



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-47-54>

УДК 619:616.98:578.832.1:636.52/.58:615.371:616-097.3(470)

# Иммуногенная активность вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против актуального для России в 2023 году вируса высокопатогенного гриппа птиц H5N1

Н. В. Мороз, Д. Л. Долгов, С. В. Фролов, А. Д. Грехнева, В. Ю. Кулаков

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Вакцинопрофилактика высокопатогенного гриппа птиц является надежным способом борьбы с болезнью. Среди антигриппозных вакцин наиболее широкое распространение имеют инактивированные цельновирионные препараты. Изучение иммуногенной активности вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против актуальных вирусов высокопатогенного гриппа птиц является важной задачей.

**Цель исследования.** Оценка иммуногенной активности инактивированной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против актуального для России в 2023 г. высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа H5N1.

**Материалы и методы.** Для испытаний готовили 4 вакцинных образца, содержащих цельный и разведенный 1/25, 1/50 и 1/100 антиген вируса гриппа птиц H5 в прививном объеме. Каждым препаратом была привита отдельная группа птиц 4-недельного возраста. Через 28 сут куры были заражены вирусом гриппа птиц A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1, который был выделен во время вспышки заболевания на территории Российской Федерации и филогенетически определен как высокопатогенный возбудитель, принадлежащий к азиатской генетической линии вируса высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5 (клада 2.3.4.4b). В группах зараженных птиц в течение 6 дней регистрировали погибших и больных особей.

**Результаты.** Установили, что птицы, привитые цельной дозой антигена, были полностью защищены от клинического проявления болезни после контрольного заражения. Уменьшение концентрации антигена в прививном объеме обусловило снижение протективной защиты вакцины. Показатель смертности после заражения контрольных (интактных) цыплят составил 10/10. Анализ зависимости протективной активности вакцины от величины иммунизирующей дозы антигена показал, что одна прививная доза содержала 97 ПД<sub>50</sub>. Исследование связи протективной защиты и напряженности поствакцинального гуморального иммунитета позволило определить, что ожидаемый среднegrupповой титр антител, который соответствует защите 90% вакцинированных птиц, составил 5,7 log<sub>2</sub>, или ≈ 1:52.

**Заключение.** Вакцина «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» обладает высокой иммуногенной активностью против актуального для России в 2023 г. вируса высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1.

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

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

**Для цитирования:** Мороз Н. В., Долгов Д. Л., Фролов С. В., Грехнева А. Д., Кулаков В. Ю. Иммуногенная активность вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против актуального для России в 2023 году вируса высокопатогенного гриппа птиц H5N1. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (1): 47–54. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-47-54>

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Мороз Наталья Владимировна, канд. вет. наук, заведующий лабораторией профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, [moroz@arriah.ru](mailto:moroz@arriah.ru)

## Immunogenic activity of “ARRIAH-AviFluVac” vaccine against high-pathogenicity H5N1 avian influenza virus relevant for Russia in 2023

Natalia V. Moroz, Dmitry L. Dolgov, Sergey V. Frolov, Alena D. Grekhneva, Vladimir Yu. Kulakov

Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

## ABSTRACT

**Introduction.** Vaccination against high-pathogenicity avian influenza (HPAI) is a well-proven way to control the disease. Inactivated whole-virion products are the most popular among the influenza vaccines. It is important to study immunogenicity of “ARRIAH-AviFluVac” vaccine against currently circulating HPAI viruses.

**Objective.** To assess immunogenic activity of “ARRIAH-AviFluVac” inactivated vaccine against high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1 subtype) which was relevant for Russia in 2023.

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

**Materials and methods.** For testing purposes 4 vaccine dilutions were prepared containing whole and diluted H5 avian influenza virus antigen (1/25, 1/50 and 1/100). Each diluted sample was used to vaccinate a separate group of 4-week-old chickens. On day 28 post vaccination, the chickens were challenged with avian influenza virus A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1, which was isolated during an outbreak in the Russian Federation and was phylogenetically defined as high-pathogenicity agent belonging to the Asian genetic lineage of HPAI subtype H5 (clade 2.3.4.4b). Dead and sick chickens were reported in the infected groups for 6 days.

**Results.** The chickens vaccinated with a whole antigen dose were found to be completely protected from the clinical signs after the challenge. A decrease in the antigen concentration in the vaccine volume decreased the vaccine-induced protection. The mortality rate after the challenge of control (intact) chickens was 10/10. An analysis of the dependence of the vaccine protectivity on the volume of the antigen immunizing dose showed that one inoculation dose contained 97 PD<sub>50</sub>. An analysis of the link between protection and strength of the post-vaccination humoral immunity allowed to calculate that the expected mean antibody titer in the group, which corresponds to 90% protection in the vaccinated birds, was 5.7 log<sub>2</sub>, or ≈ 1:52.

**Conclusion.** "ARRIAH-AviFluVac" vaccine demonstrates high immunogenicity against high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) which was relevant for Russia in 2023.

**Keywords:** high-pathogenicity avian influenza, inactivated vaccines, antigen dose in the vaccine, vaccine protective effect

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

**For citation:** Moroz N. V., Dolgov D. L., Frolov S. V., Grekhneva A. D., Kulakov V. Yu. Immunogenic activity of "ARRIAH-AviFluVac" vaccine against high-pathogenicity H5N1 avian influenza virus relevant for Russia in 2023. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (1): 47–54. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-47-54>

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

**For correspondence:** Natalia V. Moroz, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Avian Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, [moroz@arriah.ru](mailto:moroz@arriah.ru)

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время высокопатогенный грипп птиц (ВПГП) – это актуальная проблема для птицеводства всего мира. Вирус ВПГП (H5N1) является причиной разрушительных эпизоотий, приносящих значительный экономический урон. Например, в 2022 г. в результате распространения ВПГП (H5N1) во Франции к марту было уничтожено 11 млн птиц, в США к сентябрю 2022 г. потери превысили 20 млн гол. [1, 2]. Всего в 2022 г. 67 стран на пяти континентах сообщили о вспышках ВПГП (H5N1), что привело к потере более 131 млн гол. домашней птицы [3]. В период с апреля по июнь 2023 г. вспышки ВПГП (H5N1) были зарегистрированы в 25 странах Европы среди домашних и диких птиц, всего 98 и 634 эпизода соответственно [4].

