

## ИНФОРМАЦИЯ

### Проучване върху предаване на вируса при четири ваксини срещу вируса H5N1 (клейд 2.3.4.4b) на Високопатогенна инфлуенца А по птиците



Проучването е проведено от Института за Биоветеринарни изследвания на университета Вагенинген в Лелистад (Wageningen University & Research), Утрехтския университет и Royal GD, Девентер и субсидиран от Министерството на земеделието, природата и качеството на храните (Нидерландия), в контекста на изследователската тема за подкрепа на политиката „Ефективност на ваксините срещу птичи грип“ (номер на проекта ВО-43-111-074). Докладът от проучването е публикуван през януари 2023 г.

#### Съдържание

|   |           |
|---|-----------|
| Резюме  | 3         |
| Накратко заключения и дискусия  | 6         |
| <b>1 Въведение</b>  | <b>8</b>  |
| 1.1 Голям брой инфекции с високопатогенна инфлуенца по птиците в Нидерландия                                    | 8         |
| 1.2 Настояща политика срещу високопатогенна инфлуенца по птиците  | 9         |
| 1.3 Предистория и цел на изследването   | 9         |
| <b>2 Условия, на които трябва да отговаря ваксина срещу HPAI H5 вирус на инфлуенца по птиците в Нидерландия</b> | <b>10</b> |
| 2.1 Широк спектър на ваксината  | 12        |
| 2.2 Намаляване на предаването на вируси и симптомите на заболяването след ваксинация                            | 12        |
| 2.3 Разлика между ваксинация и вирусна инфекция (DIVA)  | 13        |
| 2.4 Програми за мониторинг и надзор   | 14        |
| 2.5 Ефективност на ваксината при полеви условия   | 16        |
| 2.6 Приложимост   | 16        |
| <b>3 Изследване на литературата</b>   | <b>19</b> |
| 3.1 Въведение на литературното проучване  | 19        |
| 3.2 Видове ваксини  | 20        |
| 3.2.1 Инактивирани ваксини  | 20        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.2 Протеинови ваксини (субединични ваксини)  | 21        |
| 3.2.3 Рекомбинантни векторни ваксини  | 23        |
| 3.2.4 иРНК и ДНК ваксини  | 27        |
| 3.2.5 Живи атенюирани ваксини   | 29        |
| 3.3 <b>Заключение</b> от Проучване на литературата  | 29        |
| <b>4 Изследване върху животни</b>   | <b>30</b> |
| 4.1 Въведение   | 30        |
| 4.2 Материали и методи  | 32        |
| 4.2.1 Разрешителни  | 32        |
| 4.2.2 Местоположение и настаняване  | 32        |
| 4.2.3 Животни и групи   | 33        |
| 4.2.4 Вирус предизвикателство   | 34        |
| 4.2.5 Ваксини   | 35        |
| 4.2.6 Дизайн на опита   | 29        |
| 4.2.7 NP ELISA  | 36        |
| 4.2.8 HAR   | 36        |
| 4.2.9 M-PCR   | 37        |
| 4.2.10 Статистически анализи  | 37        |
| <b>4.3 Резултати</b>  | <b>39</b> |
| 4.3.1 Предаване на вирус: изчисляване на репродуктивното число  | 39        |
| 4.3.2 Имунен отговор след ваксинация  | 40        |
| 4.3.3 Защита срещу симптоми на заболяване след инфекция   | 41        |
| 4.3.4 Брой заразени пилета в експеримента с животни   | 44        |
| 4.3.5 Количествено определяне на отделянето на вируса след инфекция   | 47        |
| 4.3.6 Корелати на защитата  | 50        |
| <b>4.4 Заключение</b>   | <b>52</b> |
| <b>4.5 Дискусия</b>   | <b>53</b> |
| <b>Литература</b> не е приложена в настоящия превод и може да се намери в оригиналния доклад на следния адрес:  |           |
| <a href="https://research.wur.nl/en/publications/transmissiestudie-met-vier-vaccins-tegen-h5n1-hoogpathogeen-vogel">https://research.wur.nl/en/publications/transmissiestudie-met-vier-vaccins-tegen-h5n1-hoogpathogeen-vogel</a> |           |
| <b>Приложение 1:</b> авторство  | <b>55</b> |
| <b>Приложение 2:</b> данни за ваксините   | <b>56</b> |

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



## Резюме

С целогодишното присъствие на вируса на високопатогенната инфлуенца А по птиците (HPAI) в Нидерландия се търсят решения за защита на домашните птици от този вирус. Този доклад описва изследването на възможността за ваксиниране на домашните птици срещу настоящите вируси на инфлуенцата по птиците (H5) в Нидерландия и ефективността на четири ваксини.

Няколко параметри могат да бъдат оценени, за да се определи ефективността на ваксината. Най-важният параметър е, че **ваксинацията трябва достатъчно да намали или предотврати предаването на вируса** (разпространението на вируса) между животните във ваксинираното стадо. Предаването на вируса може да бъде количествено определено чрез проучване за предаването. Екскрецията на вируса, измерена чрез тампонни проби от гърлото и клоаката, обикновено се използва в проучвания, за да се получи индикация за степента на инфекциозност.

Освен това може да се оцени и **ефективността при намаляване на клиничните признаци от инфекцията**. Въпреки това, ваксина, която е в състояние само да **намали клиничните признаци, без да инхибира адекватно предаването на вируса, не се счита за ефективна ваксина във ветеринарната област**.

**Първата част на доклада** определя условията, на които трябва да отговаря ваксината срещу HPAI H5 вируси. След това прегледът на литературата предоставя общ преглед на различните типове ваксини срещу инфлуенцата по птиците, описани в литературата, които са потенциално ефективни срещу HPAI (H5) клейд 2.3.4.4b вируси, циркулиращи в момента в Европа. В допълнение към традиционните инактивирани ваксини се обсъждат протеинови ваксини, векторни ваксини и иРНК/ДНК ваксини за защита на домашните птици срещу инфлуенца по птиците. По-специално, в литературата е търсена информация за ефективността на ваксината за предотвратяване или намаляване на предаването на вируса след инфекция с H5 вируси от клейд 2.3.4.4b.

**Втората част на доклада** включва описание на метода и резултатите от проведеното изследване върху кокошки носачки на предаването на вируса след ваксинация с четири ваксини след заразяване с настоящия вирус HPAI H5N1 клейд 2.3.4.4b.

Ваксина срещу настоящи и бъдещи вируси на инфлуенца по птиците HPAI (H5), която може да се използва за защита на домашни птици, трябва да отговаря на няколко условия за употреба в Нидерландия:

- a) Ваксината (в комбинация с друга ваксина) трябва да е **ефективна за намаляване на предаването на вируса ( $R < 1$ ) при полеви условия** и да се вписва в **настоящата програма за ваксиниране на домашни птици**.
- b) Освен това трябва да е възможно **серологично да се разграничат ваксинираните от заразените животни (принцип DIVA)**.
- c) Трябва също така да е възможно да се провеждат **програми за мониторинг и надзор**, за да се определи дали домашните птици са адекватно защитени чрез ваксинация и дали няма вирус на инфлуенца по птиците.

Беше прегледана литературата, за да се идентифицират ваксини срещу HPAI (H5) вируси. Описани са няколко вида ваксини: **инактивирани ваксини, протеинови, векторни, иРНК и ДНК ваксини**. В допълнение, **живи атенюирани вируси** се предлагат като ваксини, но тяхната употреба не е разрешена от Световната организация за здравеопазване на животните (WOAH, OIE) и Европейския съюз (ЕС).

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**Ваксините, базирани на нови технологии, съдържат само част от вируса, обикновено само НА гена, което прави ваксинираните животни серологично различни от заразените животни. Това не важи за инактивираните ваксини, които съдържат целия вирус. По-специално инактивираните ваксини предизвикват отговор с антитела, но за векторните ваксини, иРНК/ДНК ваксините, има доказателства, че клетъчният имунен отговор също се активира, което им дава по-широка активност срещу различни НРАІ Н5 вируси. Литературата не предоставя достатъчно информация за ефикасността на ваксината след инфекция с НРАІ Н5 клейд 2.3.4.4b вируси и кои имунни параметри са добри мерки за защита, за да се определи дали животните са защитени от ваксината. Въпросът не е защитата на отделните животни, а дали групата (стадото на терен) е защитена срещу предаване на вируса. Поради това беше проведено изследване на предаването в групи от кокошки носачки за отглеждане.**

Въз основа на горните условия, литература и дискусии с фармацевтични компании, три модерни ваксини бяха избрани за изследването върху животни. Това са:

1. ваксината HVT-N5 от Ceva Sante Animale (Ceva),
2. ваксината HVT-N5 от Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH) и
3. ДНК ваксината от Huvepharma (HP).
4. ваксината Nobilis LPAI H5N2 (MSD), в допълнение, е четвъртата ваксина, тествана в проучването върху животни. Тази ваксина в момента е единствената ваксина, регистрирана в Нидерландия и нейната ефективност срещу сегашния вирус на инфлуенца по птиците не е била тествана преди. Тази ваксина се основава на инактивиран вирус LPAI H5N2 и не отговаря на зададените условия на серологичния принцип DIVA.

При изследването при животни, по 10 търговски кокошки носачки за отглеждане са ваксинирани с ваксина в деня на излюпване (с двете HVT-N5 ваксини), на 8-и ден (Nobilis) или 14 дневна възраст (ДНК ваксина). Освен това имаше контролна група с 10 пилета, които не бяха ваксинирани. На 8-седмична възраст, 5 пилета от всяка група са заразени (заразени животни) с НРАІ Н5N1 клейд 2.3.4.4b вирус. Другите 5 пилета, контактните животни, не са били заразени, така че да може да се изследва дали може да възникне предаване на вируса от заразените животни на тези контактни животни. Освен това беше тествана допълнителна титърна група Nobilis, в която заразените животни бяха изследвани за наличие на антитела след ваксинация, докато контактните животни бяха неваксинирани. За всяка ваксина и контролна група този експеримент се провежда два пъти.

**Резултатите показват, че и двете HVT-N5 ваксини предотвратяват предаването на вируса в експеримента. Изчислените числа на възпроизвеждане (R) и за двете групи с HVT-N5 ваксина в този експеримент бяха 0 (95% доверителен интервал (CI) 0-0,70) и следователно значително по-ниски, отколкото в контролната група, в която вирусното предаване е настъпило и числото на възпроизвеждане е 3,64 (95% CI 1,89-6,99).**

Предаването на вируси беше предотвратено в една от двете групи с ваксина Nobilis, но не и в двете групи с ваксина „ДНК НР“. Както за ДНК ваксината, така и за ваксината Nobilis, изчисленият R не е под 1, 1,89 (95% CI 0,55-5,22) и 1,48 (95% CI 0,30-3,44), съответно, според метода на „крайния размер“. В групата с Nobilis не е измерен отговор на антитела за някои от заразените животни. Когато бяха избрани животни с титри на антитела в „Nobilis MSD титруваща група“, не беше наблюдавано предаване на вирус.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



Проучването върху животни допълнително показва, че и двете HVT-H5 ваксини са 100% ефективни за намаляване на клиничните признаци и смъртността след инфекция с HPAI H5N1 вируса.

След ваксиниране с ДНК ваксината имаше 70% смъртност на заразените животни и 40% смъртност на контактните животни след заразяване. Симптоми на заболяването се наблюдават и при оцелелите животни.

След прилагане на ваксината Nobilis се наблюдава 40% смъртност на заразените животни и 30% смъртност на контактните животни. Смъртността при контактните животни в групата на Nobilis е била само в групата, където е настъпило предаване, а не в групата, където не е настъпило предаване.

Също така, вероятността за отделяне на вируса и количеството на отделяне на вирус от заразените животни, ваксинирани с HVT-H5 ваксините, е значително по-малко, отколкото е измерено в неваксинираната контролна група.

Вероятността за отделяне на вируса от пилетата, които са получили ДНК ваксината, не е по-ниска, отколкото за контролната група, но количеството на отделения вирус е значително по-ниско.

Вероятността за отделяне на вируса след ваксинация с ваксината Nobilis е значително намалена от клоаката в сравнение с контролната група, но от гърлото тази разлика не е значима. След ваксинация с ваксината Nobilis на MSD, количеството на отделянето на вируса е значително по-малко от това на неваксинираната контролна група. По този начин, въпреки факта, че антигенното разстояние на ваксината Nobilis от текущия HPAI H5 вирус клейд 2.3.4.4b е относително голямо, ваксината също е частично ефективна в този аспект.

И накрая, изследването на предаването илюстрира, че титрите на HAR (теста за инхибиране на хемагутинацията) при експериментални условия са добра мярка за защита („наричани също корелати на защита“) по отношение на предаването на вируса за ваксината Nobilis. За новите видове ваксини, които също предизвикват клетъчен имунитет, и в дългосрочен план при полеви условия, не могат да се правят твърдения въз основа на това изследване.

**Заключението от това изследване върху животни е, че и двете ваксини HVT-H5 отговарят на предварително определените условия в експерименталната среда, при която са тествани тези ваксини. Предаването на вируса и за двете ваксини е значително намалено спрямо неваксинираната контролна група и R е значително по-малък от 1 ( $R < 1$ ). Пилетата бяха напълно защитени от заболяване след заразяване с вируса HPAI H5N1. Ваксините отговарят на принципа DIVA и могат да се прилагат *in ovo* (в яйцето) или чрез подкожно инжектиране на еднокдневни пилета в люпилнята. Известно е, че **този тип векторна ваксина е ефективна само при пилета и пуйки**. Възможно е да има разлики в ефикасността на тези HVT ваксини между пилета и пуйки и различни породи.**

**Ваксините HVT-H5 могат да се използват при пилета и пуйки, но не са подходящи за употреба при други видове домашни птици, като патици или гъски. HVT ваксините са генетично модифицирани организми (ГМО).**

**ДНК ваксината може да се използва при всички видове домашни птици.**

По-нататъшни изследвания трябва да разкрият как различните ваксини се представят поотделно или евентуално в комбинация с бустер при полеви условия, продължителността на защитата и как могат да бъдат включени в съществуващите програми за ваксиниране.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**Създаването на ефективна програма за мониторинг и надзор е от съществено значение** при прилагането на програма за ваксиниране, както и регистрацията на ваксините от фармацевтичните компании за употреба при домашни птици в Нидерландия.

## **Накратко заключенията и обсъждане**

### **Заключение**

Резултатите показват, че и двете HVT-H5 ваксини предотвратяват предаването на вируса в експеримента. Изчислените числа на възпроизвеждане (R) и за двете групи ваксина HVT-H5 в този експеримент бяха 0 (95% доверителен интервал (CI) 0-0,70) и следователно значително по-ниски от тези в контролната група, в която е настъпило предаване на вируса, и числото на възпроизвеждане беше 3,64 (95 % CI 1,89-6,99).

