



УДК 636.5:661.158:616.9

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СЕРИЙНЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВАКЦИН В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПОВ H5N1 И H5N8, ИЗОЛИРОВАННЫХ В 2015–2016 ГГ.

Ирза В. Н., главный эксперт, д-р вет. наук

Волков М. С., заведующий лабораторией эпизоотологии и мониторинга, канд. вет. наук

Варкентин А. В., научный сотрудник лаборатории эпизоотологии и мониторинга, канд. вет. наук

Фролов С. В., научный сотрудник лаборатории профилактики болезней птиц, канд. вет. наук

Алтунин Д. А., ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Аннотация: В статье представлены результаты изучения протективных свойств двух серийно выпускаемых и трех экспериментальных образцов инактивированных эмульсионных вакцин при заражении цыплят высоковирулентными вирусами H5N1 и H5N8, выделенными на территории Российской Федерации в 2015–2016 гг. Показано, что вакцины на основе эпизоотического штамма вируса H5N1, выпускаемые российскими биопредприятиями, обладают протективным потенциалом и могут использоваться для специфической профилактики болезни, вызываемой актуальными вирусами гриппа птиц. Серологические исследования поствакцинального иммунитета с использованием разных диагностических антигенов подтверждают антигенную вариабельность вируса гриппа птиц подтипа H5.

Abstract: The paper presents data on the study of protective properties of commercial and experimental oil-based inactivated vaccines against highly pathogenic avian influenza (HPAI) caused by recent H5N1 and H5N8 virus strains isolated in RF in years 2015–2016. It has been shown that currently produced commercial vaccines are protective against actual HPAI virus strains and can be used for specific prophylaxis of the disease. Serological assays to assess postvaccinal immunity in HI test with different diagnostic antigens confirmed antigenic variability of H5 subtype viruses.

Ключевые слова: антиген, высокопатогенный грипп птиц, вакцина, протективные свойства.

Key Words: antigen, highly pathogenic avian influenza, vaccine, protective properties.

Введение

Для иммунизации поголовья домашних птиц выгульного содержания в зонах риска применяются отечественные инактивированные эмульсионные вакцины на основе эпизоотического штамма вируса гриппа птиц H5N1, занесенного на территорию Российской Федерации в июле 2005 г. и относящегося к евроазиатской генетической линии (кладе) 2.2. В последующие годы эволюция возбудителя привела к появлению новых генетических линий и изменению его антигенных свойств [2, 4, 5].

Последние случаи высокопатогенного гриппа птиц (ВГП) H5N1 (клада 2.3.2.1.с) были зарегистрированы в 2015 г. только у диких птиц в четырех субъектах РФ [1]. Первое и единственное обнаружение вируса ВГП H5N8 (клада 2.3.4.4, группа А) у свиньи, отстреленной в Якутии в сентябре 2014 г., не сопровождалось в России последующими случаями болезни ни у домашних, ни у диких птиц, в отличие

от многих стран, пострадавших от данного вируса в 2014–2015 гг. [1, 6, 9]. В июне 2016 г. в окрестностях озера Убсу Нур (Респ. Тува) в пробах от диких водоплавающих птиц разных видов был выявлен новый реассортантный вирус H5N8 (клада 2.3.4.4, группа В) [4]. Это был первый случай обнаружения вируса H5N8 в данном районе пробоотбора, указывающий на возможную угрозу широкого распространения возбудителя. Поздней осенью 2016 г. эпизоотия охватила почти все европейские страны, а в ноябре — декабре вирус H5N8 вызвал несколько вспышек болезни у домашних и диких птиц на Юге России и в Северном Прикаспии [1, 9].

В I квартале 2017 г. были зарегистрированы новые случаи массовой гибели домашних и диких птиц в нескольких регионах страны, включая Московскую область.

В связи с серьезным обострением ситуации по ВГП H5N8 в ФГБУ «ВНИИЗЖ» были проведены испытания

протективных свойств коммерческих и экспериментальных вакцин в отношении недавно изолированных вирусов ВГП H5N8 и H5N1.

