



Сравнение иммуногенной активности вакцин против низкопатогенного гриппа птиц подтипа H9N2, изготовленных на основе вирусов генетических линий G1 и Y280

С. В. Фролов¹, Л. О. Щербак ова², Н. В. Мороз³, В. Н. Ир за⁴, В. Ю. Кулаков⁵

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

¹ ORCID 0000-0001-6802-9940, e-mail: frolov@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-5434-6179, e-mail: scherbakova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9672-8594, e-mail: moroz@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0001-7489-1772, e-mail: irza@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-1898-4576, e-mail: kulakov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В связи с генетическим разнообразием вирусов низкопатогенного гриппа птиц H9N2 представлялось целесообразным изучение иммуногенной активности вакцин, изготовленных на основе антигенов штаммов A/chicken/Amursky/03/12 и A/chicken/Chelyabinsk/314-1/20 – представителей генетических линий Y280 и G1 соответственно, циркулирующих на территории Российской Федерации. Поскольку низкая патогенность возбудителя не позволяет продемонстрировать протективные свойства вакцин прямыми методами оценки иммуногенности препаратов (например, заболеваемость и смертность), применяли косвенные методы: определение антигенной родственности штаммов, напряженности поствакцинального гуморального гомо- и гетерологического иммунитета птиц, оценка подавления (редукции) синтеза генома вируса после контрольного заражения в организме вакцинированных птиц. Было установлено, что использованные в составе вакцин штаммы имели некоторые антигенные различия, которые были обнаружены в реакции торможения гемагглютинации при контроле поствакцинального иммунного ответа птиц. В целом обе вакцины индуцировали напряженный гуморальный иммунитет у привитых птиц ($9-10 \log_2$ в реакции торможения гемагглютинации) с некоторой разницей в величине иммунного ответа при использовании гомо- и гетерологического антигенов. Также было достоверно установлено, что гомологичный иммунитет обеспечивал более выраженное подавление репродукции вируса при экспериментальном заражении. Степень подавления (редукции) синтеза генома вирулентного вируса низкопатогенного гриппа птиц в организме вакцинированных особей после их заражения вирусом H9N2 генетической линии G1 была выше у птиц, привитых гомологичной вакциной при одинаковых сроках детекции генома в пробах биоматериала. Показано, что с учетом антигенных и иммуногенных различий между штаммами вируса низкопатогенного гриппа птиц H9N2 целесообразно использование обоих антигенных компонентов в составе инактивированных вакцин.

Ключевые слова: вакцина, низкопатогенный вирус гриппа птиц подтипа H9N2, иммуногенность вакцины, гуморальный иммунитет

Благодарность: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Фролов С. В., Щербак ова Л. О., Мороз Н. В., Ир за В. Н., Кулаков В. Ю. Сравнение иммуногенной активности вакцин против низкопатогенного гриппа птиц подтипа H9N2, изготовленных на основе вирусов генетических линий G1 и Y280. *Ветеринария сегодня*. 2021; 10 (3): 224–229. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-224-229.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Фролов Сергей Владимирович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: frolov@arriah.ru.

Comparative testing of vaccines based on viruses of genetic lineages G1 and Y280 for their potency against low pathogenic avian influenza H9N2

S. V. Frolov¹, L. O. Scherbakova², N. V. Moroz³, V. N. Irza⁴, V. Yu. Kulakov⁵

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

¹ ORCID 0000-0001-6802-9940, e-mail: frolov@arriah.ru

² ORCID 0000-0001-5434-6179, e-mail: scherbakova@arriah.ru

³ ORCID 0000-0002-9672-8594, e-mail: moroz@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0001-7489-1772, e-mail: irza@arriah.ru