Предаването на вируси беше предотвратено в една от двете групи на Nobilis, но в нито една от групите „ДНК НР“. Както за ДНК ваксината, така и за ваксината Nobilis, изчисленият R не е значително под 1, 1,89 (95% CI 0,55-5,22) и 1,48 (95% CI 0,30-3, съответно) 44), според метода на „крайния размер“. В групата Nobilis не е измерен отговор на антитела за някои от заразените животни. При подбор на животни с титър на антитела в „титърната група Nobilis MSD“ не се наблюдава предаване на вирус.

Проучването върху животни допълнително показва, че и двете HVT-H5 ваксини са 100% ефективни за намаляване на заболяемостта и смъртността след инфекция с HPAI H5N1 вируса.

След ваксиниране с ДНК ваксината е имало 70% смъртност на заразените животни и 40% смъртност на контактните животни след заразяване. Симптоми на заболяването са наблюдавани и при оцелели животни.

След прилагане на ваксината Nobilis се наблюдава 40% смъртност на заразените животни и 30% смъртност на контактните животни. Смъртността при контактните животни в групата с Nobilis е само в групата, където е настъпило предаване, а не в групата, където не е настъпило предаване.

Също така, вероятността от отделяне на вирус и количеството на отделяне на вируса от ваксинираните заразни животни с HVT-H5 ваксини е значително по-малко от измереното в неваксинираната контролна група.

Вероятността за отделяне на вируса от пилетата, които са получили ДНК ваксината, не е по-ниска, отколкото за контролната група, но количеството вирус, което е отделено, е значително по-ниско.

Вероятността за отделяне на вируса след ваксинация с ваксината Nobilis е значително намалена в клоаката в сравнение с контролната група, но тази разлика не е значима в гърлото. След ваксинация с ваксината Nobilis на MSD, количеството на отделяне на вируса е значително по-малко от това на неваксинираната контролна група. Така че, въпреки че антигенното разстояние на ваксината на Nobilis до сегашния вирус на HPAI H5 клейд 2.3.4.4b е относително голямо, ваксината също е частично ефективна за този аспект.

И накрая, изследването на предаването илюстрира, че титрите на HAI при експериментални условия са добра мярка за защита (наричани също корелати на защита) в областта на предаването на вируса за ваксината Nobilis. Въз основа на това изследване не могат да се правят изявления за новите видове ваксини, които също предизвикват клетъчен имунитет, както и в дългосрочен план при полеви условия.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



## Дискусия

В това проучване върху животни ваксините HVT-H5 са ефективни за предотвратяване на предаването на вируса. ДНК ваксината на HP не предотвратява предаването на вируса от заразени животни към контактни животни. В предишни проучвания върху животни, проведени от фармацевтичната компания, тази ваксина е ефективна за предотвратяване или намаляване на симптомите на заболяването и отделянето на вируси след еднократно приложение при пилета на същата възраст (в момента се пише публикация). Ваксината Nobilis на MSD в пълна доза в група В и групите за селекция на титър предотвратява предаването на вируса от заразените животни към контактните животни.

При експериментални условия ваксините HVT-H5 (и отчасти ваксината Nobilis) са ефективни за предотвратяване на предаването на вируса. За да могат ваксините да се използват на практика, ваксините трябва да отговарят на минималните изисквания, определени от Световната организация за здравеопазване на животните (WOAH). Наръчник за сухоземни животни за инфлуенца по птиците съдържа насоките, на които трябва да отговаря една ваксина, преди да може да бъде одобрена за употреба при домашни птици [10]:

(i) Ваксините трябва да се тестват чрез експериментално заразяване на пилета след ваксинация (> 3 седмици след ваксинация) с доза от  $10^6$  EID<sub>50</sub>. Най-малко 80% от ваксинираните пилета трябва да преживеят тази инфекция. В това проучване за предаване пилетата са били заразени с доза от  $10^6$  EID<sub>50</sub> от вируса HPAI H5N1 най-малко 6 седмици след ваксинацията. И двете ваксини HVT-H5 отговарят на изискванията на WOAH, но ДНК ваксината и ваксината Nobilis не. Това може да се постигне с повторно приложение на същия или различен тип ваксина (бустер). Това е доказано преди това с други ваксини, например експерименталната ДНК ваксина, описана от Hussein, et al. (2016). Тази ваксина не дава HAR титри и никаква защита срещу смъртност след еднократно приложение. Въпреки това, след бустер с ваксината Volvac B.E.S.T (BIAH), титрите на HAR са по-високи и има 80% защита срещу смъртност [56].

(ii) Полевите HAR титри трябва да бъдат най-малко 5 за защита срещу смъртност и най-малко 7 за намаляване на излъчването на вируса. В това проучване при животни титрите на HAR преди инфекцията са определени на 42-ия ден.

Ваксината HVT-H5 на Ceva отговаря на изискването със среден хомоложен титър от 7,68.

HVT-H5 ваксината на BIAH просто не отговаря на изискването със среден хомоложен титър от 6,05. За тази ваксина обаче не беше възможно да се тества 100% хомолог в HAR, тъй като не беше наличен точен хомоложен антиген. Тестването беше извършено с полеви вирус, който е генетично много близък, но може да има малка антигенна разлика, която всъщност може да доведе до по-висок хомоложен титър.

Хомоложните титри за ДНК и ваксината Nobilis са средно съответно 3,80 и 0,25 и следователно не отговарят на изискването на WOAH.

Трябва да се отбележи, че титрите на HAR са определени в експеримент с животни, а не на полето, както е предписано от WOAH. Титрите на HAR, постигнати при полева ваксинация, може да са по-ниски от титрите на HAR, постигнати в това изследване върху животни. В проучването при животни значително намаляване на предаването, отделянето на вируса и смъртността вече се наблюдава при по-ниски титри на HAR. Следователно резултатите от това изследване върху животни се отклоняват от предишно

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



проучване за предаване, което е проведено [19] и трябва да бъдат проучени по-подробно в последващи проучвания.

В допълнение към горните изисквания от WOAH, трябва да е възможно от **насоките на ЕС да се докаже инфекция с полеви вирус при ваксинирани животни. Следователно е необходим принцип DIVA**, за да може да се направи това разграничение със специфична диагностика. Както HVT ваксините, така и ДНК ваксината отговарят на принципа DIVA, но това не се отнася за ваксината Nobilis.

И двете HVT-H5 ваксини отговарят на условията, поставени от изследователите. Ваксините предотвратяват предаването на вируса и осигуряват пълна защита срещу смъртност и заболяване след заразяване с HPAI H5N1 вируса. Ваксините отговарят на принципа DIVA и е възможно масово приложение, тъй като HVT-H5 ваксините могат да се прилагат чрез инжектиране или *in ovo* в люпилнята. Този тип векторна ваксина обаче е ефективна само при пилета и пуйки. Допълнителни изследвания трябва да покажат как различните ваксини се представят при полеви условия самостоятелно или евентуално в комбинация с бустер и каква е продължителността на защитата. **HVT-H5 ваксините са базирани на херпесен вирус, което означава, че могат да генерират антитела срещу вируса на инфлуенца по птиците за цял живот.** Могат обаче да се обмислят програми за ваксиниране, при които се прилага бустер с различен тип ваксина, тъй като на практика бустерите с различен тип ваксина изглежда са необходими за поддържане на достатъчна дългосрочна защита с HVT-векторни ваксини срещу други заболявания.

За да могат да се включат HVT-H5 ваксини в програмата за ваксиниране, трябва да се вземат предвид други HVT векторни ваксини, които вече са приложени на кокошки носачки или родителски животни (срещу, например, Marek, IBD, ILT и NDV). Когато две ваксини, базирани на HVT вектор, се дават на едно и също животно и това може да е вярно, ако се дават на майки, ваксините може да взаимодействат една с друга, което може да намали ефективността. Следователно програмите за ваксини трябва да бъдат изготвени по такъв начин, че да съдържат векторна ваксина срещу HVT само веднъж. Допълнителни изследвания на (клетъчния) имунен отговор също са необходими, за да се получи достатъчна представа за връзката между измерените имунологични стойности и защитата на пилетата от предаване на вируси. Особено в дългосрочен план и при полеви условия. Тази информация е необходима от насоките на ЕС за създаване на ефективна програма за мониторинг и наблюдение, които са предпоставка за прилагане на програма за ваксиниране срещу птичи грип. Накратко, препоръчват се допълнителни изследвания, преди да започнете да ваксинирате домашните птици срещу птичи грип в Холандия. И накрая, ваксините трябва да бъдат регистрирани от фармацевтичните компании, преди да могат да се прилагат на домашни птици в Холандия.

## 1. Въведение

### 1.1 Голям брой инфекции с HPAI в Нидерландия

През последните години в Нидерландия са открити вируси на високопатогенна инфлуенца А по птиците (HPAI) H5 при домашни и диви птици. През 2014 г., 2016 г. до 2018 г. и 2020 г. вирусът HPAI H5 е открит в общо 27 птицеферми през зимните месеци [1-3]. През 2021-2022 г. броят на инфекциите при домашните птици е много по-висок от предходните години. От 1 октомври 2021 г. до 30 септември 2022 г. вирусите на HPAI H5 бяха открити в общо 66 търговски птицеферми и на 20 места с >50 отглеждани птици [4]. Освен това, за разлика от предходни години, през 2022 г. HPAI H5 вируси също бяха открити с висока честота през лятото при домашни и диви птици. Вирусите на HPAI H5 са въведени в Нидерландия от диви водоплаващи птици, които мигрират от местата за

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





размножаване в Русия в Нидерландия, за да прекарат зимата. Повечето водолубиви птици пристигат в Нидерландия през октомври, като патици, лебеди и различни видове гъски. По време на престоя си в Нидерландия те заразяват други птици, но през пролетта прелетните птици отново напускат и плътността на птиците намалява. Освен това метеорологичните условия през пролетта стават по-малко благоприятни за оцеляването на вируса на инфлуенцата по птиците (AIV). В предишни години тези фактори гарантираха, че AIV изчезва от Нидерландия през пролетта. Въпреки това през 2022 г. вирусът на инфлуенца по птиците беше открит през лятото в голям брой мъртви диви и домашни птици [4]. Поради големия брой инфекции и наличието на AIV през лятото ситуацията с инфлуенца по птиците в Нидерландия се промени. Не само в Нидерландия имаше голям брой инфекции с инфлуенца по птиците през 2021-2022 г., но и други европейски страни също откриха голям брой инфекции с инфлуенца по птиците при домашни птици през същия период. От 1 октомври 2021 г. до 30 септември 2022 г. вирусите на HPAI H5 бяха открити в 1450 обекта за домашни птици във Франция и в 319 обекта за домашни птици в Италия. През този период вирусът на инфлуенца по птиците е открит в 36 европейски страни [5].

## 1.2 Настояща политика срещу високопатогенната инфлуенца А по птиците

Нидерландия има голяма популация от домашни птици. През 2021 г. Нидерландия ще има приблизително 80 милиона домашни птици [6]. Птицевъдният сектор се състои от около 98% пилета, от които 45% кокошки носачки и 55% бройлери (и за двете включително разплодни), 1% патици за месо, 0,5% пуйки и 0,5% други домашни птици [7]. Поради високата плътност на домашните птици, добрият надзор, бързата диагностика и бързата намеса в случай на инфекции са важни за предотвратяване на предаването на вируса на инфлуенца по птиците между компаниите. Настоящите разпоредби на ЕС имат политика за „унищожаване“ на високопатогенната инфлуенца по птиците, което означава, че всички птици в птицефермата се умъртвяват при откриване на вируса [8]. В допълнение, за заразен птицеферма или място с отглеждани домашни птици >50 животни, около фермата се създава ограничителна зона (10 km), в рамките на която се прилага забрана за транспортиране и лов, и която се състои от зона за наблюдение (3 -10 km) и предпазна зона (<3 km), където се прилагат допълнителни мерки. Преди това птицефермите в рамките на 1 км от заразената ферма винаги са били опразвани и почиствани превантивно, за да се предотврати предаването на вируса между фермите (предаване между фермите). През сезон 2021-2022 г. обаче Холандският орган за безопасност на храните и потребителските продукти (NVWA) определи за всеки отделен случай дали тези ферми трябва да бъдат опразнени превантивно. Опразването се извършва само ако числото на възпроизвеждане (R, мярка за броя на вторичните инфекции, причинени от едно заражено място) между компаниите се оценява на по-високо от 1 или ако са идентифицирани високорискови контакти между компании.

Животновъдите предприемат допълнителни хигиенни мерки за предотвратяване на заразяване с инфлуенца по птиците при домашните птици. Освен това домашни птици от търговски дружества са отглеждани в голяма част от Нидерландия от октомври 2021 г. В периода от 28 юни 2022 г. до 5 октомври 2022 г. задължението за задържане беше временно отменено в някои региони в източната част на Нидерландия, но от 6 октомври 2022 г. отново се прилага национално задължение за задържане [9]. От октомври 2021 г. любителите на животните подлежат на задължение за екраниране, което има за цел да предотврати контакт между домашни и диви птици.

## 1.3 Предистория и цел на изследването

Настоящата политика за контрол на високопатогенната инфлуенца по птиците не е приемлива за заболяване, което се среща през голяма част от годината. Борбата с

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](http://mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



вируса на инфлуенца по птиците включва умъртвяването на голям брой животни. Това има голямо социално-икономическо въздействие. В допълнение, дългосрочното отглеждане на закрито, ограждане или екраниране на домашни птици като превантивна мярка е с неблагоприятно въздействие върху благосъстоянието на животните. Големият брой заразени в птицефермите също показва, че настоящата политика не е достатъчна, за да предотврати навлизането на вируси. Затова се търсят възможности за защита на домашните птици от инфлуенца по птиците чрез ваксиниране. **В момента ваксинацията все още не е възможна в Нидерландия, тъй като няма регистрирана подходяща ваксина. Освен това ваксинацията ще засегне възможностите за търговия с домашни птици и птичи продукти.**

Беше проведено проучване от името на Министерството на земеделието, природата и качеството на храните на Нидерландия (LNV), за да се проучи възможността за ваксиниране на домашни птици срещу епидемията от инфлуенца по птиците в Нидерландия. Това проучване е проведено от Wageningen Bioveterinary Research (WOT отдел за инфекциозни болести по животните), Университета в Утрехт, WUR и Royal GD Deventer. Това проучване изследва ефективността на четири ваксини. Могат да се оценят различни параметри, за да се определи ефективността на дадена ваксина. **Основната цел на ваксинацията срещу инфлуенца по птиците е да се предотврати заразяване на домашните птици. За да се постигне това, ваксината трябва да може да предотврати в достатъчна степен предаването на вируса (разпространението на вируса) между животните. Ако предаването на вируса между животните може да бъде достатъчно намалено, инфекцията на едно животно няма да доведе до огнище в стадото. Това също намалява риска от предаване между фермите, риска от заболяване при домашните птици и риска от излагане на хора.**

Намаляването на предаването на вируса може да бъде постигнато чрез намаляване на степента на инфекциозност и/или намаляване на чувствителността на индивидите във ваксинирано стадо. Екскрецията на вируса, измерена чрез вземане на тампон-проби от гърлото и клоаката, често се използва в проучвания за количествено определяне на степента на инфекциозност. Освен това може да се оцени и ефективността при намаляване на симптомите на инфекцията. **Въпреки това, ваксина, която е в състояние само да намали симптомите на заболяването, без да предотвратява адекватно предаването на вируса, не се счита за ефективна ваксина. В тази ситуация инфекциите няма да бъдат лесно забелязани, докато вирусът продължава да циркулира между животните и фермите.** Въпреки че във ветеринарен контекст намаляването на симптомите на заболяването няма да бъде цел на ваксинацията сама по себе си, то е свързано с другите параметри. Ако животното не се зарази благодарение на ваксинацията, животното няма да се разболее. Следователно този доклад се отнася главно до ефектите, свързани с предаването на вируса, когато говорим за ефективността на ваксината и/или защитата срещу инфекция.