В Российской Федерации, по данным Россельхознадзора, на 17.10.2023 вспышки ВПГП (H5N1) зарегистрированы: в 57 населенных пунктах – среди дикой птицы; в 6 – на птицефабриках; в 8 – среди домашней птицы в личных подсобных хозяйствах [5]. Отмечено, что в этом году болезнь поражала нетипичные виды диких птиц, а именно чаек. Например, очагом заболевания в Москве стали Борисовские пруды, где были найдены погибшие чайки, из останков которых был выделен геном вируса ВПГП подтипа H5N1 [6]. В центральных регионах России неблагополучные по гриппу птицефабрики во всех случаях находятся в непосредственной близости от населенных пунктов, где зафиксированы вспышки ВПГП (H5N1) среди диких птиц [5], что явно указывает на источник распространения вируса.

Широкое распространение гриппа в первую очередь связано с особенностями возбудителя. На этапе синтеза в инфицированной клетке вирусная РНК не имеет механизма репарации и сохраняет все возможные «ошибки» структуры, которые с вероятностью не менее чем 1/10<sup>6</sup> детерминируют изменения фенотипа

вируса [7]. В сравнении с ДНК-содержащими вирусами, у которых вероятность ошибки при репликации генома составляет не более 1/10<sup>9</sup>, это разница в три порядка. Каждый раунд репликации РНК-вируса приводит к образованию смешанной популяции со множеством вариантов, большинство из которых нежизнеспособны, но некоторые из них содержат мутации, которые могут стать доминирующими при соответствующих условиях отбора [8, 9]. На уровне фенотипа это могут быть изменения антигенных свойств и/или изменения тропизма возбудителя. В первом случае измененный агент может уклониться от иммунного ответа макроорганизма, во втором – может повысить вирулентность.

Подчеркнем, что геном вируса гриппа представлен независимыми фрагментами РНК (8 фрагментов). В случае инфицирования одной клетки различными вариантами вируса может произойти рекомбинация – обмен фрагментами генома, что приведет к качественным изменениям свойств возбудителя, вплоть до изменений видового спектра патогенности [1]. Например, в июне 2023 г. в Польше у 24 домашних кошек был выявлен вирус гриппа А (H5N1). У инфицированных животных наблюдались неврологические и респираторные признаки, в некоторых случаях наступала гибель. В июле 2023 г. в Великобритании было зарегистрировано два случая обнаружения у людей вируса гриппа А подтипа H5N1 и в двух случаях был выделен вирус гриппа А подтипа H9N2 [4].

Таким образом, представленный на рисунке 1 фрагмент схемы известных экологических ниш вируса гриппа [10] лишь частично отражает сферу обитания возбудителя в природе.

Наряду с ограничительными мерами надежным способом борьбы с ВПГП служит специфическая профилактика. Среди антигриппозных вакцин наиболее широкое распространение имеют инактивированные цельновирионные препараты [11, 12].

Протективный эффект таких вакцин зависит от двух связанных составляющих: концентрации антигена в составе препарата и структурного соответствия между антигенами вакцины и полевого агента [12, 13]. При этом из соображений эпизоотической безопасности для получения антигенов рекомендуется использовать вирус низкопатогенных вариантов [14]. Примером инактивированного препарата для специфической профилактики ВППП на основе низкопатогенного варианта вируса является вакцина «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак».

Целью настоящей работы была оценка эффективности инактивированной вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против высокопатогенного гриппа птиц H5N1, обусловившего локальные вспышки заболевания в ряде регионов России в 2023 г.

В рамках указанной цели были поставлены следующие задачи:

- определение филогенетической принадлежности изолята вируса ВППП, выделенного во время вспышки заболевания на территории РФ, который будет использован для испытания протективного эффекта вакцины;
- оценка 50%-й протективной дозы, содержащейся в прививном объеме вакцины;
- определение величины титра поствакцинальных антител, обеспечивающих защиту 90% вакцинированных птиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования:** вакцина против гриппа птиц (H5) инактивированная эмульсионная «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак». Концентрацию антигена (D), представленного производственным штаммом «Ямал» вируса низкопатогенного гриппа птиц H5, в прививном объеме вакцины регулировали путем разведения антигена физиологическим раствором в соотношениях 1/25, 1/50 и 1/100. При приготовлении вакцинных образцов активный компонент (антиген) объединяли с масляным адъювантом в соотношении 30:70 (по весу) и эмульгировали на высокоскоростном лабораторном смесителе «Сильверсон» (Великобритания) при скорости 6000 об/мин в течение 5 мин. Стабильность эмульсии после смешивания оценивали центрифугированием при 1000 г в течение 10 мин. Эмульсию считали стабильной, если отслоение легкой (масляной) фракции не превышало 5% по объему, а отслоения тяжелой (водной) фракции не происходило.

Таким образом, были приготовлены образцы вакцины, содержащие цельный антиген (D = 1), а также антиген в разведениях 1/25, 1/50 и 1/100 (D = 25, D = 50 и D = 100) от исходного.

**Птица.** В эксперименте использовали серонегативных к вирусу гриппа птиц цыплят яичного кросса Ломан Браун в возрасте 4 нед. Работу с птицей проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014, а также согласно требованиям Директивы 2010/63/EU (от 22.09.2010) по охране животных, используемых в научных целях.

**Иммунизация птиц.** Каждый образец вакцины был испытан на отдельной группе птиц численностью 10 гол. Препарат вводили внутримышечно в область груди в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Дополнительно была образована группа контроля активности вируса численностью 10 гол., в которой иммунизацию не проводили (интактные особи). Группы птиц содержали в изолированных боксах с автономной вентиляцией, подачей воды и корма.