⁵ ORCID 0000-0002-1898-4576, e-mail: kulakov@arriah.ru

SUMMARY

Due to the genetic diversity of low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses of subtype H9N2, it deemed appropriate to study the potency of the vaccines based on the antigens of strains A/chicken/Amursky/03/12 and A/chicken/Chelyabinsk/314-1/20 that represent currently circulating in the Russian Federation genetic lineages Y280 and G1, respectively. While low pathogenicity of the agent does not allow demonstrating the vaccine protective properties by the direct methods generally used for potency assessment (e.g. morbidity and mortality), the indirect methods were used: determination of antigenic relatedness of the strains, level of the postvaccinal homologous and heterologous humoral immunity, analysis of the virus genome synthesis inhibition (reduction) in vaccinated birds following their challenge. The strains used in the vaccines were determined to have some antigenic differences, which were demonstrated in the hemagglutination inhibition (HI) assay during control of the postvaccinal immunity in birds. Both vaccines generally induced strong humoral immunity in vaccinated birds ($9-10 \log_2$ determined using HI assay) with some difference in the levels of the immune response following the use of homologous or heterologous antigens. It was also reliably determined that homologous immunity facilitated more expressed inhibition of the virus reproduction after the challenge. The level of inhibition (reduction) of the virulent LPAI virus genome synthesis in vaccinated birds following their challenge with H9N2 virus of genetic lineage G1 was higher in birds following homologous vaccination, while the time periods of the genome detection in the biomaterial samples were the same. It was demonstrated that due to antigenic and immunogenic differences between LPAI H9N2 strains, use of both antigenic components in the inactivated vaccines is appropriate.

Keywords: vaccines, low pathogenic avian influenza (LPAI), vaccine potency, humoral immunity

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

For citation: Frolov S. V., Scherbakova L. O., Moroz N. V., Irza V. N., Kulakov V. Yu. Comparative testing of vaccines based on viruses of genetic lineages G1 and Y280 for their potency against low pathogenic avian influenza H9N2. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (3): 224–229. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-224-229.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Sergey V. Frolov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: frolov@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы низкопатогенного гриппа птиц (НГП) H9N2 широко распространены у домашних птиц в странах Африки, Азии и Ближнего Востока. Основываясь на генетических особенностях, выделяют две основные генетические группы вирусов H9N2 – «североамериканскую» и «евразийскую», циркулирующие среди домашних и диких птиц. Евразийская группа делится на три основных генотипа: G1, Y280 и Y439. Вирусы генетических линий G1 и Y280 демонстрируют наибольшее географическое распространение, простирающееся от Восточной Азии до Ближнего Востока [1–4].

В 2012, 2017 и 2018 гг. случаи заболевания птиц НГП в промышленном птицеводстве Российской Федерации вызывал вирус H9N2 линии Y280 [5–7]. В 2018 г. вирус низкопатогенного гриппа птиц H9N2 генетической линии G1 был впервые изолирован в Амурской области от диких птиц [8].

В 2019–2020 гг. вирус низкопатогенного гриппа H9N2 линии G1 был выявлен у птиц, выращиваемых на промышленных птицеводческих предприятиях Уральского региона (Челябинская обл. и Пермский край), а также в хозяйствах европейской части страны [5–7, 9].

Ввиду ощутимого экономического ущерба, наносимого данной инфекцией, в ряде стран активно проводится вакцинопрофилактика НГП H9N2: Израиль (с 2003 г.), Южная Корея (с 2007 г.). Лидером в профилактике НГП подтипа H9N2 является Китай (с 1998 г.) [1].

В 2012 г. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» была разработана инактивированная ассоциированная эмульсионная вакцина против НГП H9N2 и ньюкаслской болезни и налажен серийный выпуск препарата. В качестве производственного штамма в составе вакцины используется вирус H9N2 линии Y280, выделенный в 2012 г. от кур на птицефабрике в Амурской области. В настоящее время

данная вакцина успешно применяется в промышленном птицеводстве РФ.

В связи с генетическим разнообразием вирусов НГП H9N2 представлялось целесообразным изучение иммуногенной активности вакцин против гриппа птиц H9N2 на основе антигенов разных сублиний вирусов, циркулирующих на территории РФ. Поскольку низкая патогенность возбудителя не позволяет продемонстрировать протективные свойства вакцин прямыми методами оценки иммуногенности препаратов (например, заболеваемость и смертность), применяли косвенные методы: определение антигенной родственности штаммов, напряженности поствакцинального гуморального гомо- и гетерологичного иммунитета птиц, оценки подавления (редукции) синтеза генома вируса после контрольного заражения в организме вакцинированных птиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антигены. В эксперименте использовали антигены следующих штаммов вируса НГП подтипа H9N2:

– A/chicken/Chelyabinsk/314-1/20 (генотип G1), инфекционная активность до инактивации $8,75 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, гемагглютинирующая активность $9 \log_2 \text{ ГАЕ}$, обозначен как «Челябинск-20»;

– A/chicken/Amursky/03/12 (генотип Y280), инфекционная активность до инактивации $8,25 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, гемагглютинирующая активность $9 \log_2 \text{ ГАЕ}$, обозначен как «Амурский-12».