## **2. Условия, на които трябва да отговаря ваксина срещу HPAI H5 вирус на инфлуенца по птиците в Нидерландия**

### ***Препоръки на Световната организация за здравеопазване на животните относно ваксинирането***

Световната организация за здравеопазване на животните (WOAH, OIE) е описала условията, на които трябва да отговарят ваксините срещу инфлуенца по птиците в „Наръчника за сухоземни животни“ [10]:

- Производството на ваксини трябва да се извършва при контролирани условия и ваксините трябва да бъдат доказуемо чисти.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



- Ваксината трябва да е безопасна за прицелните и нецелевите животни. Трябва да се извършат изследвания върху животни, за да се докаже поносимостта и безопасността на ваксината.

- Живи (атенюирани) ваксини не се препоръчват поради риск от пренареждане на генни сегменти или връщане към вирулентност.

- Ваксините трябва да се тестват чрез експериментално заразяване на пилета след ваксинация (> 3 седмици след ваксинация) с доза от  $10^6$  инфекциозна доза за яйца (EID50), доза, която води до най-малко 90% смъртност при неваксинирани животни.

- Препоръчва се минимална антигенна доза от 50 защитна доза (PD50, дозата, при която 50% от заразените животни оцеляват) или 3  $\mu$ g хемаглутинин на доза ваксина.

- Полевите HAI титри трябва да бъдат най-малко 5 за защита срещу смъртност и най-малко 7 за намаляване на излъчването на вируса.

- Ваксината трябва да има срок на годност най-малко една година.

### Европейското законодателство относно ваксинирането

Понастоящем HPAI е класифицирана от Европейския съюз като болест, която обикновено не се среща в ЕС, изискваща незабавни мерки за контрол веднага щом болестта бъде открита и изискваща мерки за спиране на разпространението, спиране на движенията на животни и унищожаване на животните [11]. В момента Европейската комисия работи върху законодателна поправка [12]. **Тази промяна дава възможност на държавите-членки на ЕС да ваксинират срещу инфлуенца по птиците при определени условия [12].**

Ако държава-членка на ЕС **иска да ваксинира превантивно:**

- трябва да се изготви официален план за ваксиниране и да се сподели с другите държави-членки на ЕС и Европейската комисия.
  - След ваксинацията трябва да се извършва по-стриктен надзор чрез **ежеседмично изследване за наличие на HPAI вирус.**
  - Освен това фермата трябва да се посещава от ветеринарен лекар поне веднъж месечно, по време на който се оценяват производствените и здравни данни. По време на това **ежемесечно** посещение във фермата трябва да се вземат и **проби за серологично и вирусологично изследване.**
  - И накрая, **транспортните движения на ваксинирани животни и животински продукти трябва да бъдат регистрирани [12].** Тези условия са определени, за да се даде възможност за ваксиниране в рамките на ЕС, като същевременно се запазят търговските възможности.

В ЕС, с изключение на извънредни ситуации, само ваксини, които са регистрирани от Европейската агенция по лекарствата (ЕМА), могат да се прилагат на домашни птици. Този орган оценява безопасността на ваксината за хора и ветеринарни специалисти.

Понастоящем в Нидерландия е регистрирана една ваксина срещу HPAI H5 вируса, а именно инактивираната ваксина Nobilis Influenza, базирана на щам LPAI H5N2 от 1986 г. [13]. Вирусът в тази ваксина и настоящият циркулиращ HPAI H5N1 вирус не са тясно свързани, така че не се очаква ваксината да осигури достатъчна защита. В миналото Nobilis Influenza H5N6 и Poulvac Flufend H5N3 RG също са били регистрирани от ЕМА, но тези ваксини вече не са регистрирани за употреба [14, 15].

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



## Предписани условия за ваксиниране в Нидерландия

Изследователският консорциум е изготвил **шест условия**, на които трябва да отговаря ваксина срещу НРАІ Н5 вируси на инфлуенца по птиците в Нидерландия, като също така взема предвид условията на WOAH и ЕС:

1. Ваксината да има широк спектър на действие и да бъде ефективна срещу бъдещи НРАІ Н5 вируси,
2. Да намалява предаването на вируса и симптомите на заболяването след ваксинация,
3. Да позволява да се направи разлика между ваксинация и вирусна инфекция (DIVA),
4. Програми за мониторинг и надзор, проследяване на имунния отговор след ваксинация, надзор на инфлуенца по птиците при ваксинирани животни,
5. Ефективност на ваксината при полеви условия и
6. Приложимост, които са разгледани надолу подробно:

**1. Една ваксина трябва да има широк спектър на действие** и също така да бъде **ефективна срещу бъдещи НРАІ Н5 вируси**, тъй като вирусът на инфлуенца по птиците се променя и еволюира бързо.

По-традиционните ваксини, инактивирани ваксини, по-специално предизвикват хуморален имуен отговор, при който се произвеждат антитела. Въпреки това, клетъчният имуен отговор от цитотоксични Т клетки, наред с други неща, също играе основна роля в имунитета [21]. Съвременните ваксини, базирани на нови технологии (векторни ваксини, иРНК/ДНК ваксини и вероятно субединични ваксини) предизвикват както хуморален, така и клетъчен имуен отговор, така че да имат по-широк ефект срещу вируса на инфлуенцата по птиците, отколкото например инактивирани ваксини [22-26]. Широкият ефект е от съществено значение за дългосрочния ефект от ваксинацията, така че домашните птици да бъдат защитени и срещу мутирални варианти на НРАІ Н5 вирус от клейд 2.3.4.4.b и за предпочитане също от други клейдове.

### **2. Намаляване на предаването на вируса и симптомите на заболяването след ваксинация**

Основната цел на ваксинирането срещу инфлуенца по птиците в Нидерландия е **да се предотврати заразяване на стада от домашни птици**. Ако предаването на вируса между животните може да бъде достатъчно намалено, инфекцията на едно животно няма да доведе до огнище в стадото. Намаляването на предаването на вируса може да бъде постигнато чрез намаляване на степента на инфекциозност и/или намаляване на чувствителността на индивидите във ваксинирано стадо. Отделянето на вируса, измерено чрез вземане на тампон-проби от гърлото и клоаката, може да се използва за количествено определяне на степента на инфекциозност. По време на инфекция с НРАІ вирус големи количества вирус се екскретират през дихателните пътища и през клоаката [27]. Поради това отделяне на вируса други животни също могат да се заразят, когато влязат в пряк или косвен контакт с екскременти, съдържащи вируса, като оборски тор. **Една ефективна ваксина намалява разпространението на вируса между животните в стадото и намалява инфекциозността и податливостта на животните към инфекция**. Това може да се установи чрез изследвания на предаването. Ваксинацията може да доведе до падане на репродуктивния номер под 1 ( $R < 1$ ) и може да спре предаването на вируса между животните в стадото. Когато предаването на вируса в стадото е ограничено до малко огнище, шансът за разпространение в други обори и ферми е минимален. Така че с **ефективна програма за ваксиниране**,

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](http://corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



репродуктивният номер за предаване на вируса между фермите също става по-малък от 1 [28].

Вирусите на високопатогенната инфлуенца по птиците са силно патогенни, което води до висока смъртност. **Пилетата и пуйките умират много бързо** след заразяване с HPAI вирус. За илюстрация: в проучване върху животни HPAI H5N6 вирусен клейд 2.3.4.4b, вирусът, открит в Нидерландия през 2017 г., е приложен през дихателните пътища на 10 6-седмични SPF кокошки носачки. Всичките 10 пилета са умрели в рамките на 48 часа [29]. При други видове домашни птици, като **месодайни патици** или други птици, смъртността също може да възникне поради инфекция с HPAI H5 вируси от клейд а 2.3.4.4b, но това е по-малко масивно, отколкото при пилета [29, 30]. Особено **при патиците за разплод** е поразително, че има малка или никаква повишена смъртност, но има ясно намаление на снасянето на яйца и приема на храна [30]. Симптомите на заболяването, които се наблюдават, варират за различните видове домашни птици/птици и вируси и в допълнение към гореспоменатата смъртност и ефекти върху приема на храна и производството на яйца, могат да се състоят от неврологични симптоми, респираторни симптоми, оток, цианоза (синьо оцветяване) и хеморагии на кожата и вътрешните органи [31]. Дали симптомите на заболяването ще се появят или не и колко сериозни са те зависи от животинския вид, но в много случаи това е свързано със степента, до която вирусът може да се задържи и размножи в животните. Ако размножаването на вируса в животното и предаването на вируса могат да бъдат предотвратени в достатъчна степен, по-малко животни в стадото ще се разболеят сериозно. Това е много важно и от гледна точка на хуманното отношение към животните. **Трябва да се отбележи, че за разлика от Нидерландия, в други части на света, където вирусът на инфлуенца по птиците е ендемичен от години, програмата за ваксиниране може да бъде насочена основно към намаляване на симптомите на заболяването и ефектите върху производството.**

### 3 Разлика между ваксинация и вирусна инфекция (DIVA)

В Нидерландия домашните птици се изследват серологично за липса на антитела срещу инфлуенца по птиците. Това откриване на антитела се основава на протеина хемаглутинин (HA) и нуклеокапсиден протеин (NP). При откриване на антитела срещу инфлуенца по птиците домашните птици незабавно се изследват за наличие на вирус. По този начин се откриват полеви инфекции, които не са били забелязани от болестни симптоми. Ваксините също така стимулират производството на антитела, но тези антитела трябва да бъдат серологично различими от антителата, произведени при инфекция. Този принцип се нарича **„разграничаване на заразени от ваксинирани животни“ (DIVA)** споменато [10]. Целият (пълният) вирус е обработен в инактивираните ваксини, което означава, че се произвеждат антитела срещу всички вирусни протеини, включително срещу HA и NP. В резултат на това заразените животни на базата на серологичните тестове вече не могат винаги да бъдат разграничени от ваксинираните животни. Само когато полевият щам има различен тип NA, може да се направи разграничение на тази основа. Вирусите на инфлуенца по птиците обаче могат да се развият бързо и да обменят генетична информация, поради което тази система не е стабилна за прилагане на принципа DIVA. Ако типът NA не се различава между ваксиналния вирус и полевия вирус, DIVA за инактивирани ваксини е възможна само при откриване на вируса чрез PCR. Тази стратегия е скъпа и отнема време. Ето защо предпочитанието е към DIVA на базата на серология. По-модерните типове ваксини, като векторни ваксини, ДНК ваксини и субединични ваксини, се състоят само от HA гена, така че може да се направи разлика между ваксина и инфекция на базата на антитела срещу NP протеина [18, 22, 32]. Поради това антителата на тези ваксини могат

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



да бъдат разграничени въз основа на серологични тестове. Следователно такива серологични тестове могат да бъдат важна част от програмите, предназначени за откриване на полеви инфекции след ваксинация и да позволят износа на птичи продукти.

#### 4 Програми за мониторинг и надзор

Целта на програмата за мониторинг и надзор на НРАІ вируса при ваксинирани домашни птици е двойна.

**Първо**, трябва да е възможно да се докаже във ваксинирано стадо, че ваксинацията е била достатъчно успешна. Това може да се измери чрез **измерване на имунния отговор след ваксинация**.

**Второ**, важно е да можете бързо да откриете циркулиращия вирус на инфлуенца по птиците във ваксинирани домашни птици. Това може да се измери чрез липсата на вирус или антитела срещу инфлуенца по птиците. Тези две конкретни цели са разгледани по-подробно по-долу.

##### а) Проследяване на имунния отговор след ваксинация

Важно е да можете да измерите имунния отговор след ваксинация в стадо от домашни птици. Количеството антитела, стимулирани от поствакциналния хуморален имунен отговор, може да бъде количествено определено в НАР [10]. За инактивирани ваксини проучванията [19, 33, 34] показват, че нивото на титрите на НАР антителата, комбинирано с разпределението на тези титри в стадото, може да се използва за оценка дали дадена ваксина е била достатъчно успешна, за да осигури защита (и следователно да бъдат добри така наречените „корелати на защитата“).

Това може да е по-малко при векторните ваксини и иРНК/ДНК ваксините. Тези ваксини предизвикват както хуморален (измерен с антитела), така и клетъчен имунен отговор. Хуморалният имунен отговор на тези ваксини може да бъде по-нисък след ваксинация, отколкото след ваксинация с инактивирани ваксини, но тогава домашните птици могат да бъдат защитени от предизвикания клетъчен имунен отговор [18, 23, 35]. Поради това за тези ваксини може да е важно клетъчният имунен отговор също да трябва да бъде количествено определен, когато самото измерване на антителата се окаже недостатъчно. Това може да стане например с IFN- $\gamma$  ELISpot, който измерва количеството на IFN- $\gamma$  [36, 37]. Този метод обаче е трудоемък. Друг потенциално подходящ метод е оцветяването на цяла кръв (където се измерва активирането на клетъчния имунен отговор [38]).

За да се определи количествено имунният отговор след ваксинация, трябва да се разработи подходяща и ефикасна система за мониторинг, при която програмата за ваксиниране да бъде настроена по такъв начин, че да се направи допълнителна ваксинация, ако имунният отговор е твърде слаб. От последващи изследвания, при експериментални и/или полеви условия, в стада, проследявани за по-дълъг период от време, може допълнително да се определи дали титрите на НАР са достатъчни „корелати на защита“ за векторни и иРНК/ДНК ваксини или дали (комбинация с) други методи са по-подходящи за измерване (протичането на) степента на защита, осигурена от ваксината.

##### б) Надзор на инфлуенца по птиците при ваксинирани животни

Важно е да можете бързо да откриете циркулиращи вируси на инфлуенца по птиците във ваксинирани домашни птици. Тъй като симптомите на заболяването и смъртността могат да бъдат намалени с ваксинация, НРАІ инфекцията може да бъде

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



открита по-бавно или изобщо да не бъде открита. **Ако вирусът остане незабелязан и лежи латентно в стадо от домашни птици, вирусът може да се разпространи незабелязано между птицефермите.** Това доведе до възникване на огнища, които не бяха бързо открити в различни страни, където се практикува ваксинация, като Китай и Индонезия, позволявайки на вируса да се разпространява между фермите [17, 39]. Този процес е известен още като „**тихо разпространение**“. При добре ваксинирани стада и с добри програми за наблюдение и надзор шансът за тихо разпространение е малък. **Въпреки това, тихо разпространение може да настъпи дори в неваксинирани стада** [40]. А продължителната циркулация на вируса сред ваксинирана популация може да доведе до нови варианти на вируса, както е показано в няколко страни в Близкия изток, Азия и в Мексико с вирусите H5Nx (Gs/GD), H7N3, H7N9 или H9N2 [10, 18].