Материалы и методы исследования

В исследовании испытывали:

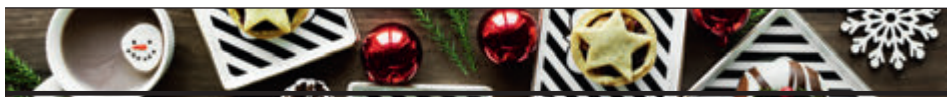
1) серийно выпускаемые инактивированные эмульсионные вакцины:

- «РОКРОВ ВЮ Грипп птиц», Покровский завод биопрепаратов, серия 12, дата изготовления — октябрь 2016 г.,
- «ФЛУ Протект H5», Ставропольская биофабрика, серия 13, дата выпуска — январь 2017 г.

Обе вакцины изготовлены на основе эпизоотического штамма вируса H5N1, полученного в 2005 г.;

2) экспериментальные инактивированные эмульсионные вакцины ФГБУ «ВНИИЗЖ» на основе адьювантов компании *Seppic* (Франция):

- «H5N1–760», из эпизоотического штамма A/chicken/Primorsky/85/08 H5N1 и адьюванта Мон-



tanide ISA 760, изготовлена в августе 2016 г.

- «H5N3», на основе штамма вируса низкопатогенного гриппа птиц A/Anas platyrhynchos/Chanu Lake/09/03/H5N3 и адьюванта Montanide ISA 70 VG, изготовлена в ноябре 2015 г.
- «H5N8», на основе эпизоотического штамма A/goose/Kalmykia/813/2016 H5N8 («Калмыкия») и адьюванта Montanide ISA 70VG, изготовлена в марте 2017 г.

Естественно восприимчивые животные: месячные цыплята кросса «Хайсекс коричневый» (130 гол.), серонегативные к вирусу гриппа птиц;

- 3) вирусы ВПГ для заражения:
 - A/goose/Kalmykia/813/2016 H5N8 («Калмыкия»);
 - A/pelican/Astrakhan/272/2015 H5N1 («Астрахань»).

Заражающая доза для обоих вирусов составляла 10^6 ЭИД₅₀/0,5 см³.

Серологические исследования проводили с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) по общепринятой методике с использованием диагностического набора производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» для выявления антител к вирусу гриппа птиц подтипа H5 (антиген вируса H5N1, штамм «Но-

Таблица 1

Схема иммунизации птицы		
№ группы	Кол-во птиц в группе	Название вакцины
1	25	«РОКРОВ ВЮ Грипп птиц»
2	25	«ФЛУ Протект H5»
3	10	H5N1-760 эксп.
4	10	H5N3 эксп.
5	30	H5N8 эксп.
6	20	Не вакцинированы
7	10	Интakтный контроль

востибирский») и полученных при изготовлении образцов вакцин антигенов вируса H5N1 («Приморский») и H5N8 («Калмыкия»). Иммунитет считали напряженным, если антитела к вирусу гриппа птиц выявляли в титрах $\geq 1 : 16$ ($4,0 \log_2$), не менее чем в 80% проб [3].

Также сыворотки крови птиц исследовали методом ИФА с применением диагностического набора «Синбиотикс» (США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для эксперимента сформировали семь групп цыплят, пять из которых иммунизировали однократно, внутримышечно, в область груди в дозе 0,5 см³ по схеме, указанной в таблице 1. Птиц содержали в виварии ФГБУ «ВНИИЗЖ», условия содержания и кормления соответствовали зоотехническим нормативам. Заражение высоковирулентными вирусами гриппа птиц осуществляли

внутримышечным способом через 21 сут. после вакцинации в изолирующих боксах, в помещениях, соответствующих уровню биобезопасности BSL-3. Через 14 и 21 сут. после вакцинации были отобраны образцы сыворотки крови с целью выявления антител к вирусу гриппа птиц в РТГА и ИФА.

Результаты исследования и их обсуждение

На протяжении 21 сут. наблюдения после вакцинации цыплята во всех группах оставались клинически здоровыми. Перед заражением цыплят в группах 1, 2, 5 и 6 разделили на две подгруппы с целью инфицирования разными вирусами гриппа птиц: H5N8 («Калмыкия») и H5N1 («Астрахань»).

Результаты наблюдений в течение 10 сут. после контрольного заражения представлены в таблице 2.