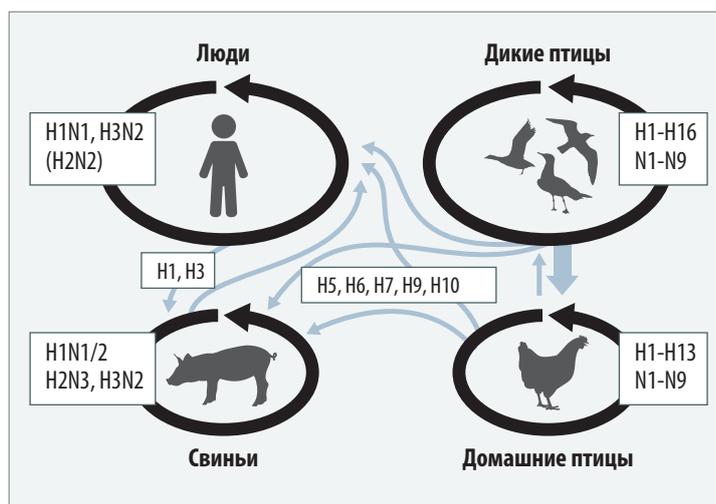


Рис. 1. Экология вируса гриппа А ([10] с изменениями). Обозначены варианты гемагглютинина (H) и нейраминидазы (N). Черными стрелками показана циркуляция возбудителя в пределах вида хозяина, серыми – направления межвидового распространения инфекции

Fig. 1. Ecology of influenza A virus ([10] with changes). Hemagglutinin (H) and neuraminidase (N) variants are indicated. Black arrows show the pathogen circulation in host species, gray arrows show the virus interspecies spread

**Эмбрионы кур.** В работе использовали развивающиеся 9–11-суточные эмбрионы кур категории СПФ (VALO BioMedia GmbH, Германия).

**Выделение вируса гриппа птиц.** Использовали пат-материал, полученный от павших от ВППП чаек. На фосфатном буфере (pH 7,2–7,4) готовили 10%-ю тканевую суспензию, которую центрифугировали в течение 15 мин при 1000 г. В супернатант добавляли антибиотики (100 Ед/мл бензилпенициллина натрияевую соль, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 50 Ед/мл нистатина). Полученный материал вводили в аллантоисную полость куриных эмбрионов в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Эмбрионы инкубировали при температуре 37 °С и относительной влажности 60–70%. Ежедневно проводили овоскопию. Эмбрионы, погибшие после 24 ч инкубации и более, использовали для сбора экстраэмбриональной жидкости. Специфичность гибели подтверждали наличием гемагглютинирующей активности в реакции гемагглютинации и идентификацией в реакции торможения гемагглютинации со специфической сывороткой [15].

**Определение титра вируса на эмбрионах кур.** Использовали метод предельных разведений. Готовили последовательные десятикратные разведения вирусного материала на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Каждое разведение тестировали на группе эмбрионов (n ≥ 5). Материал инокулировали в аллантоисную полость в объеме 0,2 см<sup>3</sup>. Положительной реакцией (присутствие вируса) считали гибель эмбриона, установленную после более чем 24 ч инкубации. Расчет величины титра производили по Керберу и выражали в ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Суммарную РНК выделяли, используя набор RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды, кат. № 74106) в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР проводили в одну стадию с применением набора OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Нидерланды, кат. № 210212) с соответствующими

системами праймеров для выявления генома вируса гриппа птиц и идентификации подтипа H5N1.

**Секвенирование генома вируса.** Нуклеотидные последовательности фрагментов генов определяли с применением автоматического секвенатора ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Анализ и сравнение нуклеотидных и соответствующих им аминокислотных последовательностей проводили, используя пакет прикладных программ BioEdit, версия 7.0.5.3. Также для сравнительного анализа использовали ранее опубликованные в международной базе GenBank последовательности изолятов и штаммов вируса гриппа птиц A/H5 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database>). Построение и редактирование филогенетического дерева осуществляли с помощью алгоритма NJ в реализации пакета MEGA, версия 7.

**Реакция гемагглютинации (РГА).** Пробы антигенсодержащих материалов исследовали в РГА в соответствии с методикой, изложенной в инструкции по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации. Определяли титр гемагглютинирующих единиц.

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** Пробы сывороток крови птиц исследовали в РТГА в соответствии с инструкцией к набору для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия) [16]. Определяли величину титра антител. Положительной считали реакцию, где показатель титра имел оценку 1:16 и более, то есть  $4 \log_2$ .

**Заражение птиц.** В группах иммунизированных и интактных птиц проводили контрольное заражение через 28 сут после вакцинации. Для этого использовали вирус ВППГ штамма A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 в дозе  $6,0 \text{ Ig ЭИД}_{50}$ . Вирусный материал вводили внутримышечно в область бедра в объеме  $0,5 \text{ см}^3$ . Наблюдение за клиническим состоянием зараженной птицы вели в течение 10 сут.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выделение вируса, оценка вирулентности и определение филогенетической принадлежности штамма.** Установили, что исследуемый биологический материал содержал инфекционный вирус, который был летальным для эмбрионов (специфический падеж составил 23/30). При исследовании проб экстраэмбриональной жидкости в РГА получен положительный результат (от 1:64 до 1:256), по результатам ОТ-ПЦР в них установлено содержание генома вируса гриппа птиц в высокой концентрации (средняя оценка  $St = 18$ ). Сайт расщепления гемагглютинаина выделенного вируса гриппа имел структуру -REKRRKR-, что позволило охарактеризовать его как потенциально высоковирулентный.