**По-специално поради риска от тихо разпространение, страните са предпазливи относно използването на ваксинация и вноса на ваксинирани домашни птици. Следователно, за да се предотврати това „тихо разпространение“ и да се позволи осъществяването на износ, е важно ваксинацията да бъде придружена от подходяща система за наблюдение.**

**Антителата срещу вируса на инфлуенца** по птиците могат да бъдат открити в кръвни проби с помощта на ELISA. **NP-ELISA** е насочен към един от единадесетте вирусни протеини, а именно нуклеокапсидния протеин (NP) на вируса на инфлуенца по птиците. Следователно NP-ELISA, който понастоящем се използва за скрининг за антитела срещу инфлуенца по птиците, все още може да се използва при ваксиниране с ваксини, които се състоят само от вирусния HA протеин. Въпреки това, положителните резултати от NP-ELISA в момента се потвърждават с теста за инхибиране на хемагутинацията (HAR), насочен към протеина H5. Тъй като всички видове ваксини съдържат протеин H5, HAR тестът вече няма да може да прави разлика между ваксинирани и заразени животни. **Следователно NP-ELISA вече не може да бъде потвърден с HAR** и следователно ще трябва незабавно да се направи потвърждение за откриване на вируса в тампон-проби от гърло и клоака. Тези тампони се изследват с **PCR тест, насочен към Matrix протеина.** PCR тестът може да се използва както при ваксинирани, така и при неваксинирани животни за откриване на заразени животни. PCR методът е по-скъп от HAR теста и има ограничения след ваксинация, тъй като ваксинацията ще намали отделянето на вируса и симптомите на заболяването след инфекция. Тогава е по-трудно да се изберат болни животни, които в момента отделят вирус за теста, което означава, че **ще трябва да се вземат проби от сравнително голям брой произволни животни, за да се докаже липсата на инфекция с определена степен на надеждност.** PCR обаче може да се използва за откриване на инфекция много по-бързо, отколкото на базата на антитела, тъй като антителата се появяват само след няколко седмици, а отделянето на вируса може да бъде открито още един ден след заразяването.

Когато ваксинацията ще се извършва в Нидерландия, **ще трябва да се създаде ефективна система за надзор, базирана на различни принципи (серология и PCR),** в съответствие с програмата за ваксиниране. Могат да се вземат и други проби освен тампонни. Примерите включват тестване на всички отпаднали животни (вземане на проби от кофа), вземане на проби от околната среда, например от носилката с помощта на галоши или вземане на проби от прах или тампони от инвентара на обора или халето, или тестване на водни проби. Въпреки това, чувствителността на тези други видове вземане на проби остава да бъде проучена.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



## 5 Ефективност на ваксината при полеви условия

В миналото е доказано, че ваксините са по-малко ефективни на полето, отколкото в кондиционираната среда при проучване върху животни [41, 42]. По време на експерименти с животни, пилетата не са изложени на инфекции с други патогени и не получават ваксинациите от редовната програма за ваксиниране на домашни птици. Тъй като коинфекциите и ваксинациите могат да повлияят на имунния отговор след ваксинация, **ефективността на полето може да бъде по-малка, отколкото при експериментални условия. Качеството на масовата ваксинация при практически условия също ще се различава от индивидуалното приложение при експеримент с животни. Следователно ваксина, която изглежда ефективна при експериментални условия, трябва да бъде тествана и при полеви условия [22].** В допълнение, имунитетът след ваксинация може да намалее с времето [41]. Това намаляване на имунитета може да означава, че ваксинираното стадо вече не е достатъчно защитено срещу предаване на вируса.

## 6 Приложимост

### Ефективност на ваксината при различни видове домашни птици

Не всички ваксини могат да предпазят от симптомите на заболяването и да намалят отделянето на вируси при всички видове домашни птици. Пример за това са векторните ваксини, при които векторът се състои от херпесен вирус Meleagrid, произхождащ от пуйки (Turkey herpesvirus (HVT)). HVT е третият серотип в рамките на вирусите на болестта на Marek. **Пуйките и пилетата принадлежат към семейство Кокшоподобни (*Galliformes*) и HVT ваксината е ефективна и при двата вида домашни птици.** Месните патици принадлежат към семейство Гъскоподобни (*Anseriformes*), при които HVT ваксините не са ефективни. Това е демонстрирано, например, в проучването на Pantin-Jackwood и др. (2016), където HVT ваксина (Vectormune, Ceva Sante Animale (Ceva)), самостоятелно или в комбинация с инактивирана ваксина H5N1, е приложена на месни патици [43]. Впоследствие патиците бяха заразени с 2 различни HPAI H5N1 вируса (клейд 1.1.2 и 2.3.2.1c). Предаването на вируса не е проучено, но само 30% от ваксинираните патици са оцелели след инфекцията и е имало само малко намаление на излъчването на вируса. **Следователно тази HVT ваксина е недостатъчно ефективна за намаляване на симптомите на заболяването и отделянето на вируса при патици [43].**

Други вектори също имат ограничения за употреба при определени животински видове. По принцип векторът Fowlpox (*Poxviridae*) може да се прилага само на пилета, въпреки че има индикации, че този вектор предлага защита и на гъски [22].

Векторът на вируса на патешкия ентерит (DEV) е предназначен за патици, но Liu и др. (2013) показаха, че тяхната rDVE-H5 ваксина също предпазва пилетата от HPAI H5N1 вируса (GD/322), когато дозата е достатъчно висока [44].

Други видове ваксини, като инактивирани ваксини и иРНК/ДНК ваксини, са по-малко специфични за гостоприемника.

**Накратко, не всички векторни ваксини могат да се прилагат на всички видове домашни птици без тестване. Изборът на програма за ваксиниране трябва да вземе предвид кои ваксини за кой вид животни се използват.**

### Наличието на майчини антитела

Майчините антитела (майчини антитела (MDA)) са антитела, които пилето получава от майката чрез яйчния жълтък и присъстват в тялото в продължение на 3 до 4

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





седмици [45]. Тези антитела могат да бъдат резултат от инфекция с инфлуенца по птиците, но също така антителата, произведени след ваксинация, се предават от майката на пилето. Високите титри на MDA могат да защитят потомството срещу симптоми на заболяване и отделяне на вируси, но ниските титри на MDA срещу HPAI могат да повлияят на инактивираните ваксини [46]. Това е показано, например, с инактивирани ваксини, както в проучването на Maas, et al.

Проучването върху животни от Reemers и др. (2021) демонстрира ефекта на MDA при бройлери след ваксинация с рекомбинантна HVT (HVT) векторна ваксина (MSD). На 2 и 3 седмици пилетата са заразени с HPAI H5N1 вирус от клейд 2.2.1 (този вирус прилича на вируса, включен във ваксината). Когато са заразени 2 седмици след ваксинацията, 20/20 SPF пилета без майчини антитела (MDA-) оцеляват при предизвикателството, докато само 2/20 от бройлерите с MDA (MDA+) оцеляват. Когато са заразени 3 седмици след ваксинацията, всички пилета са защитени от смъртност и излъчването на вируса е намалено както при MDA+, така и при MDA- животните. Средните HAR титри на MDA+ бройлери са по-ниски от титрите на MDA-бройлери:  $4,3 \log_2$  спрямо  $8,6 \log_2$  [23].

В 2 други проучвания върху животни, ваксината HVT-H5 (Vectormune AI, Ceva) е тествана при MDA+ бройлери, но на възраст 4 седмици. В тези проучвания бройлерите са заразени вируси на HPAI H5N1 от клейдове 2.1.3 и 2.2.1, които са по-малко подобни на вируса във ваксината. Установено е, че 70-100% от бройлерите с майчини антитела оцеляват и излъчването на вируса е намалено в сравнение с контролната група [25, 47].

Накратко, горните проучвания с различни ваксини HVT-H5 показват, че интерференцията на MDAs намалява на 3-та и 4-та седмица, вероятно поради намаляването на концентрацията на MDAs. Следователно MDA причиняват забавяне в изграждането на имунния отговор. В допълнение, проучванията показват, че взаимодействието на MDAs с тези HVT-H5 ваксини не е имало ефект върху имунния отговор на по-късна възраст (>4 седмици). Намесата на MDA с векторни ваксини обаче зависи от вектора. Това е илюстрирано в проучването на Бертран и др. (2018). В това проучване не е демонстриран ефект от MDA при ваксиниране с ваксина HVT-H5 (BIAH), но MDA инхибират развитието на имунен отговор към първичната или бустер ваксина на ваксина NDV-H5 [48]. Това може да се дължи на факта, че векторът HVT, който е херпесен вирус, остава в животното за цял живот, докато векторът на NDV не го прави. **В допълнение, прилагането на няколко векторни ваксини от един и същи тип в едно и също животно, но вероятно и в майките, може да намали или забави ефекта на тези ваксини, тъй като в животното вече има антитела срещу този вектор, които могат да инактивират ваксината [49].**

**Следователно е необходимо да се проучи правилно ефектът на MDAs върху ваксината, така че да е ясно дали ваксината може да се прилага както на животните родители, така и на потомството.**

### **Разработване на програма за ваксиниране**

Ваксинацията срещу вируса на нюкасълската болест (NDV) е задължителна в Нидерландия. Освен това, в зависимост от вида на домашните птици, вида на помещението и специфичните проблеми на фермата, домашните птици се ваксинират срещу различни вирусни заболявания: болест на Marek, инфекциозен ларинготрахеит (ILT), болест на Gumboro (IBD), инфекциозен бронхит (IB), анемия по пилетата (болест на сините крила, SAV), вибрационна болест (птичи енцефаломиелит, AE) и дифтерия (кокоша шарка, FP).

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



Освен това има няколко ваксини за защита на домашните птици срещу бактериални агенти като *E. coli*, *Avibacterium paragallinarum* (*Coryza*), *Salmonella* Enteritidis и *Typhimurium* и *Mycoplasma gallisepticum and synoviae*, и паразитната болест *Coccidiosis* [50]. Всички тези ваксини трябва да се прилагат на възрастта, посочена от производителя, а някои ваксинации трябва да се прилагат многократно или последвани от друг тип ваксина, за да се подобри защитата. **За ефективен имунен отговор е важно на едно животно да не се прилагат твърде много ваксини едновременно или в близка последователност, тъй като в противен случай различните ваксини могат да си взаимодействат една с друга, което може да има отрицателно въздействие върху имунния отговор** [51].

Известно е, че различни ваксини се комбинират с други ваксини, например комбинацията от ваксината Vectormune AI и ваксината Rispens [33]. **Поради това е важно да се види дали ваксините, които са ефективни срещу защитата от НРАИ Н5 вируси на инфлуенца по птиците, също могат да бъдат включени в настоящите графици за ваксиниране.** Някои ваксини, като HVT ваксините, могат да се прилагат и *in ovo* (в яйцето).

В допълнение към предизвикателството да не се прилагат твърде много ваксини на животно за един и същ период от време и намесата на майчините антитела, има и друго предизвикателство. **Векторна ваксина от същия тип може да се приложи само веднъж в едно и също животно, тъй като в противен случай в животното вече има антитела и клетъчна защита, които могат да неутрализират ваксината** [52]. При предишна ваксинация с ваксина Н5, антителата, насочени срещу протеина Н5, също могат да намалят ефективността на ваксината.

В Нидерландия вече са регистрирани различни векторни ваксини за други патогени: INNOVAX HVT (ND-IBD, ILT, ND-ILT), VAXXITEK HVT (IBD), Vectormune ND, Vectormune FP (ILT-AE, ILT) и PREVEXXION RN HVT + IBD [50]. **Следователно векторна ваксина срещу НРАИ Н5 вируса не може да се прилага в комбинация със същия вектор на горните HVT, NDV или FPV векторни ваксини.** Въпреки това, за ваксините Vectormune AI и Vectormune ND има литература, че тези ваксини могат да се прилагат едновременно [53, 54]. **Поради това е важно да се разработи програма за ваксиниране, в която ваксината за инфлуенца по птиците да се вписва в програмата за ваксинация за други заболявания,** при което други видове ваксини могат да се използват и за други агенти. Различни програми за ваксиниране могат да бъдат избрани за различните видове и типове домашни птици въз основа на продължителността на живота на животното във връзка с момента, в който ваксината защитава и продължителността на защитата, ролята на животното в сектора, чувствителността към други патогени и ефективността на ваксината.

**При дълголетни домашни птици, т.е. родителски стада кокошки за разплод и кокошки носачки, трябва да се направи избор и за прилагане на бустер.** Бустерът може значително да увеличи и удължи ефективността на ваксинацията.

Kilany и др. (2015) изследват ефекта от бустер след ваксинация с ваксината HVT-N5 (Vectormune AI, Ceva) при еднократен полет с MDA [55]. Ваксината HVT-N5 беше приложена на ден 1 и инактивирана ваксина (RE-5 H5N1, BIAH, Лион, Франция) беше приложена на ден 8. Впоследствие полетата бяха заразени на ден 28 или 35 с НРАИ Н5N1 вирус (A/Chicken/Egypt/128S/2012; клейд 2.2.1). При заразяване на 28-ия ден преживяемостта в бустер групата се увеличава с 10% (от 80% на 90%), а броят на животните, показващи признаци на заболяване, намалява от 80% на 20%. На 35-ия ден от инфекцията, преживяемостта в двете групи, със и без бустер, е 90%, но в групата с бустер само 10% от полетата са били болни, докато това е 90% в групата без бустер [55].

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



В проучването на Hussein и др. (2016 г.) експерименталната ДНК ваксина не предпазва от смъртност след приложение при еднократно пилета и не могат да бъдат измерени титри на HAI.