Для стандартизации содержания антигена в прививной дозе, установленного в соответствии с инфекционным титром до инактивации, перед эмульгированием проводили разведение инактивированной суспензии вируса штамма «Челябинск-20» (в 3 раза) с таким расчетом, чтобы в прививной дозе вакцины содержалось

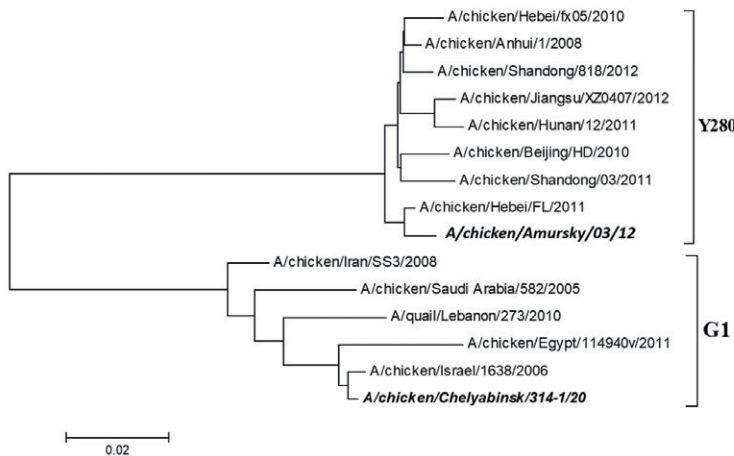


Рис. Филогенетическое древо, построенное методом NJ с помощью пакета программ MEGA 6.0 на основе выравнивания нуклеотидной последовательности гена HA НГП H9

Fig. Phylogenetic tree constructed on the basis of LPAI H9 HA gene alignment using NJ method and MEGA 6.0 software

равное количество антигенов вируса НГП.

Принадлежность вирусов к разным генетическим линиям показана на рисунке.

Вакцины. Использованные в эксперименте две вакцины в качестве активного компонента содержали смесь равных объемов антигенов вируса НГП и вируса ньюкаслской болезни:

- экспериментальная вакцина с антигеном штамма «Челябинск-20», далее обозначали как «Вакцина шт. «Челябинск-20» (G1);
- экспериментальная вакцина с антигеном штамма «Амурский-12», далее обозначали как «Вакцина шт. «Амурский-12» (Y280)».

При изготовлении вакцин активный компонент (антиген) объединяли с масляным адъювантом Montanide ISA 70 (Seppic, Франция) в соотношении 30:70 (% по весу) и эмульгировали на высокоскоростном лабораторном смесителе Silverson (Англия) при скорости 6000 об/мин в течение 5 мин.

Вirus НГП для контрольного заражения. В эксперименте использовали вирус генетической линии G1 – A/chicken/Chelyabinsk/314-1/20 H9N2 («Челябинск-20») – в виде суспензии, приготовленной из лиофилизата с исходной инфекционной активностью $8,95 \text{ lg ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

Птица. Эксперимент проводили на цыплятах яичного направления в возрасте 80 сут из хозяйства, благополучного по острым инфекционным болезням птиц.

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

Схема эксперимента. Соответственно тестируемому препарату сформировали две группы птиц по 20 голов в каждой. Вакцины вводили внутримышечно в область груди в объеме $0,5 \text{ см}^3$.

Через 28 сут после иммунизации птиц обеих групп заражали вирусом «Челябинск-20». Вирусосодержащую

суспензию вводили перорально в объеме 1 см^3 , инфицирующая доза составила $7,3 \text{ lg ЭИД}_{50}$.

В процессе эксперимента после заражения ежедневно, иногда с интервалом в один день, в обеих группах птиц проводили отбор ротоглоточных и клоакальных проб (мазков) и исследовали их методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) для детекции генома вируса контрольного заражения. Всего было отобрано 12 проб каждого вида материала.