Внутривенная инъекция вирусосодержащей экстраэмбриональной жидкости (10-кратное разведение на фосфатном буфере), произведенная в объеме

$0,1 \text{ см}^3$  10 цыплятам в возрасте 5 нед. (серонегативным к вирусу гриппа птиц), в течение последующих 10 сут привела к гибели 9 цыплят (90%), у которых наблюдали характерные для ВППГ клинические признаки (диарея, выделения из носа, цианоз неоперенных участков кожи). Специфичность падежа подтверждена в ОТ-ПЦР, с помощью которой в биологическом материале установлено присутствие генома вируса ВППГ. Полученные результаты соответствовали клиническим критериям проявления ВППГ [14].

При проведении сравнительного генетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена гемагглютинаина определили, что вирус принадлежит к азиатской генетической линии вируса ВППГ подтипа H5 (клада 2.3.4.4.b), получившего эпизоотическое распространение в предыдущие годы в странах Азии, Европы, Африки, Северной и Южной Америки. Выделенный вирус был определен как штамм вируса гриппа птиц A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1. Положение штамма в структуре филогенетического дерева показано на рисунке 2.

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

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

**Оценка иммуногенной активности вакцин.** Все образцы вакцин, содержащие определенные концентрации антигена, были испытаны на птицах параллельно. Через 28 сут после вакцинации определяли средние по группам логарифмические титры антител к вирусу гриппа птиц, установленные в РТГА ( $\log_2 T$ ).

Далее во всех подопытных группах птиц провели заражение штаммом A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1. В течение 10 сут в каждой группе ежедневно оценивали текущие клинические показатели ( $c = a + b$ , где  $a$  и  $b$  – количество клинически больных и погибших птиц соответственно). По окончании срока наблюдений в группах определяли накопленные клинические показатели ( $\sum c/n$ , где  $n$  – число птиц в группе до заражения) и вычисляли протективную активность вакцины вида  $P = (1 - \sum c/n) \times 100$ .

Показатели иммуногенной активности вакцин, установленные в подопытных группах птиц, приведены в таблице.

Исследовали связь между концентрацией антигена в прививном объеме ( $D$ ) и протективной активностью ( $P$ ) вакцины. Для построения наиболее вероятной модели связи показателей концентрации антигена и протективной активности вакцины применили регрессионный анализ [17]. Получили линейное регрессионное уравнение, имеющее вид  $P = (-0,5184) D + 100,31$  ( $R^2 = 0,98$ ), где  $P$  – прогнозируемое значение индекса соответственно заданному  $D$ .

Для графического представления регрессии  $P$  и  $D$  использовали корреляционно-регрессионный анализ. Полученные результаты представлены на рисунке 3.

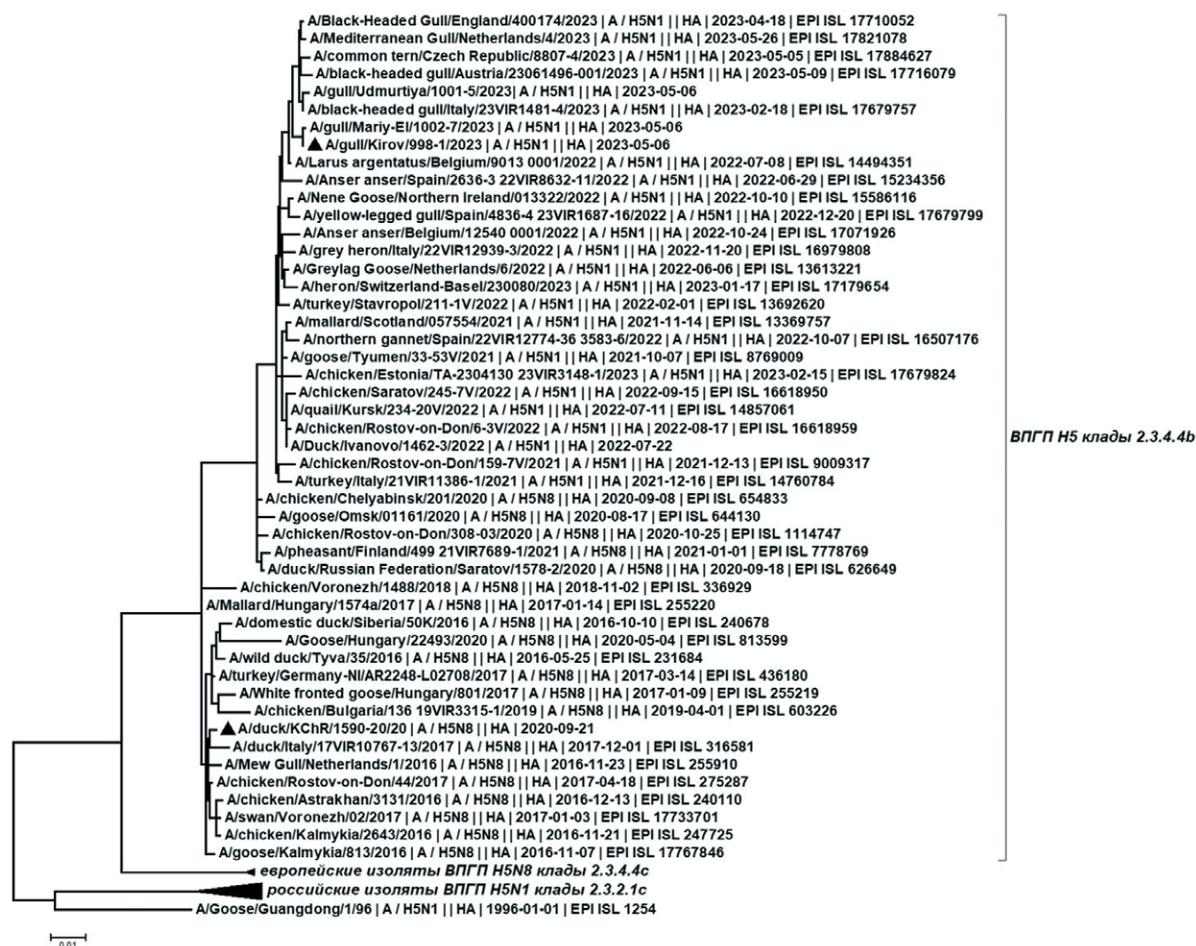


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по полноразмерной последовательности гена гемагглютинаина  
 Fig. 2. A phylogenetic tree based on the full-length hemagglutinin gene sequences

С помощью регрессионного уравнения рассчитали, что концентрация антигена, обеспечивающая защиту 50% (ПД<sub>50</sub>) вакцинированных птиц, равна 97, что соответствует степени разведения исходного антигена 1:97. Таким образом, протективная активность вакцины равняется 97 ПД<sub>50</sub>, что согласуется с требованиями Всемирной организации здравоохранения животных, устанавливающими ПД<sub>50</sub> ≥ 50.