Въпреки това, когато инактивираната ваксина Volvac AI KV LPAI H5N2 (BIAH) беше приложена на пилета на 10-дневна възраст, 80% от пилетата оцеляха и защитните HAI титри бяха измерени след ваксинацията [56]. Накратко, ефективността на ваксината може да се увеличи след прилагане на бустер и следователно може да предложи допълнителна защита, особено за дълголетни домашни птици. **Ваксина, която вече предлага пълна защита с еднократно приложение, е за предпочитане пред ваксина, която изисква бустер по-късно за оптимална защита през целия живот.**

И накрая, **начинът на прилагане на ваксината** все още определя програмата за ваксиниране. Предпочита се ефикасен метод за масова ваксинация в сектора на птицевъдството, като **приложение чрез спрей или чрез питейна вода**, ако достатъчно животни в стадото получават достатъчно висока доза, или **машинно приложение *in ovo*** (в яйцето). **В момента обаче всички ваксини за защита срещу инфлуенца по птиците все още трябва да се прилагат чрез инжектиране.** Много ваксини вече могат да се прилагат в люпилнята, а векторните ваксини могат евентуално да се прилагат *in ovo*. **Ваксинирането в люпилнята е по-ефективно от ваксинирането в птицефермата.**

### 3. Изучаване на литературата за видовете ваксини

#### 3.1 Въведение

##### *Проучване на литературата*

Направен е общ преглед на научната литература за видовете ваксини, които в момента са в процес на разработване или са налични в търговската мрежа срещу настоящите HPAI H5 вируси. В литературата има много данни за ефективността на експериментални и търговски ваксини срещу различни видове HPAI H5 вируси. HPAI H5 вирусите са класифицирани в така наречените „клеядове“ въз основа на тяхната генетична връзка с H5 [57]. Нови клеядове се създават от еволюцията на вируса. Вирусите HPAI H5, открити в Нидерландия от 2016 г., принадлежат към клеяд 2.3.4.4b [1-3]. Тези вируси са еволюирали от вируса HPAI H5, който циркулира в Нидерландия през 2014 г. и принадлежи към клеяд 2.3.4.4A<sup>1</sup>.

**Голяма част от ваксините, описани в литературата, не са тествани срещу вирус HPAI H5 клеяд а 2.3.4.4b, а срещу H5 вируси от други клеядове.** В този преглед на литературата основно са търсени резултати от проучвания, проведени с HPAI H5 клеяд 2.3.4.4b вируси, тъй като тези резултати са най-информативни при оценката на очакваната ефективност за текущите циркулиращи HPAI H5 вируси на инфлуенца по птиците в Нидерландия. Литературата съдържа малко проучвания за предаване (изследвания, при които се изследва предаването на вируса от заразени животни към контактни животни). Има главно резултати от проучвания за инфекции, при които

<sup>1</sup> Предложена е нова класификация за HPAI H5 вируси от H5 клеяд 2.3.4.4A 58. СЗО, Антигенни и генетични характеристики на зоонотични грипни вируси А и разработване на кандидат-ваксини вируси за готовност за пандемия. март 2021 г., в който те бяха преименувани на клеяд 2.3.4.4с. В този доклад обаче ние запазваме старата конвенция за именуване 59. Lee, E.-K., et al., Характеризиране на нов реасортантен H5N6 високопатогенен вирус на инфлуенца по птиците 2.3.4.4 в Корея, 2017 г. Нововъзникващи микроби и усилвател; инфекции, 2018. 7, 103 DOI: 10.1038/s41426-018-0104-3., тъй като все още се използва главно в (по-старата) литература. Вирусите на HPAI H5 клас 2.3.4.4В продължават да принадлежат към клас 2.3.4.4b в новата класификация.

изкуствена инфекция („предизвикателство“) е приложена на пилета, при които впоследствие са изследвани отделянето на вируса, заболяването и смъртността. Когато не са налични проучвания за предаване, резултатите от проучванията за инфекции, използвани по отношение на параметрите, описващи степента на инфекциозност и симптомите на заболяването, са обобщени.

### 3.2 Видове ваксини

Разработени са различни видове ваксини за защита на домашните птици срещу HPAI H5 вируси. Освен **традиционните инактивирани ваксини**, има няколко технологии, при които се използва общ скелет или вектор за създаване на специфични протеини на HPAI H5 вируса [60, 61]. Следващите параграфи обясняват накратко принципа на различните видове ваксини срещу инфлуенца по птиците. Резултатите от проучванията, които изследват ефективността на ваксината след инфекция с HPAI H5 вируси, са обобщени по вид ваксина. Проучвания с клейд 2.3.4.4b и проучвания за предаване бяха търсени, доколкото е възможно. Предимствата и недостатъците на всеки тип ваксина ще бъдат обяснени за всяка ваксина.

#### 3.2.1 Инактивирани ваксини

Инактивираните ваксини използват оригинален вирус на инфлуенца по птиците, който е обезвреден. Този деактивиран вирус, заедно с адювант, произвежда имунен отговор срещу генетично свързани вируси на инфлуенца по птиците [52]. Адювантите са химически, микробни компоненти или протеини, които са необходими за активиране на имунната система [52]. При тези видове ваксини геномът на вируса на ваксината често се модифицира, за да промени вируса на HPAI във вирус на нископатогенна инфлуенца по птиците (LPAI). Това се прави чрез модифициране на мястото на снаждане на HA протеина. HA протеините могат също да бъдат заменени в тези рекомбинантни вируси, за да се разграничат антителата след ваксинация от антителата, стимулирани след полева инфекция (DIVA) [22].

**Традиционно инактивираните ваксини са типът ваксини, които се използват най-често в световен мащаб.** От 2002-2010 г. 25,2% от домашните птици в света са ваксинирани срещу HPAI инфлуенца по птиците и 95,5% от тези ваксини са инактивирани ваксини (4,5% са векторни ваксини) [62]. Въпреки че този тип ваксина се използва широко, в литературата не са описани проучвания за предаване и само няколко проучвания за инфекции, които тестват ефективността на инактивирани ваксини срещу HPAI H5 вируси от клейд 2.3.4.4b.

В проучването на Kandeil и др. (2018 г.) седем търговски инактивирани ваксини Nobilis Influenza H5N2 (Intervet, Нидерландия), CEVAc Flukem (Ceva, Мексико), Zoetis H5N3 (Zoetis, САЩ), EgyFlu (Harbin Veterinary Research Institute, China), Mefluvac (ME-VAC, Египет), SERA-VAC (Институт за ветеринарни серуми и ваксини, Египет), Reassortant AIV Re-5 (Merial, Китай) и една експериментална ваксина срещу LPAI H5N8, тествана при търговски кокошки носачки Lohmann White с майчини антитела (майчини антитела, MDA+) [63]. На 6-седмична възраст, 4 седмици след интрамускулна ваксинация, пилетата бяха заразени с HPAI H5N8 вирус (A/duck/Egypt/F13666A/2017; clade 2.3.4.4b). Всички пилета, ваксинирани с Re-5 Merial, Zoetis H5N3 и експерименталната ваксина LPAI H5N8, преживяха инфекцията без заболяване. В групите с другите ваксини смъртността е била 60% (Nobilis, ME Flu VAC, SER-VAC) и 80% (CEVAc Flukem, EgyFlu). Само ваксината RE-5 Merial и експерименталната ваксина LPAI H5N8 успяха значително да намалят отделянето на вируса [63].

Три от тези търговски ваксини, H5N1 (Re-5, Merial), H5N2 (CEVAc Flukem, Ceva) и H5N3 (Zoetis H5N3, Zoetis), също са тествани в проучването върху животни от El Moeid,

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



et al. (2021 г.). Един от предизвикателните вируси беше подобен на HPAI H5N8 вируса, използван в проучването на van Kandeil, et al. (2018), но ваксините бяха тествани и срещу друг HPAI H5N8 вирусен клейд 2.3.4.4b (A/chicken/Egypt/18FL6/2018). В това проучване SPF пилета (Specific Pathogen Free) са ваксинирани подкожно на 10-дневна възраст и след това са заразени 2 или 3 седмици след ваксинацията. Нито една от ваксините не може да защити пилетата срещу вируса, когато са заразени 2 седмици след ваксинацията. Когато са заразени 3 седмици след ваксинацията, ваксините H5N1 и H5N3 наистина предпазват от смъртност, причинена от вирусите H5N8 (и в двете групи 1/13 пилета умират), но в групата с ваксина H5N2 9/13 умират от един от вирусите H5N8 (70 %) пилета. В допълнение, имаше отделяне на вируси във всички проучвани групи [64]. В проучването на Ali, et al. (2019 г.) експериментална инактивирана ваксина се оказва успешна [65]. Експерименталната ваксина се състоеше от 3 вируса H5N1, произхождащи от клейдове 2.2.1, 2.2.1.1 и 2.2.1.2, и вируса на нюкасылската болест (NDV). На 2-седмична възраст SPF пилетата бяха ваксинирани подкожно и 4 седмици по-късно те бяха заразени. Ваксината защити 14/15 пилета от смъртност след инфекция с HPAI H5N8 вирус (A/common-coot/EG/CA285/2016; клейд 2.3.4.4b) и излъчването на вируса беше значително намалено в сравнение с неваксинираната контролна група [65].

### Предимства и недостатъци на инактивираните ваксини

По този начин литературата показва, че няколко ваксини са тествани срещу HPAI H5 вируси от клейд 2.3.4.4b, но не са провеждани проучвания за предаване. **Защитата срещу симптомите на заболяването и намаляването на вируса на повечето от тестваните ваксини бяха недостатъчни, така че шансът за предаване на вируса остава.** Антигенното разстояние между инактивираните ваксинални щамове и HPAI H5 вирусите от клейд 2.3.4.4b вероятно е твърде голямо за повечето ваксини. Когато антигенното разстояние се увеличи между инактивирана ваксина и циркулиращия вирус, защитата намалява бързо [19, 20]. Тъй като във ваксината се използват напълно инактивирани вируси, **принципът DIVA не е спасен.** Когато полевият щам има различен NA тип, на тази основа може да се направи серологично разграничение. Вирусите на инфлуенца по птиците обаче могат да се развиват бързо и да обменят генетична информация, поради което тази система не е стабилна за DIVA. **Предимството на този вид ваксина е, че може да се прилага на няколко вида домашни птици,** когато ваксините са регистрирани за тази цел. Недостатъците са, че ваксината трябва да се **прилага чрез инжектиране** [22] на по-възрастни пилета и следователно е по-малко подходяща за приложение в люпилни. Това прави по-трудно ваксинирането на голям брой животни (масово приложение) за кратко време. Може да са **необходими бустерни ваксинации** за оптимален имунен отговор [66]. И накрая, често срещан проблем с този тип ваксина е, че **майчините антитела (MDAs) могат да попречат на изграждането на имунитет след ваксинация** [46]. В момента единствената ваксина, регистрирана в Нидерландия, е инактивираната ваксина Nobilis H5N2 от MSD. Ваксината се основава на вирус LPAI H5N2 от 1986 г., така че вирусът на ваксината е генетично далеч от сегашния вирус HPAI H5N1. В резултат на това защитата на тази ваксина срещу предаване на болести и вируси след инфекция с HPAI H5N1 вирус не се очаква да бъде достатъчна.

### 3.2.2 Протеинови ваксини (субединични ваксини)

Протеинова ваксина съдържа само един или няколко от вирусните протеини, HA, NA или матричен протеин, които активират имунния отговор [67, 68]. Протеинът се експресира в клетки, например посредством бакуловирусната (Baculovirus) експресионна система, и след това се пречиства. Съществуват и други видове ваксини,

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



в които протеините са опаковани в структури, които приличат на вирусни частици, така наречените вирусоподобни частици (VLP) ваксини [69].

Volvac® В.Е.С.Т. AI+ND (Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH)) е налична в търговската мрежа субединична ваксина срещу НРАI Н5 вируси. Генът Н5 във ваксината идва от вирус Н5N1 от клейд 2.3.2 (A/DK/China/E319-2/03). Не са провеждани проучвания за предаване при този тип ваксина с инфекция на вируса Н5 клейд 2.3.4.4b. Въпреки това са проведени проучвания за инфекции, които разглеждат ефективността на ваксината за намаляване на отделянето на вируса, т.е. инфекциозността и ефективността на ваксината за намаляване на симптомите на заболяването. В проучването на Kandeil, et al. (2018), в допълнение към седемте търговски инактивирани ваксини (вижте 3.2.1), Volvac В.Е.С.Т. ваксина, тествана при търговски кокошки носачки Lohmann White (MDA+) [63]. На 6-седмична възраст, 4 седмици след ваксинацията, пилетата бяха заразени с НРАI Н5N8 вирус (A/duck/Egypt/F13666A/2017; clade 2.3.4.4b). След заразяването 80% от пилетата са умрели и е налице излъчване на вируса [63].

Ваксината се оказва по-ефективна в проучването на Sultan, et al. (2019 г.). Те изследват ефективността на тази ваксина срещу НРАI Н5N8 вирус от клейд 2.3.4.4b (A/Common-coot/Egypt/CA285/2016) при мускусни и пекински патици [70]. Патиците за месо, MDA+, бяха ваксинирани веднъж (на възраст 10 дни) или два пъти (на възраст 10 и 28 дни) подкожно и бяха заразени съответно на ден 31 или 49. Контролните патици, 10 от вид, не бяха ваксинирани и 4/10 мускусни патици и 6/10 пекински патици оцеляха от инфекцията. От веднъж ваксинираните патици оцеляха 9/10 мускусни и 10/10 пекински патици. Всички двойно ваксинирани месодайни патици оцеляват след инфекцията. Не се отделя вирус от пекинските патици след еднократна или двойна ваксинация. След еднократна ваксинация мускусните патици все още отделят вирус до 5 дни след заразяването, но това е по-ниска концентрация на вирус от контролната група (която все още отделя вирус до 7 дни след заразяването). След двойна ваксинация мускусните патици също вече не отделят вирус [70].

В литературата са налични различни проучвания върху животни, в които са тествани различни експериментални VLP ваксини срещу НРАI Н5 вируси от клейд 2.3.4.4(b). Tatár kis, et al. (2018) проведоха проучване за предаване при месодайни патици, пекински и мускусни патици, с експериментална VLP ваксина, направена с НА ген, получен от вируса НРАI Н5N8 A/duck/France/161108h/2016 [71]. Месните патици (MDA-) бяха ваксинирани подкожно в деня на излюпване и 3 седмици по-късно или само на 3-седмична възраст. На 6-седмична възраст те са били заразени с НРАI Н5N8 вирус (A/Mulard\_duck/Hungary/59163/2016; clade 2.3.4.4b). В контролната група е имало предаване на вируса между заразените и контактните животни, но не е изчислен репродуктивен номер за ваксинираната група. Въпреки това, не се наблюдава отделяне на вирус или признаци на заболяване при ваксинираните месодайни патици след заразяване (за разлика от всички неваксинирани месодайни патици) [71].

Други проучвания са тествали ефективността на експериментални VLP ваксини за намаляване на отделянето на вируси и проявите на заболяването след инфекция с НРАI Н5 вируси от други 2.3.4.4 клейдове.

Kang et al. (2021) тестваха експериментална VLP ваксина при SPF пилета, заразени с НРАI Н5N8 (клейд 2.3.4.4A) и Н5N6 (clade 2.3.4.4c) [68]. Ваксината, която беше приложена интрамускулно на 5-седмична възраст, защити 100% от пилетата срещу смъртност, когато бяха заразени 3 седмици след ваксинацията и изглежда намали отделянето на вируса (контролните животни вече бяха умрели, така че това не можеше да бъде правилно сравнено) [68].

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



Pushko et al. (2018) тестваха експериментален VLP с H5, H7, H9 и N1 протеини [72]. SPF пилетата са ваксинирани в деня на излюпване и на 21-дневна възраст. Пилетата са били заразени с H5N2 (A/turkey/Minnesota/7172-1/2015; clade 2.3.4.4) или HPAI H7N3 или LPAI H9N2. Всички пилета са преживели инфекция с HPAI H5N2 и H7N3 вирус. Въпреки това, особено в групата, заразена с HPAI H5N2 вирус, се наблюдава отделяне на вируса [72].