Таблица 2
Учет клинического состояния цыплят после заражениям вирусами ВПГ H5N1 («Астрахань») и H5N8 («Калмыкия»)

Вакцина	Кол. гол.	Вирус заражения	Период после заражения, сут.									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
«РОКРОВ ВЮ Грипп птиц» H5N1	12	«Астрахань» H5N1	12-3	12-3	12-3	11-3 1-Б	10-3 2-Б	10-3 2-Б	10-3 1-Б	10-3 1-Б	10-3 1-Б	10-3 1-Б
	13	«Калмыкия» H5N8	13-3	13-3	12-3 1-Б	11-3 2-Б	10-3 3-Б	9-3 4-Б	9-3 1-П 3-Б	8-3 1-П 3-Б	8-3 3-Б	8-3 3-Б
«ФЛУ Протект H5» H5N1	12	«Астрахань» H5N1	12-3	12-3	12-3	12-3	12-3	12-3	12-3	12-3	12-3	12-3
	13	«Калмыкия» H5N8	13-3	13-3	13-3	13-3	13-3	13-3	13-3	13-3	13-3	13-3
H5N1-760 эксп.	10	«Калмыкия» H5N8	10-3	10-3	10-3	9-3 1-Б	8-3 2-Б	8-3 2-Б	8-3 1-Б 1-П	8-3 1-Б	8-3 1-Б	8-3 1-Б
H5N3 эксп.	10	«Калмыкия» H5N8	10-3	10-3	10-3	9-3 1-Б	8-3 2-Б	8-3 2-Б	8-3 1-Б 1-П	8-3 1-Б	8-3 1-Б	8-3 1-Б
H5N8 эксп.	15	«Астрахань» H5N1	15-3	15-3	14-3 1-Б	12-3 3-Б	10-3 5-Б	5-П 5-3 5-Б	5-3 3-Б 2-Тб	5-3 3-Б 1-Тб 1-П	5-3 2-Б 1-П	5-3 2-Б
	15	«Калмыкия» H5N8	15-3	15-3	14-3 1-Б	12-3 3-Б	1-П 3-Б 11-3	2-П 1-Тб 11-3	1-Б 1-Тб 10-3	1-П 1-Б 10-3	1-Б 1-Б 10-3	1-Б 1-Б
Контроль	10	«Астрахань» H5N1	10-3	10-Б	10-Б	6-П 4-Тб	4-П	-	-	-	-	-
	10	«Калмыкия» H5N8	10-3	10-Б	10-П	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. З — здоровые; Б — больные; Тб — тяжело больные; П — павшие.



Таблица 3

Протективный потенциал вакцин по результатам заражения птиц вирусами ВГП H5N8 и H5N1

Вакцина	Протективный уровень, %				Контроль	
	От гибели	H5N8 От клинического проявления	От гибели	H5N1 От клинического проявления	H5N8	H5N1
«ФЛУ Протект H5»	100	100	100	100		
«ПОКРОВ ВЮ Грипп птиц»	84,6	61,5	91,7	83,3		
H5N1-760	90	80	Не исслед.	Не исслед.	0	0
H5N8	73,3	66,7	46,6	33,3		
H5N3	90	80	Не исслед.	Не исслед.		

Патогенное действие вируса, используемого для контрольного заражения, оценивали по специфической гибели птиц и наличию у них клинических признаков инфекции. У вакцинированных птиц всех опытных групп, которые не погибли в течение 10 сут. после заражения и были отнесены к категории «больные», отмечали угнетенное состояние, анорексию и взъерошенность оперения.

В контрольной группе кур, инфицированных вирусом ВГП H5N1 («Астрахань»), регистрировали первые клинические признаки заболевания через 48 ч (табл. 2), через 72 ч произошли первые случаи гибели птиц, через 5 сут. пало 100% поголовья птиц. У зараженных птиц болезнь клинически проявлялась сильным угнетением, отказом от корма и воды, атаксией, диареей, взъерошенностью оперения, цианозом гребня и сережек, выраженными подкожными кровоизлияниями на голени (рис. 1, 2).