**Исследование связи протективной активности вакцины и титров гуморальных антител.** Провели анализ зависимости между титрами гуморальных антител (T, log<sub>2</sub>) и протективной активностью вакцины (P, %), установленными для испытанных концентраций антигена. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Показана линия регрессии P по log<sub>2</sub> T, где 'P – индекс, прогнозируемый по уравнению P = (11,093) log<sub>2</sub> T + 26,667, имеющему оценку адекватности R<sup>2</sup> = 0,97.

Полученное уравнение позволило определить ожидаемый титр антител (T<sub>90</sub>), который соответствует 90% защиты вакцинированных птиц. Искомая оценка составила величину log<sub>2</sub> T<sub>90</sub> = 5,7.

Известно, что вспышки ВППГ на птицеводческих предприятиях (например, в США) в большинстве случаев географически совпадают с путями миграции диких водоплавающих птиц [1]. Учитывая роль орнитофауны в распространении инфекции в ряде регионов РФ, штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 следует считать эпизоотически опасным. На этом основании

**Таблица**

**Показатели иммуногенности вакцин против вируса гриппа птиц H5N1**

**Table**  
**Indicators of vaccine immunogenicity against H5N1 avian influenza virus**

Оценки показателей соответственно испытанным концентрациям антигена			
Разведение антигена, D*	титр в РТГА	Клинический показатель Σc/n***	Протективная активность (P), % P = (1 - Σc/n) × 100
	log <sub>2</sub> T**		
1	6,67	0/10	100
1:25	5,33	1/10	90
1:50	4,33	4/10	70
1:100	2,00	6/10	50
контроль	0,47	10/10	0

\* величина разведения антигена в прививном объеме (antigen concentration in the inoculation volume);

\*\* средний логарифмический титр антител в группе птиц после вакцинации (mean log antibody titer in the group of the vaccinated chickens), n = 3;

\*\*\* Σc – количество клинически больных и погибших птиц после контрольного заражения [накопленный в течение опыта показатель] (number of clinically diseased and dead birds after the challenge [indicator assessed during the experiment]);  
 n – число птиц в группе до заражения (number of chickens in the group before the challenge).

использование данного штамма в качестве вируса-пробойника для оценки протективного действия вакцин против ВПГП является обоснованным.

Концентрация антигена в прививном объеме инактивированной вакцины является важнейшей характеристикой препарата. Основной антиген вируса (гемагглютинин) может быть измерен в абсолютных единицах, например в весовых [11], или в единицах действия, например в ПД<sub>50</sub>. Считается, что прививной объем эффективной вакцины против гриппа птиц должен содержать 50 ПД<sub>50</sub> [12, 14], что соответствует 0,3–7,8 [12] или 3 мкг гемагглютинина [14].

Процедура проведения острого опыта полностью соответствовала общепринятой методике [14]. Как следует из полученных результатов, прививной объем препарата «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» содержал 97 ПД<sub>50</sub>, это обеспечило защиту 100% иммунизированных птиц при введении одного прививного объема, что доказывает возможность практического применения вакцины

в соответствии с прилагаемой инструкцией. Это означает, что антигенный потенциал «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» против штамма A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 в 1,9 раза превосходит рекомендуемую протективную активность [14].

Ранее уже была проведена оценка протективных свойств вакцинного препарата из штамма «Ямал» [18], в результате которой показана эффективная защита против гетерологичного подтипа вируса ВПГП H5N8 на примере штамма A/duck/KChR/1590-20/2, который также принадлежит к генетической кладе 2.3.4.4b. Результаты филогенетического анализа, приведенные в данной работе, свидетельствуют об активном антигенном дрейфе вирусов гриппа птиц подтипа H5 на территории Евразии в 2016–2023 гг. (рис. 1). Изоляты вируса гриппа птиц, против которых была экспериментально показана эффективная защита вакцинным препаратом на основе штамма «Ямал», отмечены на рисунке 2 черным треугольником.

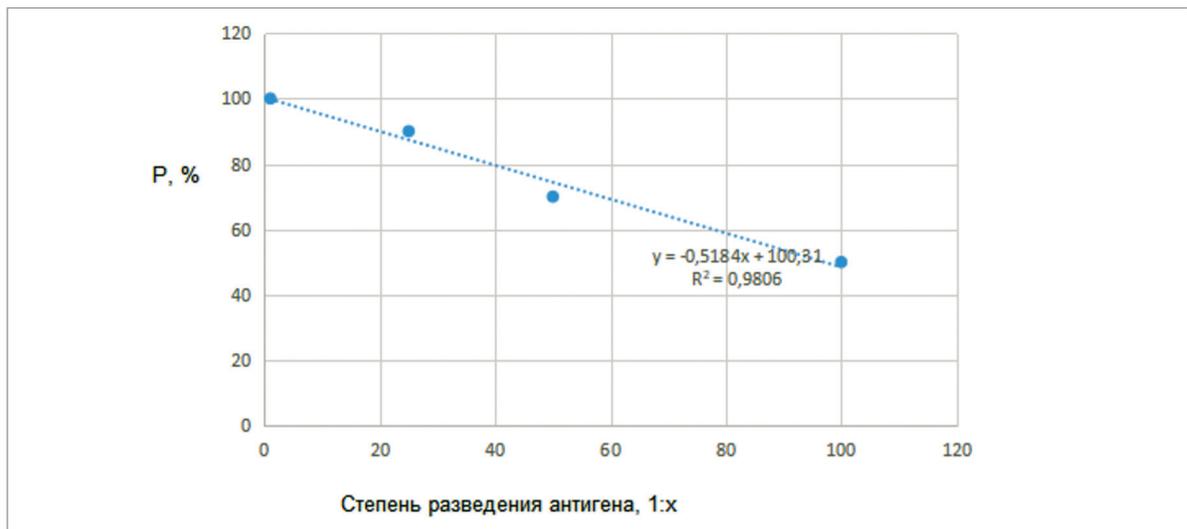


Рис. 3. Зависимость между испытанными концентрациями антигена и протективной активностью вакцины против ВПГП H5N1