Перед заражением и через 15 сут после него у всех цыплят отбирали пробы крови для сравнительной оценки титров антител к вирусу НГП в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с антигенами вирусов двух разных генетических линий.

Методы исследований. Обнаружение генома вируса в биопробах и определение порогового цикла амплификации проводили в соответствии с МУ 45-16 «Методические указания по выявлению РНК вируса гриппа птиц типа А методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени» [10].

Серологические исследования. Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) выполняли по общепринятой методике с использованием диагностического набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» для определения наличия антител к вирусу гриппа птиц подтипа H9 (антиген вируса H9N2 генетической линии Y280) и полученного при изготовлении образца вакцины антигена вируса H9N2 генетической линии G1. Положительными титрами антител считали значения $\geq 4 \log_2$ ($\geq 1:16$).

Статистическая обработка данных. Проводили анализ существенности различий количественных показателей. Использовали непараметрический метод множественных сравнений Миллера [11, с. 141] для k -числа выборок (групп), основанный на проверке выполнимости неравенства следующего вида $|H_1 - H_2| / (\sqrt{k(kn + 1)/12}) \geq q$, где H_1 и H_2 – средние ранги показателей сопоставляемых выборок 1 и 2 в общем упорядоченном ряду; n – объемы выборок ($n_1 = n_2 = n$); q – табличный коэффициент для числа k и заданной вероятности ошибки прогноза (p) [11, с. 340]. Различия считали существенными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение антигенного родства штаммов вируса НГП H9N2 и оценка напряженности поствакцинального иммунитета птиц. Сыворотки крови птиц через 28 сут после иммунизации исследовали с гомологичным и гетерологичным антигенами, сыворотки после заражения – с антигеном штамма «Челябинск-20». Полученные результаты приведены в таблице 1. Для удобного восприятия данных таблицы вакцины и антигены обозначены по их принадлежности к генетическим линиям вируса H9N2.

Из данных таблицы 1 следует:

а) титры антител, установленные в гомологичных системах при тестировании сывороток крови, полученных через 28 сут после иммунизации птиц обеими вакцинами, были практически одинаковы, о чем свидетельствует равенство логарифмических медиан. Средний титр (T) составил $9 \log_2$ ($1:512$). Это означает, что интенсивность гуморальной иммунной реакции птиц на каждый из испытанных антигенов была достаточно выраженной и приближенно равной;

б) при тестировании сывороток крови, указанных в пункте «а», средние ранговые эквиваленты титров (H),

установленные в гомологичных системах для обоих антигенов, достоверно ($p < 0,05$) отличались от соответствующих значений при использовании гетерологичных антигенов. Для вакцины «Г1» значение H составило: $H_{\text{гомол.}} = 24,2 > H_{\text{гетерол.}} = 16,8$ и для вакцины «Y280»: $H_{\text{гомол.}} = 24,4 > H_{\text{гетерол.}} = 16,6$. Это означало, что в средних тенденциях гетерологичные реакции имели существенно меньшую активность, что, в свою очередь, указывало на определенные антигенные отличия между изучаемыми штаммами.

Для обоих антигенов разность медиан логарифмических титров в гетеро- и гомологичных реакциях составила отрицательное значение ($8 \log_{2(\text{гетерол.})} - 9 \log_{2(\text{гомол.})} = -1 \log_2$), т. е. гетерологичная реакция в обоих случаях была в два раза менее активной ($\text{antilog}_2(-1) = 1/2$). Данный показатель может быть

интерпретирован по Архетти и Хорсвалу как оценка антигенного родства (r), которая для каждого штамма составила значение $r = 1/2 \times 100 = 50\%$. Полученный показатель свидетельствует о незначительном антигенном различии изучаемых вирусов;

в) при постановке реакции с антигеном штамма «Челябинск-20» и сыворотками крови, полученными после заражения птиц указанным штаммом вируса НГП, средние ранговые эквиваленты титров, установленные для сывороток, полученных от привитых экспериментальной и серийной вакцинами птиц, достоверно ($p < 0,01$) различались: $H_{\text{гомол.}} = 15,4 < H_{\text{гетерол.}} = 25,7$. Такой эффект можно объяснить тем, что иммунитет у птиц после введения вакцины на основе антигена штамма «Челябинск-20» был достаточно напряженным по отношению к гомологичному вирусу, и проникновение