В контрольной группе кур, инфицированных вирусом ВГП H5N8 («Калмыкия»), наблюдали клинические признаки заболевания через 48 ч (табл. 2), а через 72 ч погибли все птицы. У зараженных птиц наблюдали только угне-

тение, диарею, атаксию, взъерошенное оперение (рис. 3). В интактной группе (отрицательный контроль) птицы оставались клинически здоровыми на всем протяжении эксперимента.

Оценка протективных свойств испытуемых препаратов приведена в таблице 3.

В процессе эксперимента также были изучены динамика антителообразования (табл. 4) и антигенное родство диагностических и вакцинных антигенов вируса гриппа птиц (табл. 5). Результаты РГА позволяют сделать вывод об антигенной вариативности вируса гриппа птиц типа А, на что указывает статистически достоверное различие ($p \leq 0,05$) результатов реакции с разными штаммами (антигенными формулами).

Различия в степени защищенности птиц при заражении гетерологичными по отношению к вакцинным штаммам вирусами, в частности применительно к разным кладам евроазиатского вируса ВГП H5N1, отмечены в работах нескольких зарубежных исследователей [5, 7, 8], а также в экспериментах, ранее проведенных в ФГБУ «ВНИИЗЖ» [2]. Кроме того, полученные нами результаты согласуются с положениями некоторых публикаций о том, что уровень антител к вакцинному штамму вируса не всегда ассоциируется с защитой от гибели [5, 7]. Взаимосвязь между количеством антигена и степенью защищенности установлена японскими исследователями при заражении иммунизированных одной вакциной цыплят разными штаммами вируса ВГП H5N1.

Таблица 4

Динамика антителообразования у вакцинированных против гриппа птиц в ИФА

Вакцина	Средний титр антител, ИФА		Контроль
	14 дн.	21 дн.	
«ФЛУ Протект H5»	2 952±432	5 254±524	
«ПОКРОВ ВЮ Грипп птиц»	1 262±118	2 767±633	
H5N1-760	1 640±484	3 440±798	47±13
H5N8	3 263±196	7 036±778	93±21
H5N3	2 131±378	5 836±506	



Рис. 1. Выраженный цианоз лап при заражении непривитых птиц вирусом H5N1



Рис. 2. Почернение гребня и бородачок при заражении неиммунных птиц вирусом H5N1



Рис. 3. Птица, погибшая после заражения вирусом H5N8



Таблица 5

Вакцина	Изучение антигенного родства вируса гриппа в РТГА Титр поствакцинальных антител к вирусу гриппа птиц с разными антигенами через 21 сут. после вакцинации								
	H5N1 «Новосибирский» (диагн. набор ВНИИЗЖ)			H5N1 «Приморский»			H5N8 «Калмыкия»		
	Кол-во поло- жит. проб	СГТ, log ₂	min-max титр	Кол-во поло- жит. проб	СГТ, log ₂	min-max титр	Кол-во поло- жит. проб	СГТ, log ₂	min-max титр
«ФЛУ Протект Н5»	15/15	8,26	6–11	6/15	2,0	0–4	3/10	1,8	0–5
«РОКРОВ ВЮ Грипп птиц»	15/15	5,2	3–9	Не исслед.			0/10	0,3	0–2
H5N1–760	7/10	4,0	1–9	6/10	2,5	0–5	Не исслед.		
H5N8	0/10	0,2	0–2	0/10	0	0	10/10	4,7	4–6
H5N3	9/10	4,8	1–7	Не исслед.			0/10	0,2	0–1

Увеличение концентрации антигена в 2,4 раза позволило полностью защитить птиц от гибели при заражении [8].

Закономерно предположить, что концентрация антигена в вакцине «ФЛУ Протект Н5» была максимальной по сравнению с другими образцами.

Выводы

1. Результаты исследования свидетельствуют о достаточно высоком протективном потенциале вакцин против гриппа птиц, выпускаемых обоими российскими биопредприятиями, в отношении вирусов ВПП H5N1 и H5N8, изолированных на территории страны в 2015–2016 гг., при этом вакцина «ФЛУ Протект Н5» обеспечила 100%-ную защиту зараженных цыплят от гибели и заболевания.

2. Недостаточная протективная активность экспериментальной вакцины на основе актуального эпизоотического вируса H5N8, особенно против гетерологичного вируса H5N1, связана со сложностью накопления вируса в куриных эмбрионах ввиду их быстрой гибели.