Fig. 3. Relationship between the tested antigen concentrations and protectivity of the vaccine against HPAI H5N1

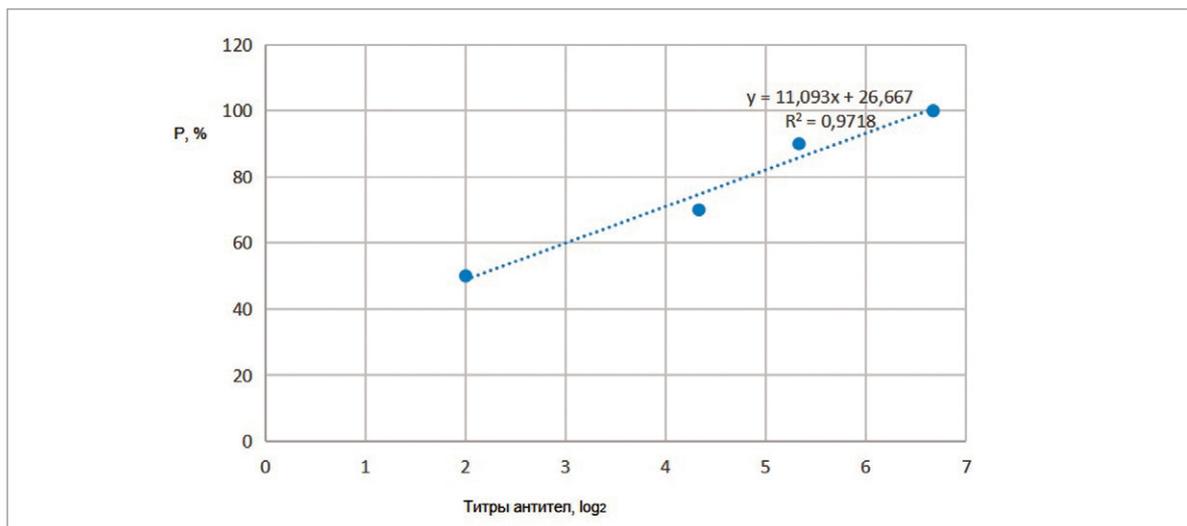


Рис. 4. Зависимость между величиной титра антител к вирусу гриппа H5 и уровнем протективной защиты вакцины

Fig. 4. Relationship between H5 virus antibody titer and level of the vaccine protectivity

Поскольку защита птиц от генерализованной инфекции, вызванной вирусом гриппа, в основном обеспечивается выработкой антител против вирусного гемагглютинаина [19], то данные РТГА являются важными показателями напряженности поствакцинального гуморального иммунитета. Известно, что титр иммунных сывороток на уровне  $4 \log_2$  в РТГА свидетельствует о защите птиц от заболеваемости и смертности [14, 19], а титр антител на уровне  $6,5 \log_2$  предотвращает в том числе локальную репродукцию вируса [20]. При этом необходимо, чтобы антитела в титре более  $4 \log_2$  присутствовали у 80% поголовья птиц [21]. При выполнении настоящих исследований защита 90% вакцинированных птиц соответствовала ожидаемым титрам  $5,7 \log_2$  для вакцины «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак».

## ВЫВОДЫ

Результаты проведенных исследований позволили сделать следующие выводы.

1. Выделенный из патологического материала вирус определен как штамм A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1, который принадлежит к азиатской генетической линии вируса ВПП подтипа H5 (клада 2.3.4.4b). Штамм охарактеризован как эпизоотически опасный для Российской Федерации.

2. Установлено, что инактивированная вакцина «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» обладает протективным эффектом против штамма ВПП A/gull/Kirov/998-1/2023 H5N1 и на 28-е сут после иммунизации полностью предотвращает клиническое проявление болезни при заражении вакцинированных птиц. Протективный потенциал вакцины составил  $97 \text{ ПД}_{50}$  в одном прививном объеме.

3. Показано, что вакцина «ВНИИЗЖ-АвиФлуВак» на 28-е сут после применения индуцирует у птиц напряженный гуморальный иммунитет против гриппа. Поствакцинальный титр антител к вирусу гриппа в РТГА, соответствующий защите 90% привитых птиц, составил прогнозируемую величину  $5,7 \log_2$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маилян Э. С. Грипп птиц. Новый взгляд на прошлое, настоящее и будущее птицеводства. *НПК Фарминдустрия*. <https://pharmindustria.com/projects/poleznye-stati-po-veterinarij/gripp-ptits-novyy-vzglyad-na-proshloe-nastoyashchee-ptizevodstva>
2. U. S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Current Situation: Bird Flu in Poultry. [https://www.cdc.gov/bird-flu/situation-summary/current-bird-flu-situation-in-poultry.html?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/flu/avianflu/poultry.htm](https://www.cdc.gov/bird-flu/situation-summary/current-bird-flu-situation-in-poultry.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/flu/avianflu/poultry.htm)
3. FAO. Ongoing avian influenza outbreaks in animals pose risk to humans: Situation analysis and advice to countries from FAO, WHO, WOA. 12.07.2023. <https://www.fao.org/animal-health/news-events/news/detail/ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans/en>
4. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoeh C., Fusaro A., Gonzales J. L., et al. Avian influenza overview April – June 2023. *EFSA Journal*. 2023; 21 (7):e08191. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8191>
5. Вспышки гриппа птиц на территории РФ в 2023 г. (по данным ВОЗЖ на 17.10.2023). <https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2023/10/%D0%92%D0%9F%D0%93%D0%9F-%D0%BD%D0%B0-17.10.2023-scaled.jpg> (дата обращения: 03.07.2024).
6. Комментарий Управления Россельхознадзора по городу Москва, Московской и Тульской областям по выявлению случаев высокопатогенного гриппа птиц на территории города Москвы. 18.05.2023. <https://777.fsvps.gov.ru/news/kommentarij-upravlenija-ros-selhozнадзора-po-g-moskva-moskovskoj-i-tulskoj-oblastjam-po-vyjavleniju-slucaev-vysokopatogennogo-grippa-ptic-na-territorii-g-moskvy/?ysclid=m3y8yxbxy957274774>