Таблица 1

Титры антител к вирусу НГП в сыворотках крови вакцинированных птиц, установленные в РТГА

Table 1

HI titres of LPAI virus antibodies in sera of vaccinated birds

Оценка титров антител ($T, \log_2$) через 28 сут после иммунизации и через 15 сут после заражения, установленные в РТГА при использовании гомологичных и гетерологичных антигенов											
28 сут после вакцинации						15 сут после заражения					
Вакцина шт. «Челябинск-20» (G1)		Вакцина шт. «Амурский-12» (Y280)				Вакцина шт. «Челябинск-20» (G1)	Вакцина шт. «Амурский-12» (Y280)				
Антиген G1	Антиген Y280	Антиген Y280	Антиген G1								
9	25*	9	25	8	15,5	7	6	9	11,5	10	24
10	34	7	4,5	11	39,5	8	15,5	10	24	9	11,5
8	14	8	14	9	25,5	7	6	8	3	12	38
8	14	9	25	9	25,5	7	6	9	11,5	11	32,5
7	4,5	8	14	8	15,5	7	6	9	11,5	8	3
9	25	7	4,5	8	15,5	10	35	9	11,5	10	24
9	25	8	14	9	25,5	9	25,5	10	24	12	38
11	39	10	34	10	35	9	25,5	9	11,5	9	11,5
11	39	9	25	8	15,5	8	15,5	11	32,5	9	11,5
9	25	7	4,5	9	25,5	7	6	9	11,5	12	38
9	25	7	4,5	7	6	7	6	10	24	10	24
9	25	10	34	9	25,5	10	35	9	11,5	10	24
10	34	8	14	9	25,5	9	25,5	10	24	10	24
11	39	8	14	10	35	7	6	8	4	11	32,5
8	14	10	34	9	25,5	10	35	9	11,5	12	38
8	14	7	4,5	11	39,5	8	15,5	11	32,5	10	24
10	34	8	14	10	35	7	6	10	24	11	32,5
7	4,5	8	14	9	25,5	7	6	7	1	11	32,5
9	25	7	4,5	7	6	8	15,5	9	11,5	9	11,5
9	25	10	34	9	25,5	10	35	9	11,5	12	38
9**	(24,2)	8	(16,8)	9	(24,4)	8	(16,6)	9	(15,4)	10	(25,7)
$p < 0,05***$				$p < 0,05$				$p < 0,01$			

* курсивом указан ранг (порядковый номер) оценки в объединенной упорядоченной выборке титров, установленных в гомо- и гетерологичных системах;

** жирным шрифтом представлена медиана выборки ("T", в скобках указан средний ранг выборочных оценок (H);

*** оценка существенности отличий средних тенденций значений титров в соответствующих системах (ошибка прогноза).

* in italic is the rank (serial number) of the value in the combined and ordered sample of titers determined using homologous and heterologous systems;

** in bold is median sample ("T", in brackets is mean rank of random values (H);

*** statement of significance of the difference between average trends of titres in the relative systems (prediction error).

возбудителя в организм не вызвало воздействия на иммунную систему птиц. У птиц, привитых серийной вакциной на основе антигена штамма «Амурский-12», отмечен незначительный прирост титров антител, т. е. при заражении гетерологичный вирус дополнительно воздействовал на иммунную систему птиц. Соответствующие медианы логарифмических титров ($\log_2$) составили значения $T_{\text{гомол.}} = 9$ и $T_{\text{гетерол.}} = 10$.

Исследование репродукции вируса НГП в организме вакцинированных птиц. В течение 14 дней после заражения выборочно было отобрано по 12 проб ротоглоточных и клоакальных проб для исследования в ОТ-ПЦР-РВ на присутствие и оценку концентрации генома вируса гриппа. Определяли пороговые циклы амплификации (Ct). Меньшая величина Ct соответствовала большей исходной концентрации генетического материала вируса в пробе. Величину $Ct \geq 37$ считали негативным показателем, т. е. геном вируса отсутствовал.

