.

Установленные показатели иммуногенности препарата «АвиФлуВак» согласуются с аналогичными данными, опубликованными в научных изданиях.

## Библиографический список:

- OIE. High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) - Situation report 11/04/2022. <https://www.woah.org/app/uploads/2022/04/hpai-situation-report-20220411.pdf>
- Nicita Alessandro. (2008). Avian influenza and the poultry trade / Nicita Alessandro // The World Bank, Policy Research Working Paper Series. <https://www.researchgate.net/publication/23550548>
- Peyre M. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience / M. Peyre, G. Fusheng, S. Desvaux, F. Roger // Epidemiol. Infect. – 2009 Jan;137(1):1-21. doi: 10.1017/S0950268808001039. Epub 2008 Aug 14. PMID: 18700992 [https://agritrop.cirad.fr/546006/1/document\\_546006.pdf](https://agritrop.cirad.fr/546006/1/document_546006.pdf)
- OIE. Terrestrial Animal Health 2021. Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses), – P. 1–24. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.03.04\\_AI.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf)
- Katz J. M. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses / J. M. Katz [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy 2000; 54: 178–187. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10872716/>
- Van der Goot J. A. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens / J. A. Van der Goot [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2005; 102: 18141–18146. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16330777/>
- Swayne D. E. Inactivated North American and European H5N2 avian influenza virus vaccines protect chickens from Asian H5N1 high pathogenicity avian influenza virus / D. E. Swayne, C. W. Lee, E. Spackman // Avian Pathology 2006; 35: 141–146. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079450600597956>
- Bublout M. Efficacy of a fowlpox-vectored avian influenza H5 vaccine against Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza virus challenge / M. Bublout [et al.] // Avian Diseases 2007; 51: 498–500. <https://bioone.org/journals/avian-diseases/volume-51/issue-s1/7624-042706R.1/Efficacy-of-a-Fowlpox-Vectored-Avian-Influenza-H5-Vaccine-Against/10.1637/7624-042706R.1.short>
- Kumar M. Association of serologic and protective responses of avian influenza vaccines in chickens / M. Kumar [et al.] // Avian Diseases 2007; 51: 481–483. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17494614/>

## References:

1–9. Vide supra.

DOI: 10.25690/VETPAT.2022.77.54.008

**Moroz N. V., Frolov S. V., Shcherbakova L. O., Kulakov V. U.**

### IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE EXPERIMENTAL INACTIVATED VACCINE AGAINST INFLUENZA A SUBTYPE H5

**Key words:** highly pathogenic avian influenza, inactivated vaccine, «Yamal» strain, influenza A virus of subtype H5, morbidity, mortality, antibodies.

**Abstract:** The indicators reflecting the immunogenicity of the experimental avian influenza vaccine (H5) inactivated by emulsion «AviFluVak» produced by FGBI «VNIIZH», tested in 1/5 and whole doses were studied. Assessment of the post-vaccination titer of antibodies to the avian influenza virus in RTGA with the antigen of the «Yamal» strain after 21 days after vaccination were  $7.2 \pm 0.2$  and  $8.9 \pm 0.3$  ( $\log_2$ ), accordingly to the tested doses. The protective coefficients obtained in the acute experiment for both tested doses of the vaccine had the values  $Pr = 1$  ( $Pr = 1 - Ef/n$ , where: Ef is the number of birds showing

clinical signs of illness or death; n is the number of birds in this group ( $n = 12$ )). After artificial infection, according to PCR data, oral excretion of the virus lasted up to 5 days and stopped for 7 days (predicted titer 2 lg EID<sub>50</sub>/0.1cm<sup>3</sup>). The coefficient of increase in the titer of antibodies in the acute experiment after 14 days was not statistically significant. The vaccine «AviFluVak» was studied in parallel with the commercial vaccine «FluProtect H5», which was considered as a positive control. According to the totality of the studied indicators, the vaccine «AviFluVak» surpassed the commercial analogue.