7. Suárez P, Valcárcel J, Ortín J. Heterogeneity of the mutation rates of influenza A viruses: isolation of mutator mutants. *Journal of Virology*. 1992; 66 (4): 2491–2494. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.4.2491-2494.1992>
8. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 1982; 215 (4540): 1577–1585. <https://doi.org/10.1126/science.7041255>
9. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 1992; 56 (1): 152–179. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>
10. Long J. S., Mistry B., Haslam S. M., Barclay W. S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17 (2): 67–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z>
11. Peyre M., Fusheng G., Desvaux S., Roger F. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiology and Infection*. 2009; 137 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1017/s0950268808001039>
12. Swayne D. E. Laboratory methods for assessing and licensing influenza vaccines for poultry. In: *Animal Influenza Virus. Methods and Protocols*. Ed. by E. Spackman. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Humana Press; 2020; Chapter 16: 211–225. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_16)
13. Lee Y. J., Sung H. W., Choi J. G., Lee E. K., Jeong O. M., Kwon Y. K, et al. Effects of homologous and heterologous neuraminidase vaccines in chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *Avian Diseases*. 2007; 51 (Suppl. 1): 476–478. <https://doi.org/10.1637/7548-033106R.1>
14. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2021; Chapter 3.3.4. [https://www.woah.org/fileadmin/Health\\_standards/tahm/3.03.04\\_AI.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf)
15. Чвала И. А., Манин Т. Б., Мудрак Н. С., Дрыгин В. В. Методические рекомендации по выделению вируса гриппа птиц на куриных эмбрионах: утв. ФГУ «ВНИИЗЖ» № 59-08. Владимир; 2008. 9 с.
16. Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 в реакции торможения гемагглютинации. <https://shop.arriah.ru/upload/iblock/ad5/rwd6v5w4evkwfvcv11ba1kck0z-b13zkr.pdf>
17. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина; 1975. 297 с.
18. Фролов С. В., Чвала И. А., Мороз Н. В., Кулаков В. Ю., Сосипатова В. Ю., Андрейчук Д. Б. Иммунобиологические свойства инактивированных вакцин против высокопатогенного гриппа птиц, изготовленных на основе антигенов штаммов вируса гриппа подтипа A/H5N1 различной вирулентности. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (4): 367–374. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-367-374>
19. Katz J. M., Lu X., Frace A. M., Morken T., Zaki S. R., Tumpey T. M. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2000; 54 (4): 178–187. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(00\)89024-1](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(00)89024-1)
20. Kumar M., Chu H.-J., Rodenberg J., Krauss S., Webster R. G. Association of serologic and protective responses of avian influenza vaccines in chickens. *Avian Diseases*. 2007; 51 (Suppl. 1): 481–483. <https://doi.org/10.1637/7605-041706R.1>
21. Джавадов Э. Д., Дмитриева М. Е. Грипп птиц. СПб.; Ломоносов: ГНУ ВНИИВР Россельхозакадемии; 2011. 188 с. <https://elibrary.ru/csythi>

## REFERENCES

1. Mailyan E. S. Gripp ptits. Novyi vzglyad na proshloe, nastoyashchee i budushchee ptitsevodstva = Avian Influenza. A new look at the past, present and future of poultry farming. *НПК Фарминдустрия*. <https://pharmindustria.com/projects/poleznye-stati-po-veterinarij/gripp-ptits-novyy-vzglyad-na-proshloe-nastoyashchee-ptizevodstva> (in Russ.)
2. U. S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Current Situation: Bird Flu in Poultry. [https://www.cdc.gov/bird-flu/situation-summary/current-bird-flu-situation-in-poultry.html?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/flu/avianflu/poultry.htm](https://www.cdc.gov/bird-flu/situation-summary/current-bird-flu-situation-in-poultry.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/flu/avianflu/poultry.htm)
3. FAO. Ongoing avian influenza outbreaks in animals pose risk to humans: Situation analysis and advice to countries from FAO, WHO, WOA. 12.07.2023. <https://www.fao.org/animal-health/news-events/news/detail/ongoing-avian-influenza-outbreaks-in-animals-pose-risk-to-humans/en>
4. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, European Union Reference Laboratory for Avian Influenza, Adlhoeh C., Fusaro A., Gonzales J. L., et al. Avian influenza overview April – June 2023. *EFSA Journal*. 2023; 21 (7):e08191. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8191>
5. Avian influenza outbreaks in the Russian Federation in 2023 (according to the WHO data as of 17.10.2023). <https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2023/10/%D0%92%D0%9F%D0%93%D0%9F-%D0%BD%D0%B0-17.10.2023-scaled.jpg> (date of access: 03.07.2024). (in Russ.)
6. Comment from the Rosselkhoz nadzor Administration for the city of Moscow, Moscow and Tula Oblasts on identification of HPAI cases in the

city of Moscow. 18.05.2023. <https://777.fsvps.gov.ru/news/kommentarij-upravlenija-rosselhoznadzora-po-g-moskva-moskovskoj-i-tulskoj-oblast-jam-po-vyjavleniju-slucaev-vysokopatogennogo-grippa-ptic-na-territorii-g-moskvy/?ysclid=m3y8yxby957274774> (in Russ.)