Таблица 2
Результаты обнаружения генома вируса гриппа в ОТ-ПЦР-РВ в пробах, полученных от вакцинированных птиц после заражения

Table 2
Real-time RT-PCR-detection of avian influenza virus genome in the samples collected from vaccinated birds after challenge

Оценка пороговых циклов амплификации (Ct) в виде отклонений от негативной реакции ($d_j = 37 - Ct$) соответственно времени после заражения (j , сут), виду проб (ротоглоточные и клоакальные) и типу вакцин, использованных для иммунизации птиц. По видам проб приведены ранги значений d и результаты соответствующих сравнений								
j	Ротоглоточные пробы				Клоакальные пробы			
	Вакцина шт. «Челябинск-20» (G1)		Вакцина шт. «Амурский-12» (Y280)		Вакцина шт. «Челябинск-20» (G1)		Вакцина шт. «Амурский-12» (Y280)	
1	0	4,5*	0	4,5	0	4,5	0	4,5
2	0,91	14	11,97	24	0	4,5	0	4,5
3	0,94	15	10,17	22	1,01	14	4,54	23
4	4,26	21	10,25	23	3,43	21	4,65	24
5	1,62	19	1,23	18	1,54	18	3,49	22
6	0	4,5	0,73	12	0	4,5	0,68	13
7	0,43	11	1,17	17	0,31	11	1,42	16
8	0	4,5	0	4,5	0	4,5	0,39	12
9	0	4,5	0,83	13	0	4,5	1,18	15
10	0,16	9	3,83	20	0,06	9	1,53	17
11	0	4,5	0,95	16	0	4,5	1,55	19
12	0	4,5	0,39	10	0,15	10	2,58	20
	(9,67)**		(15,33)		(9,17)		(15,83)	
	$p < 0,05^{***}$				$p < 0,025$			

* курсивом указан ранг (порядковый номер) оценки в объединенной упорядоченной выборке значений d , установленных в пробах данного вида, полученных от птиц, привитых вакцинами «G1» и «Y280»;

** в скобках указан средний ранг выборочных оценок (H);

*** оценка существенности различий (ошибка прогноза) средних тенденций значений выборок.

* in italic is the rank (serial number) of the value in the combined and ordered sample of d values determined for specific type of samples collected from birds immunized with G1 and Y280 vaccines;

** in brackets is mean rank of random values (H);

*** statement of significance of the difference (prediction error) between average trends of sample values.

Для удобства проведения анализа результаты реакции, установленные на данном временном интервале (j), вычисляли как отклонения от негативной оценки в виде значений $d_j = 37 - Ct$. Таким образом, величины отклонений могли находиться в диапазоне $0 \leq d \leq 36$. Полученные в ходе эксперимента результаты представлены в таблице 2.

Из данных, представленных в ней, следует:

а) после заражения вакцинированных птиц концентрация вирусного генома во всех видах изученных проб имела фазу роста, пиковую величину и фазу снижения. Присутствие генома возбудителя как в ротоглоточных, так и клоакальных пробах указывает на его распространение в организме;

б) ротоглоточные d -показатели, установленные в течение первых 4 сут после заражения, формально превосходили аналогичные величины в клоакальных пробах. Это могло свидетельствовать о несколько более активной репродукции вируса в области гортани, глотки или верхних дыхательных путей птицы. Однако статистическую достоверность такого предположения, в связи с высокой вариацией первичных оценок и небольшими объемами выборок, установить не удалось;

в) эффективность репродукции вируса контрольного заражения зависела от гомологии с вакцинным антигеном. Гомологичный иммунный фон существенно редуцировал развитие возбудителя. Средние ранговые эквиваленты значений d , установленные в ротоглоточных пробах, полученных от привитых разными вакцинами птиц, достоверно ($p < 0,05$) различались: $H_{\text{гомол.}} = 9,67 < H_{\text{гетерол.}} = 15,33$. Подобный результат ($p < 0,025$) был получен и при сопоставлении соответствующих эквивалентов d -оценок, установленных при анализе клоакальных проб: $H_{\text{гомол.}} = 9,17 < H_{\text{гетерол.}} = 15,83$. В течение 12 сут наблюдений совокупные показатели воспроизводства вируса заражения в виде сумм значений d на фоне гомологичного иммунитета в ротоглоточных и клоакальных пробах составили величины 8,32 и 6,5 соответственно, аналогичные оценки на фоне гетерологичного иммунитета имели значения 41,52 и 22,01.