3. Архивные образцы экспериментальных вакцин на основе штамма вируса H5N1 «Приморский» (клада 2.3.2) и низкопатогенного H5N3 обеспечивали защиту птиц от гибели на уровне 90% при заражении вирусом ВПП подтипа H5N8, что указывает на воз-

можность и перспективы использования данных штаммов в промышленном производстве вакцин.

4. Результаты серологических исследований поствакцинального иммунитета в РТГА с использованием разных диагностических антигенов подтверждают антигенную вариабельность вируса гриппа птиц подтипа H5.

5. Эпизоотический вирус H5N8 вызывает у кур болезнь со сверхострым течением, без развития характерных клинических признаков в виде цианоза кожных покровов, период от заражения до полной гибели птиц вдвое короче по сравнению с болезнью, вызываемой вирусом H5N1.

Литература

1. Сообщения Информационно-аналитического центра Россельхознадзора [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.fsvps.ru/fsvps/iac/messages>. (дата обращения: 10.04. 2017).
2. Сравнение протективных свойств экспериментальных инактивированных вакцин против гриппа птиц, изготовленных на основе разных штаммов вируса ВПП А/H5N1 / В.Н. Ирза, А.В. Варкентин, С.В. Фролов [и др.] // Ветеринария и кормление. — 2012. — № 5. — С. 19–21.
3. Avian influenza // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2016. Vol. 1. Chapter 2.3.4.
4. A Novel Reassortant Clade 2.3.4.4 Avian Influenza A(H5N8) Virus in Wild Aquatic Birds, Russia, 2016/Lee DH, Sharshov K, Swayne DE [et al.] //

Emerg Infect Dis. 2017 Feb 15; 23(2). DOI: 10.3201/eid2302.161252.

5. Experimental challenge of chicken vaccinated with commercially available H5 vaccines reveals loss of protection to some highly pathogenic avian influenza H5N1 strains circulating in Hong Kong/China/ Y.H. Connie Leung, G. Luk, S-F. Sia [et al.] // *Vaccine* 31 (2013) 3536–3542.

6. Intercontinental spread of Asian-origin H5N8 to North America through Beringia by migratory birds/Lee DH, Torchetti MK, Winker K [et al.] // *J Virol.* 2015;89:6521–4. DOI:10.1128/JVI.01111-15.

7. Variation in protection by seven inactivated H5 vaccine strains against eight H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses in chickens/ D. Swayne, M. Silva, E. Spackman [et al.] // 19th WVPA Congress, Cape Town, 2015. Abstracts, programme & show guide, p 117 / www.wvpc2015.com.

8. Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against a challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza viruses in chickens / S. Shichinohea, M. Okamatsua, N. Yamamotoa [et al.] // *Veterinary Microbiology* 164 (2013) 39–45.

9. Weekly disease information OIE [Электронный ресурс]. — URL: <http://www.oie.int/wahis/public> (дата обращения: 10.04. 2017). □

Для контактов с авторами:

Ирза Виктор Николаевич

e-mail: irza@arriah.ru

Волков Михаил Сергеевич

Варкентин Андрей Владимирович

Фролов Сергей Владимирович

КОЖА ИНДЕЕК – ВОЗМОЖНЫЙ КЛЮЧ К ЗАРАЖЕНИЮ САЛЬМОНЕЛЛОЙ

Ученые Исследовательского Центра при Университете штата Джорджия выявили, что сальмонелла, содержащаяся на коже птицы, может быть источником заражения фарша из мяса индеек при использовании ее как источника жира при приготовлении фарша, так как мускульная ткань индеек очень постная.

В исследовании, опубликованном в прошлом году, были отобраны по 300 проб от каждой из частей тушек индейки, которые оценивались на наличие сальмонеллы. Сальмонелла была выявлена в 13,7% проб кожи голени, 19,7% проб кожи бедер и 25% проб кожи крыльев. 30% проб кожи грудок оказались зараженными сальмонеллой.

(Tony McDougal. *Turkey skin could hold the key to salmonella contamination. PoultryWorld.net, 2017, November 22*).