7. Suárez P, Valcárcel J, Ortín J. Heterogeneity of the mutation rates of influenza A viruses: isolation of mutator mutants. *Journal of Virology*. 1992; 66 (4): 2491–2494. <https://doi.org/10.1128/jvi.66.4.2491-2494.1992>

8. Holland J, Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 1982; 215 (4540): 1577–1585. <https://doi.org/10.1126/science.7041255>

9. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 1992; 56 (1): 152–179. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>

10. Long J. S., Mistry B., Haslam S. M., Barclay W. S. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17 (2): 67–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z>

11. Peyre M., Fusheng G., Desvaux S., Roger F. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. *Epidemiology and Infection*. 2009; 137 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1017/s0950268808001039>

12. Swayne D. E. Laboratory methods for assessing and licensing influenza vaccines for poultry. In: *Animal Influenza Virus. Methods and Protocols*. Ed. by E. Spackman. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Humana Press; 2020; Chapter 16: 211–225. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_16)

13. Lee Y. J., Sung H. W., Choi J. G., Lee E. K., Jeong O. M., Kwon Y. K, et al. Effects of homologous and heterologous neuraminidase vaccines in chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza. *Avian Diseases*. 2007; 51 (Suppl. 1): 476–478. <https://doi.org/10.1637/7548-033106R.1>

14. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for*

*Terrestrial Animals*. 2021; Chapter 3.3.4. [https://www.woah.org/fileadmin/](https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf)

15. Chvala I. A., Manin T. B., Mudrak N. S., Drygin V. V. Guidelines for isolation of avian influenza virus in chicken embryos: approved by the Federal Centre for Animal Health No. 59-08. Vladimir; 2008. 9 p. (in Russ.)

16. Instructions for the use of a HI kit for detection of antibodies to avian influenza virus subtype H5. <https://shop.arriah.ru/upload/iblock/ad5/rwd6v5w4evkwfvcv11ba1kck0zb13zkkp.pdf> (in Russ.)

17. Urbakh V. Yu. Statistical analysis in biological and medical research. Moscow: Medicina; 1975. 297 p. (in Russ.)

18. Frolov S. V., Chvala I. A., Moroz N. V., Kulakov V. Yu., Sosipatorova V. Yu., Andreychuk D. B. Immunobiological properties of inactivated anti-highly pathogenic avian influenza vaccines based on antigens of A/H5N1 avian influenza virus strains of different virulence. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (4): 367–374. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-367-374>

19. Katz J. M., Lu X., Frace A. M., Morken T., Zaki S. R., Tumpey T. M. Pathogenesis of and immunity to avian influenza A H5 viruses. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2000; 54 (4): 178–187. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(00\)89024-1](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(00)89024-1)

20. Kumar M., Chu H.-J., Rodenberg J., Krauss S., Webster R. G. Association of serologic and protective responses of avian influenza vaccines in chickens. *Avian Diseases*. 2007; 51 (Suppl. 1): 481–483. <https://doi.org/10.1637/7605-041706R1.1>

21. Javadov E. J., Dmitrieva M. E. Avian influenza. Saint Petersburg; Lomonosov: All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science; 2011. 188 p. <https://elibrary.ru/ccythi> (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 23.10.2024

Поступила после рецензирования / Revised 09.12.2024

Принята к публикации / Accepted 18.12.2024

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Мороз Наталья Владимировна**, канд. вет. наук, заведующий лабораторией профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-9672-8594>, [moroz@arriah.ru](mailto:moroz@arriah.ru)

**Долгов Дмитрий Львович**, канд. вет. наук, заведующий сектором лаборатории профилактики болезней птиц, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0009-5177-953X>, [dolgov@arriah.ru](mailto:dolgov@arriah.ru)

**Фролов Сергей Владимирович**, канд. вет. наук, начальник отдела профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, [frolov@arriah.ru](mailto:frolov@arriah.ru)

**Грехнева Алена Дмитриевна**, аспирант, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>, [grekhneva@arriah.ru](mailto:grekhneva@arriah.ru)

**Кулаков Владимир Юрьевич**, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1898-4576>, [kulakov@arriah.ru](mailto:kulakov@arriah.ru)

**Natalia V. Moroz**, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for Avian Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-9672-8594>, [moroz@arriah.ru](mailto:moroz@arriah.ru)

**Dmitry L. Dolgov**, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Sector, Laboratory for Avian Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0009-5177-953X>, [dolgov@arriah.ru](mailto:dolgov@arriah.ru)

**Sergey V. Frolov**, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Department for Avian Disease Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6802-9940>, [frolov@arriah.ru](mailto:frolov@arriah.ru)

**Alena D. Grekhneva**, Postgraduate Student, Leading Specialist, Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>, [grekhneva@arriah.ru](mailto:grekhneva@arriah.ru)

**Vladimir Yu. Kulakov**, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for Avian Diseases Prevention, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1898-4576>, [kulakov@arriah.ru](mailto:kulakov@arriah.ru)

**Вклад авторов:** Мороз Н. В. – инициатор и руководитель исследований; Долгов Д. Л. – технический исполнитель иммунологических исследований; Фролов С. В. – технический исполнитель иммунологических исследований, оформление статьи; Грехнева А. Д. – технический исполнитель генетических исследований, оформление статьи; Кулаков В. Ю. – анализ результатов исследований.

**Contribution of the authors:** Moroz N. V. – initiator and head of the research; Dolgov D. L. – technical expert in immunological tests; Frolov S. V. – technical expert in immunological tests and the article design; Grekhneva A. D. – technical expert in genetic tests, the article design; Kulakov V. Yu. – analysis of test results.