Karczynski, et al. (2016) разработиха експериментален VLP с HA протеини от 3 различни HPAI H5N1 вируса (включително клейд 2.3.4.4 вирус) [73]. SPF пилета бяха ваксинирани подкожно на възраст 1 ден и 21 дни и след това заразени на възраст 5 седмици с, наред с други, вируса HPAI H5N8 (A/Gryfalcon/Washington/2014; clade 2.3.4.4A). Всички пилета оцеляват след инфекцията и отделянето на вируси е значително намалено в сравнение с контролната група [73].

### Предимства и недостатъци на субединичните ваксини

Протеиновите ваксини стимулират главно хуморалния имунен отговор [52], но има и доказателства, че се стимулира и клетъчният имунен отговор [26]. Протеиновите ваксини предлагат възможност за комбиниране на множество вирусни протеини във ваксина за активиране на широк имунен отговор [69, 74]. Проведените проучвания върху животни показват, че протеиновите ваксини могат да осигурят защита срещу симптомите на заболяването и отделянето на вируси може да бъде намалено. Проучването на предаването на Tatár kis, et al. (2018) показва, че предаването на вируса на контактни животни при месни патици може да бъде предотвратено с този тип ваксини. Тъй като присъства само част от вируса, антителата, стимулирани от ваксината, могат да бъдат разграничени серологично от антителата на полева инфекция (DIVA). Ваксините, които сега са предназначени за домашни птици, се прилагат чрез инжектиране. В резултат на това масовото приложение е практически възможно само ако ваксините могат да се прилагат чрез инжектиране в деня на излюпване в люпилнята или в края на отглеждането/люпенето (Бел. пр. – не става ясно при превода от холандски). В горните проучвания върху животни, пилетата или месодайните патици са били ваксинирани не само в деня на излюпване, но и на по-късна възраст (подсилени/бустер). В бъдеще тези видове ваксини могат да се прилагат като спрей или чрез питейна вода. Пероралното приложение на противогрипна ваксина (рекомбинантен бакуловирус) е доказано, че е възможно в проучване при мишки на Vasak, et al., (2020) [75]. Протеиновите ваксини могат да се прилагат на няколко вида домашни птици. Протеиновата ваксина може да бъде модифицирана сравнително лесно чрез промяна на HA гена, използван в лабораторията за производство на протеините [52]. В проучването на Kandeil, et al. (2018 г.) и Sultan, et al. (2019 г.) **ваксините са ефективни при пилета и патици с антитела, получени от майката. Това предполага, че майчините антитела може да не повлияят силно на този тип ваксина.**

### 3.2.3 Рекомбинантни векторни ваксини

Векторната ваксина се състои от вектор, непатогенен вирус или бактерия, различни от вируса на инфлуенца по птиците. В този вектор се поставя „вмъкване“ с помощта на рекомбинантна ДНК технология. В случай на ваксина срещу инфлуенца по птиците се използва HA генът, при което мястото на снаждане на HPAI HA гена е модифицирано до LPAI място на снаждане за безопасността на ваксината. След инжектиране на векторната ваксина тялото може да изработи антитела срещу HA гена [22]. Различни вируси могат да се използват като вектори, например HVT, NDV, FPV и херпесния вирус на патешкия ентерит (DEV) [22]. Множество вложки могат да бъдат поставени във вектора. Това е направено например с ваксината INNOVAX HVT ND-IBD от MSD Animal Health (MSD). Тази ваксина предпазва от болестта на Marek чрез HVT вектора и

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



срещу NDV и IBD чрез двете вложки [50]. Все още не са налични търговски векторни ваксини, съдържащи вируса на инфлуенца по птиците, с повече от две вложки. Въпреки това, както бивалентни (срещу два вида патогени), така и тривалентни (срещу 3 вида патогени) ваксини са на пазара за комбинации от други вируси, като Marek, NDV, ILT и IBD [61, 76].

В литературата са описани различни вектори, които са били използвани за ваксина срещу HPAI H5 вируси. Най-често описваните вектори са рекомбинантни HVT ваксини, NDV ваксини и FPV ваксини. Изследванията за всеки вид векторна ваксина са описани по-долу.

### **HVT ваксини**

HVT е непатогенен херпесен вирус при пуйки, класифициран като трети серотип в рамките на вируса, който може да причини болестта на Marek. HVT също не причинява заболяване при пилетата, но активира имунната система срещу болестта на Marek. Херпесните вируси остават в тялото за цял живот. Това означава, че ваксини с HVT или DEV вектор и AIV вложка остават налични за цял живот и следователно могат да осигурят дългосрочна защита срещу вируса на инфлуенца по птиците [77, 78].

Има няколко фармацевтични компании с HVT векторна ваксина с вложка HP H5. Първо, Seva произвежда и продава HVT ваксината „Vectormune AI“ от няколко години в различни страни. Вложката се състои от HP H5N1 вирус A/mute swan/Hungary/4999/2006 (clade 2.2) с място на разцепване, модифицирано до LPAI [79, 80]. Ваксината е регистрирана в САЩ, Египет, Мексико и Бангладеш и др.

Прегледът на Gardin, et al. (2016) показва, че ефективността на тази ваксина вече е подробно изследвана с различни HP H5 вируси както при SPF, така и при търговски кокошки носачки и бройлери [32]. Въпреки това, проучванията, включени в този преглед, не са изследвали ефективността на ваксината Vectormune AI срещу клейд 2.3.4.4b, тъй като този преглед е публикуван преди появата на вирусите от клейд 2.3.4.4b. Има по-скорошни проучвания, които изследват ефективността на ваксината срещу вируси от клейд 2.3.4.4b. Например Palya, et al. (2018) изследват ефективността на ваксината „Vectormune AI“ за намаляване на предаването на вируса както при кокошки носачки, така и при бройлери (MDA-) след заразяване с вируса HPAI H5N8 (A/goose/Hungary/1030/2017; clade 2.3.4.4b) [80]. В това проучване за предаване, 20 животни на група са били заразени и са добавени 20 контактни животни (8 часа след заразяването). Инфекцията е настъпила на 5 седмици (бройлери) и 7 седмици (промишлено отглеждане на кокошки носачки). Ваксината, която беше приложена подкожно в деня на излюпването, даде добра защита срещу симптомите на заболяването, тъй като 100% от отглежданите кокошки носачки и 90% от бройлерите оцеляха от инфекцията (всъщност 100%, тъй като 2-те починали пилета се оказа, че са умрели от травма и не са положителни за AI). В допълнение, за разлика от контролните групи, ваксинираните кокошки носачки и бройлери показват малко или никакво отделяне на вируси от клоаката и не е имало предаване на вируса от заразените животни към контактните животни. Тъй като не може да бъде открита инфекция в контактните животни, репродуктивният номер (R) се оценява като 0. Въпреки това, R на неваксинираните кокошки носачки е 0,69 с доверителен интервал от 0,33-1,44. Тъй като доверителният интервал съдържа 1, не може да се определи дали R наистина е <1 или >1 в контролната група и следователно също беше невъзможно да се определи дали има значителна разлика в броя на възпроизвеждането между контролната група и ваксинална група [80].

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





В друго проучване El-Shall, et al. (2021) тестваха ефективността на ваксината срещу инфекция с HPAI H5N8 вирус (A/chicken/Egypt/Alex-2/2017; clade 2.3.4.4b) при търговски бройлери (MDA+) от 28 или на 35 дни към момента на инфекцията [79].

Както HVT ваксината самостоятелно, така и i.c.m. беше изследвана инактивираната ваксина Mefluvac (ME-VAC, Египет). HVT ваксината е приложена подкожно на 1-дневна възраст, а ваксината Mefluvac интрамускулно на 8-ия ден. При инфектиране на 28-ия ден, HVT ваксината защитава 50% от търговските бройлери срещу смъртност, а пилетата, ваксинирани с HVT+Mefluvac, са 40% защитени срещу смъртност. На 35-дневна възраст това е съответно 80% и 100% и отделянето на вируси е значително намалено в сравнение с контролната група [79]. Въпреки че проучването на Kandeil, et al. (2018) не демонстрира добра защита срещу настоящите HPAI H5 вируси с Mefluvac (вижте 3.2.1), ваксината подобри защитата на HVT „Vectormune AI“.

В друго проучване, изследването на Karczynski, et al. (2017), ваксината Vectormune е тествана срещу два HPAI H5 вируса от clade 2.3.4.4A: A/gyrfalcon/Washington/40188-6/2014 (H5N8) en A/northern pintail/Washington/40964/2014 (H5N2) [81]. На 1-дневна възраст SPF отглежданите кокошки носачки се ваксинират подкожно и след това пилетата се заразяват 4 седмици след ваксинацията. Само 60% от пилетата са оцелели след инфекцията с вируса H5N8 и H5N2. Освен това отделянето на вируси не е значително намалено в сравнение с контролните групи [81].

Второ, литературата съдържа резултати от проучвания за инфекции с различни експериментални HVT ваксини, разработени от Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH) [82-84]. В проучването на Balzli, et al. (2018 г.) 3 експериментални ваксини с различни вложки, всички базирани на H5N2 (A/chicken/Washington/61-9/2014; clade 2.3.4.4A) са тествани за ефективност при намаляване на вируса отделяне и заболяване срещу HPAI H5N2 вирус (A/turkey/Minnesota/12582/2015 clade 2.3.4.4A). Тези 3 ваксини, всички приложени подкожно в деня на излюпване, имат различна степен на успех, тъй като защитата срещу смъртност при SPF кокошки носачки варира от 15% до 100% [82].

Една от 3-те експериментални HVT ваксини по-горе, ваксината, която защитава 100%, беше повторно тествана в проучването на Bertran, et al. (2018) при търговски бройлери. HVT ваксината, отново приложена подкожно в деня на излюпване, отново защитава 100% срещу смъртност при хомоложна HPAI вирусна инфекция 5 седмици след ваксинацията, независимо от наличието/отсъствието на майчини антитела срещу NDV и/или AIV [48]. В проучването на Bertran, et al. (2021 г.) ефективността за намаляване на отделянето на вируси и заболяването на една и съща HVT ваксина е сравнена с ефективността на 3 различни HVT-H5 ваксини с H5 вложки, които са оптимизирани с компютърни модели (наречени COBRA) за широка активност срещу различни HPAI H5N1 вируси. В това изследване при животни, SPF кокошки носачки са били отново заразени с HPAI H5N2 вирус от Минесота и HPAI H5N1 вирус A/Egypt/N04915/2014 (clade 2.2.1). Всички ваксини, приложени подкожно в деня на излюпване, защитават 100% от отглежданите кокошки носачки срещу симптоми на заболяването по време на заразяването, 4 седмици след ваксинацията, и значително намаляват отделянето на вируса. 3-те ваксини COBRA дават по-висок титър на антитела след ваксинация и отглежданите кокошки носачки отделят по-малко вирус след инфекция с вируса HPAI H5N1, отколкото когато е използвана HVT ваксината [83]. Към днешна дата не са публикувани проучвания за тестване на ваксини COBRA за защита срещу вируси HPAI H5 клейд 2.3.4.4b.

И накрая, MSD разполага с HVT ваксина с вложка, която е 99% хомоложна на HPAI H5N1 вирус A/turkey/Turkey/01/05 (clade 2.2). Ваксината е регистрирана и в САЩ. Към днешна дата не са публикувани резултати за ефективността на ваксината срещу вирус

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



от клейд 2.3.4.4b. Reemers, et al. (2021 г.) тестваха ефективността на ваксината за намаляване на отделянето на вируси и симптомите на заболяването срещу 4 НРАI Н5N1 вируси, произхождащи от различен клейд, а именно 2.2.1 и 2.2.1.1. Ваксината се прилага чрез инжектиране на SPF пилета или пилета с майчини антитела. Ваксината защитава 100% срещу смъртност 3 седмици след ваксинацията и отделянето на вируса е намалено [23].

### NDV ваксини

Вирусът на нюкасълска болест (NDV – Newcastle disease virus) принадлежи към вирусите *Paramyxoviridae*. NDV може да се различава по патогенност. Lentогенните щамове причиняват леки до асимптоматични респираторни инфекции при домашни птици, докато велогенните щамове причиняват системни инфекции с висока смъртност. Lentогенните щамове, като LaSota, се използват широко като живи атенюирани ваксини при контрола на NDV при домашни птици. Тези lentогенни щамове могат да се използват и като вектори [24]. Предимството на използването на NDV вектор е, че NDV, подобно на AIV, заразява животното по респираторен път. По този начин векторната ваксина срещу NDV стимулира имунния отговор както локално в дихателните пътища, така и системно. В допълнение, ваксината може да се прилага като спрей или в питейна вода, тъй като NDV се размножава в лигавиците [24].

Има няколко (експериментални) NDV ваксини с вмъкване на НРАI Н5 вирус [24, 85], но няма налична литература, където NDV ваксина е тествана за защита срещу НРАI Н5 вирус, принадлежащ към клейд 2.3.4.4b. Описана е обаче ефективността при намаляване на инфекциозността и заболяването на експериментални ваксини NDV-Н5 срещу НРАI Н5 вируси от клейд 2.3.4.4.

В проучването на Cho, et al. (2018), експериментална ваксина NDV-Н5 (със и без бустер) е приложена интраназално в деня на излюпване на SPF пилета и търговски бройлери (MDA-). Две седмици след ваксинацията, пилетата бяха заразени с НРАI вирус от клейд 2.3.4.4А. Ваксината предпазва от смъртност и отделянето на вируси е намалено в сравнение с неваксинирани контролни животни [86, 87].

В проучването на Ma, et al. (2017 г.) живи и инактивирани експериментални ваксини срещу NDV-Н5 се прилагат интрамускулно, с интервал от 2 седмици, на 2-седмични SPF кокошки носачки. Две седмици след ваксинацията, пилетата бяха заразени с НРАI Н5 вирус от клейд 2.3.4.4. И в двете ваксинирани групи количеството и продължителността на отделянето на вируса е намалено в сравнение с контролната група. В това проучване ваксината NDV-Н5 също е приложена веднъж като спрей. При инфекцията с вируса НРАI Н5N2 са оцелели 18/20 пилета и отделянето на вируса е намалено. **Това показва, че векторна ваксина NDV-Н5 също е потенциално подходяща за масово приложение чрез спрей [87].**

### FPV ваксини

FPV (Fowlpox virus) ваксината TROVAC AI Н5™ (BIAH) е използвана при НРАI и LPAI Н5N2 инфекции в Мексико [22, 88]. Вложката на тази ваксина е НА на A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) [61]. Ефективността на тази ваксина срещу други НРАI Н5 вируси е проучена [89], което показва, че този тип векторна ваксина може да има широка ефикасност. Не са открити проучвания, изследващи ефективността на ваксината срещу Н5 вируси от клейд 2.3.4.4b. В проучването на Karczynski, et al. (2017), където ваксината Vectormune също е тествана, ваксината TROVAC е тествана срещу 2 НРАI Н5 вируса от клейд 2.3.4.4А. Ваксината се прилага подкожно на SPF пилета в деня на излюпване и след това пилетата се заразяват с НРАI Н5N8 вирус или Н5N2 вирус от клейд 2.3.4.4 4 седмици след ваксинацията. След заразяване с вируса НРАI Н5N8, 40% от

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



пилетата оцеляха и 70% от пилетата оцеляха след заразяване с вируса HPAI H5N2. Отделянето на вируса е значително намалено само на 2 дни след инфекцията в сравнение с контролната група [81].