## Сведения об авторах:

**Мороз Наталья Владимировна**, канд. ветер. наук, заведующая лабораторией профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ»; д. 33, ул. Институтский городок, г. Владимир, Российская Федерация, 600901; e-mail: moroz@arriah.ru

**Фролов Сергей Владимирович**, канд. ветер. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ»; д. 33, ул. Институтский городок, г. Владимир, Российская Федерация, 600901; e-mail: frolov@arriah.ru.

**Щербакова Лидия Олеговна**, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории диагностики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ»; д. 33, ул. Институтский

городок, г. Владимир, Российская Федерация, 600901; e-mail: scherbakova@arriah.ru.

**Кулаков Владимир Юрьевич**, канд. ветер. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИЗЖ»; д. 33, ул. Институтский городок, г. Владимир, Российская Федерация, 600901; e-mail: kulakov@arriah.ru

#### Author affiliation:

**Moroz Natal'ya Vladimirovna**, Ph. D. in Veterinary Medicine, Head of the Laboratory for Prevention of Bird Diseases of the FSBI «ARRIAH»; house 33, Institutsky gorodok str., Vladimir city, Russian Federation, 600901; e-mail: moroz@arriah.ru

**Frolov Sergey Vladimirovich**, Ph. D. in Veterinary Medicine, Leading Researcher of the FSBI «ARRIAH»; house 33, Institutsky gorodok str., Vladimir city, Russian Federation, 600901; e-mail: frolov@arriah.ru.

**Shcherbakova Lydia Olegovna**, Ph. D. in Biology, Leading Researcher of the Reference Laboratory for Diagnostics of Bird Diseases of the FSBI «ARRIAH»; house 33, Institutsky gorodok str., Vladimir city, Russian Federation, 600901; e-mail: scherbakova@arriah.ru.

**Kulakov Vladimir Yur'evich**, Ph. D. in Veterinary Medicine, Leading Researcher of the FSBI «ARRIAH»; house 33, Institutsky gorodok str., Vladimir city, Russian Federation, 600901; e-mail: kulakov@arriah.ru

DOI: 10.25690/VETPAT.2022.98.44.004

УДК: 619.636

**Лабазов И. В., Устьянцев Д. А., Махно Е. А., Зеленков А. П., Зеленкова Г. А.**

## **ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖИВОТНЫХ НА ПРИМЕРЕ ДИАГНОСТИКИ ПАРВОВИРУСНОГО ЭНТЕРИТА СОБАК И КОШЕК (ПАНЛЕЙКОПЕНИЯ)**

**Ключевые слова:** этиология, патогенез, парвовирусный энтерит, кошка, собака, диагностика, вирус и его штаммы, макро- и микропрепараты, профилактика.

**Резюме:** Инфекционные заболевания мелких домашних животных всё чаще стали регистрироваться и распространяться в популяциях кошек и собак. Угрозы возникновения парвовирусного энтерита собак и кошек (панлейкопения) на урбанизированных территориях, в связи с ростом числа безнадзорных животных, определяют важность контроля за распространением данного заболевания среди животных со стороны ветеринарного сообщества и коммунальных служб. Парвовирусный энтерит – широко распространённое и контагиозное заболевание (преимущественно молодняка) с высокой летальностью (до 100 %). Так, в настоящей статье представлено описание возбудителя инфекционного заболевания парвовирусного энтерита собак и кошек (панлейкопения), современной эпизоотической ситуации по заболеванию в мире, пути передачи, патогенез и клинические признаки, а также способы диагностики парвовирусного энтерита собак и кошек (панлейкопения) и меры контроля и профилактики распространения данной инфекционной патологии. Материалы, представленные в статье, имеют хорошую иллюстрацию, что помогает более полному восприятию изложенных данных. Данная статья будет востребована в учебном процессе при изучении парвовирусного энтерита собак и кошек (панлейкопения) и в среде практикующих ветеринарных врачей.