Приведенные данные согласуются с ранее полученными в ФГБУ «ВНИИЗЖ» результатами экспериментов с вакцинами против высокопатогенного гриппа птиц на основе вируса H5N1 (клады 2.2 и 2.3.2) при изучении их протективных свойств в отношении вируса H5N8 (клада 2.3.4.4в). Результаты серологических исследований поствакцинального иммунитета в РТГА с использованием разных диагностических антигенов также подтверждали антигенную вариабельность вируса гриппа птиц подтипа H5. Результаты острых опытов показали, что определяющим фактором в обеспечении защитных свойств вакцин является соответствие типа гемагглютинина вакцинного антигена гемагглютинину полевого вируса и его концентрация в составе вакцины [12].

В наших экспериментах по показателям напряженности иммунитета обе вакцины значительно превысили рекомендуемое Руководством МЭБ минимальное значение $5 \log_2$ [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антигены вируса низкопатогенного гриппа птиц подтипа H9N2 штаммов A/chicken/Chelyabinsk/314-1/20 (генотип G1) и A/chicken/Amursky/03/12 (генотип Y280) в составе активного компонента инактивированной эмульсионной ассоциированной вакцины против грип-

па птиц H9N2 и ньюкаслской болезни индуцируют напряженный гуморальный иммунитет.

Указанные штаммы имеют некоторые антигенные различия, которые могут быть обнаружены с помощью реакции торможения гемагглютинации при контроле поствакцинального иммунного ответа птиц. Гомологичный иммунитет обеспечивает более выраженное подавление репродукции вируса при экспериментальном заражении.

Учитывая выявленные антигенные различия изученных штаммов, а также дальнейшую эволюцию возбудителя, в состав активного компонента инактивированных вакцин против гриппа птиц (H9) целесообразно включать оба антигена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1–4, 8, 13 см. REFERENCES)

5. Варкентин А. В., Ирза В. Н., Волков М. С., Демченко Л. А. Клинический случай низкопатогенного гриппа птиц на птицефабрике яичного направления. *Птица и птицепродукты*. 2020; 3: 10–13. DOI: 10.30975/2073-4999-2020-22-3-10-13.
6. Волков М. С., Варкентин А. В., Ирза В. Н. О распространении вируса низкопатогенного гриппа A/H9N2 в мире и на территории РФ. Проблемы искоренения болезни. *Ветеринария сегодня*. 2019; 3 (30): 51–56. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-51-56.
7. Зиняков Н. Г., Осипова О. С., Акшалова П. Б., Сосипаторова В. Ю., Андриясов А. В., Андрейчук Д. Б., Чвала И. А. Анализ генетических свойств изолята вируса гриппа A/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2, выделенного на территории Челябинской области. *Ветеринария сегодня*. 2019; 4 (31): 49–53. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-49-53.
9. Марченко В. Ю., Гончарова Н. И., Евсеев В. А., Суслопаров И. М., Гаврилова Е. В., Максютов Р. А., Рыжиков А. Б. Обзор эпидемиологической ситуации по высокопатогенному вирусу гриппа птиц в России в 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1: 42–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-42-49.
10. МУ 45-16 Методические указания по выявлению РНК вируса гриппа птиц типа А методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени: утв. Россельхознадзором 06.06.2016. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. 13 с.
11. Холлендер М., Вулф Д. А. Непараметрические методы статистики. Пер. с англ. Д. С. Шмерлинг. М.: Финансы и статистика; 1983. 518 с.
12. Ирза В. Н., Волков М. С., Варкентин А. В., Фролов С. В., Алтунин Д. А. Протективные свойства отечественных серийных и экспериментальных вакцин в отношении вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипов H5N1 и H5N8, изолированных в 2015–2016 гг. *Птица и птицепродукты*. 2017; 6: 12–15. Режим доступа: <http://vniipp.ru/images/statya/20176/st4.pdf>.

REFERENCES

1. Peacock T. H. P., James J., Sealy J. E., Iqbal M. A. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses*. 2019; 11 (7):620. DOI: 10.3390/v11070620.