### Предимства и недостатъци на векторните ваксини

Векторните ваксини имат по-широк ефект от традиционните инактивирани ваксини. Това е така, защото векторните ваксини стимулират както хуморалния, така и клетъчния имунен отговор. Клетъчният имунен отговор е имунният отговор от, наред с други неща, цитотоксични Т клетки, които също играят основна роля в имунитета. Поради широкия си ефект, вмъкването на HA във вектора ще трябва да се адаптира към полевия щам по-рядко, отколкото в случая с инактивираните ваксини. Ако е необходимо регулиране, регулирането на вложката е относително лесно [24, 85]. Проучването на Palya et al. (2018) показва, че няма предаване на вируса на контактни животни след прилагане на HVT ваксината Vectormune [80]. В допълнение, няколко проучвания показват, че различни векторни ваксини могат да намалят симптомите на заболяването и отделянето на вируса, когато са заразени с HPAI H5 вируси от клейд 2.3.4.4b. Тъй като ваксините съдържат само HA гена, антителата след ваксинация могат да бъдат разграничени от антителата, причинени от полева инфекция. NDV може да се прилага чрез спрейове, тъй като те могат да се възпроизведат в лигавиците. Ваксини, състоящи се от HVT, DVE и FPV вектор, трябва да се прилагат в люпилнята чрез инжектиране подкожно или *in ovo* (в яйцето) [22, 61]. Следователно масовото приложение е възможно с векторни ваксини, но ваксината трябва да се прилага индивидуално. Този тип ваксина обаче има и недостатъци. В литературата се съобщава, че майчините антитела могат да взаимодействат с векторните ваксини [61]. Намесата при млади животни е потвърдена в проучването на El-Shall, et al. (2021) при бройлери. Това проучване обаче показва също, че на по-късна възраст, 35 дни, имунният отговор е достатъчен, за да предпази от инфекция.

В допълнение, HVT и FPV векторни ваксини не могат да се прилагат на всички видове домашни птици.

В допълнение, прилагането на няколко векторни ваксини от един и същи тип в едно и също животно, но вероятно и в майките поради наличието на майчини антитела, може да намали или забави ефекта на тези ваксини, тъй като антителата срещу този вектор вече са налични в животното [52].

HVT векторни ваксини вече се използват в Нидерландия срещу други болести по домашните птици, като болестта на Marek, IBD, ILT и ND. От 2020 г. на холандския пазар има и FP векторна ваксина с ILT вложка (Vectormune FP ILT, Ceva) [90]. Други видове ваксини също са налични за тези заболявания, но това означава, че съществуващите програми за ваксиниране трябва да бъдат адаптирани, за да могат да използват ваксина HVT-H5 на практика. Поради предписаното приложение *in ovo* или в деня на излюпване, HVT ваксината не може да се използва за ваксиниране на всички съществуващи домашни птици в Нидерландия. **Също така трябва да се очаква, че когато започне ваксинирането с векторна ваксина, някои от животните родители вече ще са били ваксинирани с ваксина със същия тип вектор, което може да повлияе неблагоприятно на ефективността на ваксината в потомството [49].** ]

### 3.2.4 иРНК и ДНК ваксини

иРНК и ДНК ваксините принадлежат към групата на „ваксините на базата на нуклеинова киселина“. Например, иРНК ваксините могат директно да експресират HA протеина, когато той се въведе в клетката. Към днешна дата не са публикувани проучвания, в които mRNA ваксини срещу инфекции с HPAI H5 вируси да са тествани

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



при домашни птици. Наскоро беше тествана ефективността на иРНК ваксини срещу зоонозни грипни вируси при порове (човешки животински модел) и имунния отговор при хора [91, 92]. И двете иРНК ваксини предизвикват добър имунологичен отговор.

Ново развитие в областта на ваксините са самоусилващите (самоумножаващите) се иРНК ваксини. Те използват репликонна система, базирана на друг вирус [93]. Този вирус вече не е в състояние да образува инфекциозни вирусни частици, тъй като част от генома е отстранен. Това е заменено от иРНК, която представлява интерес, така например генът НА на вируса на инфлуенца по птиците.

Скорошно проучване със самоусилваща се иРНК ваксина, базирана на NP протеина, показва, че клетъчен отговор се предизвиква при мишки и че този специфичен отговор също зависи от начина на приложение [94]. Все още не са описани проучвания в литературата, в които самоусилваща се иРНК ваксина да е тествана при домашни птици срещу скорошни НРАI H5 вируси. Въпреки това, в момента се провежда проучване във Франция със самоусилваща се ваксина (Ceva) при патици [95]. Резултатите ще бъдат готови скоро.

ДНК ваксините използват ДНК експресионни плазмиди, за да произведат иРНК в клетките на животните, като в крайна сметка произвеждат НА протеина. Генът НА може да бъде оригинален или модифициран [52]. Няма налични данни от литературата, в които ефикасността на ДНК ваксина е тествана срещу НРАI H5 вирус от клейд 2.3.4.4b или друг вирус от клейд 2.3.4.4. Ефективността на този тип ваксина вече беше демонстрирана през 2007 г. от Jiang и др. (2007). SPF пилетата се ваксинират интрамускулно с различни плазмиди, съдържащи H5 НА гена на 3-седмична възраст. Четири седмици след ваксинацията, пилетата бяха заразени с НРАI H5N1 вирус (A/goose/Guangdong/1/96). Два от плазмидите предпазват 100% от пилетата срещу симптоми на заболяване и отделяне на вируси. Това проучване също демонстрира дългосрочна защита от ДНК ваксината. Когато пилетата са били заразени с вируса НРАI H5N1 (A/goose/Guangdong/1/96) на 50-та седмица след ваксинацията, 8/8 пилета са оцелели след инфекцията и не е открито излъчване на вирус. При заразяване с друг НРАI H5N1 вирус (A/duck/Shanghai/16/04), 1/8 пилета отделят вирус и умират. Останалите 7 пилета не отделят никакъв вирус и оцеляват след инфекцията [96].

През 2008 г. Rao, et al., тестваха ефективността на моновалентни и тривалентни експериментални H5 ДНК ваксини при SPF кокошки носачки [97]. Пилетата се ваксинират в деня на излюпване, 3 и/или 6 седмици чрез интрамускулно приложение, подкожно приложение или интрадермално приложение (със система за инжектиране под налягане). Впоследствие, една седмица след последната ваксинация, пилетата бяха заразени с вирус H5N1 (A/Vietnam/1203/04). Всички пилета, независимо от начина на приложение или честотата, са преживели инфекцията след прилагане на тривалентната ваксина и не е доказано отделяне на вируса. Когато ваксината съдържа по-ниска доза плазмиди, не се отделя вирус до концентрация от 5 µg. При доза от 5 µg интрадермалното приложение се оказва по-ефективно от интрамускулното, тъй като при 5 µg 8/8 пилета оцеляват при интрадермално приложение, докато след интрамускулно приложение оцеляват 6/8 пилета. При по-високи дози от плазмидите няма разлика в преживяемостта между различните начини на приложение [97].

### **Предимства и недостатъци на иРНК и ДНК ваксините**

иРНК и ДНК ваксините стимулират както хуморалния, така и клетъчния имунен отговор [22, 98] и могат да бъдат проектирани като многовалентни, така че в допълнение към имунния отговор срещу НА може да бъде предизвикан и имунен отговор срещу други вирусни протеини [97]. В резултат на това те могат да имат широк ефект.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



**Защитата срещу симптомите на заболяването, намаляването на отделянето на вируса, предотвратяването на предаването на вируса на контактни животни и ефектът при наличието на майчини антитела на тези видове ваксини все още не са демонстрирани при домашни птици срещу HPAI H5 вирус от клейд 2.3. 4.4 в литературата, но ваксините имат потенциал. Ваксините не се състоят от пълен вирус, така че DIVA е възможна. В допълнение, иРНК и ДНК ваксините могат да бъдат относително лесно адаптирани към нов вирус [99] и ваксината може да се използва при всички видове домашни птици. Различни проучвания върху животни показват, че бустерът след прилагане на ДНК ваксина активира по-добър имунен отговор [56, 100, 101]. Въпреки това, че бустер след ДНК ваксина не винаги е необходим за защита на сравнително млади животни, е илюстрирано от проучването на Jiang, et al. При по-ниски дози от ваксината бустерът е от съществено значение за осигуряване на необходимата защита [96]. иРНК и ДНК ваксините са относително скъпи и бустерът прави този тип ваксина относително по-скъп [22], така че ако е необходим бустер, това би било недостатък.**

иРНК ваксините, самоумножаващите се иРНК ваксини и ДНК ваксините се прилагат главно чрез инжектиране. Съобщава се обаче също за интрадермално приложение (както в Roa, et al. (2008) [97]) и орално приложение [102] на ДНК ваксини. Необходими са допълнителни изследвания, за да се определи дали тези пътища на приложение са толкова ефективни, колкото приложението чрез инжекция. Ако ваксината може да се приложи еднократно в деня на излюпване или в края на отглеждането чрез инжектиране или перорално приложение, например, е възможно масово приложение.

### **3.2.5 Живи атенюирани ваксини**

Тези ваксини, както подсказва името, съдържат живи атенюирани вируси на LPAI. Вирусните щамове могат да мутират, което води до високопатогенни вируси на инфлуенца по птиците [22]. Живите атенюирани ваксини се използват при домашни птици за други заболявания, но не се препоръчват от Световната организация за здравеопазване на животните (WOAH) за борба с високопатогенната инфлуенца по птиците [10].

**В момента Европейската комисия работи върху законодателна поправка, която да направи възможно ваксинирането срещу, наред с други неща, високопатогенен инфлуенца по птиците. В приложение XIII се посочва, че не е разрешено използването на живи атенюирани ваксини [12].**

### **3.3 Заключение от Проучване на литературата**

Литературата съдържа няколко проучвания върху животни, които са тествали ефективността на различни ваксини срещу вируси HPAI H5 клейд 2.3.4.4b. Има само няколко проучвания за предаване, в които е изследвана ефективността на ваксината за намаляване на предаването на вируса. Повечето проучвания върху животни, които са проведени, са проучвания за инфекции, при които е тествана ефективността на ваксината за намаляване на отделянето на вируси, т.е. инфекциозността и намаляването на симптомите на заболяването. За да се изследва ефективността на ваксината за намаляване на предаването на вируса след инфекция с вирус HPAI H5 клейд 2.3.4.4b, провеждането на проучване за предаване е от съществено значение. Освен това е важно да се проучи допълнително до каква степен (нивото и разпределението на титрите на HAR или други имунни параметри в група животни) са добри мерки за защита не само за отделни животни, но особено за защита на ваксинирано стадо срещу предаване на

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

вируси. Това беше основата за дизайна на изследването върху животни, описано в следващата глава.

## 4 ИЗСЛЕДВАНЕ ВЪРХУ ЖИВОТНИ

### 4.1 Въведение

Въз основа на условията, определени в глава 2 и проучването на литературата в глава 3, са идентифицирани най-подходящите видове ваксини. Впоследствие е направена връзка с ветеринарни фармацевтични компании в Европа и Северна Америка, които може да са разработили подходящи ваксини с надеждно качество. По време на интервютата беше зададен въпрос дали са проведени допълнителни (за предаване) изследвания, които все още не са описани в литературата. Освен това е проучено дали новите кандидати за ваксина са в напреднал стадий на развитие, но все още не са публикувани в литературата. Фармацевтичните компании бяха помолени да покажат непубликувани резултати от тестове на кандидат-ваксините във видео разговори, в които присъстваха няколко изследователи. Накрая, фармацевтичните компании бяха попитани дали желаят да участват в това проучване за ваксина и дали ваксината може да бъде доставена навреме за проучването.

Въз основа на литературата и дискусиите с фармацевтичните компании са избрани три ваксини, които могат да бъдат ефективни срещу текущия вирус HPAI H5N1 клейд 2.3.4.4b и които могат да бъдат подходящи за защита на домашните птици в Нидерландия. При извършването на този избор бяха взети предвид следните точки:

- Има индикации за намаляване на излъчването и предаването на вируса срещу настоящите HPAI H5 вируси (клейд 2.3.4.4b), въз основа на литературата или дискусиите (и показаните резултати от тестове) с фармацевтичната компания.

- Ваксината вече е на пазара на други места по света или е в напреднал етап на разработка, така че подходяща ваксина може бързо да бъде внедрена в холандския птицевъден сектор.

- Трябва да е проведено поне едно проучване за безопасност на ваксината.

- Ваксината отговаря на принципа DIVA.

- Предимство е, ако освен пилетата, с ваксината могат да бъдат защитени и други домашни птици и ако ефективността вече е тествана при наличие на майчини антитела.

- За предпочитане е да проучим различни видове ваксини

Таблицата по-долу, Таблица 1, предоставя преглед на трите избрани ваксини и техните характеристики. Става въпрос за две векторни ваксини, HVT-H5 ваксините на Ceva Sante Animale (Ceva) и Boehringer Ingelheim (BIAH) и ДНК H5 ваксина на Huvepharma (HP). Все още не е публикувана литература за ваксината DNA H5, но проучванията, проведени от производителя, са обещаващи. В допълнение, тази ваксина може да се прилага и на патици.

Ваксината Nobilis H5N2 от MSD Animal Health (MSD) беше тествана четвърта, тъй като в момента е единствената ваксина, регистрирана в Нидерландия. Така че в това проучване са тествани общо четири ваксини.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**Таблица 1 Преглед на избраните ваксини в изследването при животни**

| Фармацевт. продукт | Вид ваксина | Вид птици | Приложение | Ваксинален вирус | HPAI H5 клейд | Антигенно разстояние до текущия HPAI H5N1 вирус |
|--------------------|-------------|-----------|------------|------------------|---------------|---|
|--------------------|-------------|-----------|------------|------------------|---------------|---|

**Tabel 1** *Overzicht van de geselecteerde vaccins in de dierstudie*

| Farmaceut                   | Type vaccin                            | Pluimvee soorten      | Toe-diening      | Vaccin virus                              | HPAI H5 clade | Antigene afstand tot huidige HPAI H5N1 virus <sup>a</sup> |
|-----------------------------|--|-----------------------|------------------|---|---------------|---|
| Ceva                        | HVT-H5 (Vectormune®)                   | Kip, kalkoen          | In ovo, injectie | A/mute_swan/Hungary/4999/2006_H5N1        | 2.2           | 5,75  |
| Boehringer Ingelheim (BIAH) | HVT-H5 (COBRA)                         | Kip, kalkoen          | In ovo, injectie | Met computermodellen geoptimaliseerd_H5N1 | 2.3.2         | 4,97  |
| Huvepharma (HP)             | DNA H5                                 | Pluimvee              | Injectie         | A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014_H5N8  | 2.3.4.4A      | 2,68  |
| MSD Animal Health (MSD)     | Geïnactiveerd virus (Nobilis® AI H5N2) | Pluimvee <sup>b</sup> | Injectie         | A/duck/Potsdam/1402-6/1986_H5N2           | LPAI H5       | 5,71  |

<sup>a</sup>De antigene afstand is bepaald volgens de 27 AA methode gepubliceerd door Peeters, et al. (2017) [20].