2. Guo Y. J., Krauss S., Senne D. A., Mo I. P., Lo K. S., Xiong X. P. Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology*. 2000; 267 (2): 279–288. DOI: 10.1006/viro.1999.0115.
3. Nagy A., Mettenleiter T. C., Abdelwhab E. M. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. *Epidemiol. Infect.* 2017; 145 (16): 3320–3333. DOI: 10.1017/S0950268817002576.
4. Dong G., Luo J., Zhang H., Wang C., Duan M., Deliberto T. J. Phylogenetic diversity and genotypical complexity of H9N2 influenza A viruses revealed by genomic sequence analysis. *PLoS One*. 2011; 6 (2):17212. DOI: 10.1371/journal.pone.0017212.
5. Varkentin A. V., Irza V. N., Volkov M. S., Demchenko L. A. Case study of low pathogenic avian influenza H9N2 on commercial egg layers farm. *Poultry and Poultry Products*. 2020; 3: 10–13. DOI: 10.30975/2073-4999-2020-22-3-10-13. (in Russian)
6. Volkov M. S., Varkentin A. V., Irza V. N. Spread of low pathogenic avian influenza A/H9N2 in the world and Russian Federation. Challenges of disease eradication. *Veterinary Science Today*. 2019; 3 (30): 51–56. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-51-56.
7. Zinyakov N. G., Osipova O. S., Akshalova P. B., Sosipatorova V. Yu., Andriyashov A. V., Andreychuk D. B., Chvala I. A. Analysis of genetic characteristics of influenza virus a/chicken/Chelyabinsk/30/2019 H9N2 isolated in Chelyabinsk Oblast. *Veterinary Science Today*. 2019; 4 (31): 49–53. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-4-31-49-53.
8. Sharshov K., Kurskaya O., Sobolev I., Leonov S., Kabilov M., Alikina T., et al. First detection of a G1-like H9N2 virus in Russia, 2018. *Korean J. Vet. Res.* 2019; 59 (1): 37–42. DOI: 10.14405/kjvr.2019.59.1.37.
9. Marchenko V. Yu., Goncharova N. I., Evseenko V. A., Susloparov I. M., Gavrilova E. V., Maksyutov R. A., Ryzhikov A. B. Overview of the epidemiological situation on highly pathogenic avian influenza virus in Russia in 2018. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2019; 1: 42–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-42-49. (in Russian)
10. MI 45-16 Methodical instructions for the detection of avian influenza A virus RNA using real-time RT-PCR: approved by the Rosselkhoznadzor on 06.06.2016. Vladimir: FGBI "ARRIAH"; 2016. 13 p. (in Russian)
11. Hollander M., Wolfe D. A. Nonparametric Statistical Methods. 1st ed. New York: Wiley Sons Limited, Inc.; 1973. 503 p.
12. Irza V. N., Volkov M. S., Varkentin A. V., Frolov S. V., Altunin D. A. Protective properties of the domestic commercial and experimental vaccines against highly pathogenic subtype H5N1 and H5N8 avian influenza viruses isolated in 2015–2016 [Protektivnye svoystva otechestvennykh seriyinykh i eksperimental'nykh vakcin v otnoshenii virusov vysokopatogennogo grippa ptic podtipov H5N1 i H5N8, izolirovannykh v 2015–2016 gg.]. *Poultry and Poultry Products*. 2017; 6: 12–15. Available at: <http://vniipp.ru/images/statya/20176/st4.pdf>. (in Russian)
13. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). Chapter 3.3.4. In: *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Available at: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf.

Поступила 17.05.2021

Принята в печать 28.07.2021

Received on 17.05.2021

Approved for publication on 28.07.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Фролов Сергей Владимирович, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Щербакова Лидия Олеговна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Мороз Наталья Владимировна, кандидат ветеринарных наук, заведующая лабораторией профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Ирза Виктор Николаевич, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Кулаков Владимир Юрьевич, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

Sergey V. Frolov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Lidia O. Scherbakova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Natalya V. Moroz, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Viktor N. Irza, Doctor of Sciences (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Information and Analysis Centre, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

Vladimir Yu. Kulakov, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.