<sup>b</sup>Geregistreerd voor kip, maar geïnactiveerde vaccins zouden ook in andere pluimveesoorten werkzaam moeten zijn.

26 | Wageningen Bioveterinary Research Report

*a Антигенното разстояние се определя съгласно метода 27 AA, публикуван от Peeters, et al. (2017) [20].*

*В Регистрирани за пилета, но инактивираните ваксини трябва да са ефективни и при други видове домашни птици.*

*Kip – Пиле*

*kalkoen – пуйка*

*Pluimvee – Домашни птици*

Антигенните разстояния между ваксините и настоящия вирус HPAI H5N1 са определени въз основа на метода 27 AA, публикуван от Peeters, et al. (2017) [20] и са показани в таблица 1. Според този метод ваксината Nobilis, която се основава на инактивиран вирус LPAI H5N2 от 1986 г., антигенно разстояние от 5,71 до сегашния вирус HPAI H5N1. Предишно проучване показва, че след прилагане на инактивирана ваксина е необходим HAI титър от поне 3 (8 HAU), за да се предотврати предаването на вируса [19]. На теория това би означавало, че при антигенно разстояние от 5,71 до вируса, трябва да се индуцира титър от най-малко 8,71 в животното от ваксината Nobilis. Това е висок титър, който вероятно няма да бъде постигнат при достатъчен брой животни в стадо, ако ваксината се използва на полето. Въпреки че в много случаи ефективността на ваксината е свързана с генетичното сходство между вируса на ваксината и вируса на полето, има изключения. Предишни изследвания показват, че генетичните и антигенните разстояния не винаги си съответстват/са свързани [20]. Поради това е ценно тази ваксина да се включи в това проучване върху животни.

Понастоящем ваксината Nobilis е регистрирана за пилета, но инактивираните ваксини трябва да са ефективни и при други видове домашни птици. Основен недостатък на ваксината Nobilis е, че не отговаря на принципа DIVA.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



Избраните HVT-H5 ваксини от Ceва и ВІАН също имат сравнително голямо антигенно разстояние до текущия НРАІ Н5N1 вирус, а именно 5,75 и 4,97 съответно. Въпреки това се очаква тези „модерни“ видове ваксини да предизвикат и клетъчен имунен отговор и антителата може да са по-малко важни за защитата на животните.

HVT ваксината на ВІАН съдържа оптимизиран за компютърен модел Н5 ген (COBRA), който трябва да позволи на ваксината да има широка активност срещу различни НРАІ Н5 щамове.

Антигенното разстояние между настоящия вирус НРАІ Н5N1 и ДНК ваксината на НР е най-малкото от трите ваксини, а именно 2,68. В допълнение, ДНК ваксините, като HVT-H5 ваксините, предизвикват клетъчен имунен отговор. Трите избрани съвременни ваксини HVT-H5 и ДНК съдържат само Н5 гена на вируса на инфлуенца по птиците, което означава, че отговарят на принципа DIVA. Приложението на всички ваксини е чрез индивидуално инжектиране на животните, HVT ваксините могат да се прилагат на еднократни пилета или *in ovo*.

**Ваксините HVT-H5 могат да се използват при пилета и пуйки, но не са подходящи за употреба при други видове домашни птици, като патици или гъски. ДНК ваксината може да се използва при всички видове домашни птици. HVT ваксините са генетично модифицирани организми (ГМО).**

## 4.2 Материали и методи

### 4.2.1 Разрешителни

Изследването върху животни е извършено съгласно указанията на Директива 2010/63/ЕС. Изследването върху животни е одобрено от Централния комитет за експерименти с животни (CCD) (заявление за разрешение AVD2210020173706; експеримент AVI-22-50-018). **HVT ваксините са генетично модифицирани организми (ГМО).** Ето защо са поискани разрешения от Службата за ГМО за извършване на изследването върху животни и за анализ на пробите в лабораторията (IG 22-080, IG 22-081, IG 22-097).

### 4.2.2 Местоположение и настаняване

Изследването върху животни е проведено в съоръженията за животни на WBVR в Лелистад. Пилетата бяха настанени при условия на сигурност BSL2 през първите 7 седмици. На 7-седмична възраст пилетата бяха преместени в други помещения, където можеха да се аклиматизират за една седмица при условия BSL2. От момента на заразяването, на 8-седмична възраст, пилетата са настанени в тези помещения при условия BSL3. Различните групи пилета бяха настанени в две еднакви помещения по време на заразяването, като групите бяха разделени в различни боксове със затворени стени, така че пилетата от различните групи да не могат да имат пряк контакт. Кошарите са с подова повърхност от приблизително 2,3 m<sup>2</sup> и подът е покрит с дървени стърготини. В помещенията изкуственото осветление симулира естествен ритъм ден-нощ (13 часа светлина; 11 часа тъмнина). Отглеждането и грижите за пилетата бяха съобразени със специфичните нужди на възрастта. Температурата в помещението беше постепенно намалена и през първите седмици пилетата разполагаха с нагревателна лампа. По време на цялото проучване пилетата разполагаха с кацалка и парче юта като обогатяване на клетката. Пилетата имаха неограничен достъп до храна и вода. В това изследване върху животни беше направен опит да се направи контактната структура възможно най-сравнима с практиката. Въпреки това, поради мощното изсмукване на въздуха, корпуса под отрицателно налягане, малките групи в помещението и относително ниската плътност на броя на пилетата на квадратен метър, това няма да бъде напълно сравнимо.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](http://mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056





### 4.2.3 Животни и групи

Това изследване е извършено при 185 кокошки носачки Lohmann Brown Classic, които са доставени на WBVR в деня на излюпването. Пилетата в люпилнята не са ваксинирани. Майките на пилетата са били на възраст 38 седмици и са имали стандартните ваксинации срещу болестта на Марек в деня на излюпване, включително ваксинация с HVT ваксина. В допълнение към различни други стандартни ваксинации по време на периода на отглеждане, майките в производствения период са били ваксинирани многократно срещу инфекциозен бронхит и вируса на нюкасълската болест (нито една от които не е векторна ваксина).

В това изследване на предаването имаше 6 групи, които бяха изследвани в два комплекта. Така от всяка група имаше група А и група Б (Таблица 2). Тази стратегия беше избрана, за да се демонстрира значителна разлика с най-малък брой животни [103]. Всяка група се състоеше от 10 пилета. На група, 5 пилета бяха заразени с вирус (заразни животни) и 5 пилета бяха поставени при заразените животни 8 часа след заразяването, без да са били заразени предварително (контактни животни). Предаването на вируса може да се изчисли, като се използва времето на заразяване и инфекциозния статус на контактните животни, заедно със инфекциозния статус на заразените животни.

**Таблица 2 Изследването за предаване е проведено с 6 групи. Всяка група се състоеше от 10 пилета: 5 заразни животни и 5 контактни животни. Групите бяха тествани в два екземпляра (група А и В). За всяка група са показани денят на приложение на ваксината, начинът на приложение и дозата на ваксината, както е предписано от фармацевтичната компания.**

| Група                           | Заразни          | Контактни        | Дневно приложение | Начин на приложение | Доза                           |
|---------------------------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|--------------------------------|
| Groep                           | Infectiedieren   | Contactdieren    | Dag toediening    | Toedienings-Route   | Dosis                          |
| 1 Controle A en B               | 5 ongevaccineerd | 5 ongevaccineerd | N.v.t.            | N.v.t.              | N.v.t.                         |
| 2 HVT-H5 Ceva A en B            | 5 gevaccineerd   | 5 gevaccineerd   | 0                 | Subcutaan           | 100%                           |
| 3 HVT-H5 BIAH A en B            | 5 gevaccineerd   | 5 gevaccineerd   | 0                 | Subcutaan           | 100%                           |
| 4 DNA HP A en B                 | 5 gevaccineerd   | 5 gevaccineerd   | 14                | Intramusculair      | 100%                           |
| 5 Nobilis MSD A en B            | 5 gevaccineerd   | 5 gevaccineerd   | 8                 | Subcutaan           | 100%                           |
| 6 Nobilis MSD titergroep A en B | 5 gevaccineerd   | 5 ongevaccineerd | 8                 | Subcutaan           | 19 kippen 75%<br>19 kippen 50% |

*ongevaccineerd* – неваксинирани

*gevaccineerd* – 5 ваксинирани

*kippen* – пилета

В контролната група пилетата не са ваксинирани, за да може ефектът от ваксините да се сравни с неваксинираните пилета. В групи от 2 до 5, както инфекциозните животни, така и контактните животни бяха ваксинирани с ваксините, които ще бъдат изследвани: група 2 HVT-H5 ваксина Vectormune® от Ceva, група 3 HVT-H5 COBRA ваксина от BI, група 4 ДНК ваксина от HP и група 5 инактивираната ваксина Nobilis® AI H5N2 от MSD. За групи от 1 до 5 бяха включени 5 резервни животни на група в случай на отпадане преди заразяване.

Пилетата от група 6 бяха ваксинирани с ваксината Nobilis точно както група 5, но с по-ниска доза ваксина. Група 6 първоначално беше добавена като допълнителна контролна група, тъй като последните проучвания в WBVR показаха, че предаването на вируса на H5 клейд 2.3.4.4b вируси не е лесно за измерване. WBVR проведе

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



експерименти за предаване с 6-седмични SPF пилета с HPAI H5N8 и H5N6 вируси от индексните случаи на птици през 2014, 2016 и 2017 г. в Нидерландия [29]. Това показва, че пилетата са умрели много бързо след инокулиране с дози от 106 EID50 (в рамките на 24-72 часа) от заразения вирус, което почти не води до предаване. При вирусна доза от 104 EID50, само 4% от заразените животни се заразяват и при доза от 105 EID50, 50% от заразените животни се заразяват. Определянето на точната вирусна доза следователно е предизвикателство за новите вируси HPAI клейд 2.3.4.4b и може също да зависи от възрастта и вида на пилетата. По този начин, в неваксинираната контролна група, всички инокулирани животни могат да умрат, преди да е настъпило предаване. За да се преодолее това, допълнителна контролна група беше ваксинирана с ниска доза от инактивираната ваксина и само пилета с титър на антигеном <23 (както е описано по-рано в Sitaris, et al., (2016) [19]) бяха избрани за предаване проучване. Очакванията бяха, че тези животни ще живеят по-дълго, защото ще бъдат частично защитени от предаване на вируса. Следователно тази група може да служи като контролна група за сравняване на намаляването на предаването във ваксинираните групи, в случай че не може да бъде измерено предаване в контролната група. За да има налични в дубликат 5+5 пилета с HPAI титър <23 по време на заразяването, 19 пилета бяха ваксинирани с 50% от предписаната доза и 19 пилета бяха ваксинирани със 75% от предписаната доза от ваксината Nobilis. Впоследствие, титърът на антигена на тези пилета срещу вируса на ваксината (хомолог) и вируса на провокацията (хетеролог) се определя на 42-ия ден от изследването. Десет пилета (2x5) с титър 0 (но с висок хомоложен титър), 1 или 2 срещу заразения вирус бяха избрани и използвани като инфекциозни животни в изследването с животни. Десетте контактни животни плюс 2 резервни животни в тази група не са ваксинирани. Въз основа на предишни проучвания се очакваше, че намаляването на предаването на вируса във ваксинираните стада се дължи главно на намаленото отделяне на вируси от заразените животни. Въпреки това, по време на проучването се оказа, че предаването на вируса може да бъде измерено в контролната група, докато защита както срещу предаване на вируса, така и срещу симптоми на заболяването се наблюдава в допълнителната контролна група, въпреки селекцията на инфекциозни животни въз основа на ниски титри. Следователно данните от тази група вече са добавени към отчета като група, в която са избрани титри; титърната група на Nobilis MSD. С данните от тази група може да се получи първо впечатление за това как височината и разпределението на HPAI титрите са свързани с предаването на вируса. С това може да се изследва за инактивираната ваксина Nobilis дали (нивото и разпределението на) титрите на HPAI също са добри „корелати на защитата“ в областта на предотвратяването на предаването на вируса. Това може да предостави информация, която може да се използва за проектиране на последващи проучвания, но също и с други видове ваксини.

За да се получи кръв преди началото на експеримента, т.е. в момента на влизане, в изследването бяха включени 10 пилета. С помощта на тази кръв може да се потвърди липсата на майчини антигени срещу AIV.

#### 4.2.4 Предизвикване с вирус

Вирусът за предизвикване, вирусът, с който пилетата бяха заразени на 8-а седмица, е вирус HPAI H5N1 клейд 2.3.4.4b, който беше открит през 2021 г. във ферма за кокошки носачки в Нидерландия. Пълната последователност на генома е определена по време на откриването и може да бъде намерена в базата данни на GISAID под номер EPI\_ISL\_6101848. Отнася се за A/chicken/Netherlands/21038165-006010/2021\_H5N1\_PB2\_2021-11-07\_LUTJEGAST. Този вирус е избран, защото представлява вирусите, които циркулират в Нидерландия и Европа от 2020 г. Провокационният вирус беше получен чрез култивиране на вируса в два пасажа в

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



ембрионални яйца на възраст 9-11 дни, свободни от специфичен патоген (SPF). Впоследствие целият геном беше повторно секвениран, за да се изключат преминаващи мутации. След това вирусът се титрира трикратно, за да се определи средната инфекциозна доза за яйца (EID50). Вирусът се разрежда в стерилен триптозно-фосфатен буфер 95% до разреждане от  $10^7$  /ml инокулум. След предизвикване вирусният титър на инокулума беше проверен и той наистина беше  $10^7$ /ml.

#### 4.2.5 Ваксини

Ваксините са приложени по предписание на фармацевтичната компания. Ваксината е приложена само веднъж. Таблица 2 дава за всяка ваксина деня на приложение, начина на приложение и дозата на ваксините, които са тествани.

**Приложение 2** съдържа повече подробности за ваксините, като условия на съхранение, данни за партидите и др.

#### 4.2.6 Дизайн на опита

Експерименталният дизайн на изследването на предаването е показан схематично на Фигура 1. В деня на излюпването пилетата са доставени на WBVR. Пилетата бяха разделени на случаен принцип в 6 групи и всяка група получи цвят на гърба с маркер. На десет пилета е взета кръв под упойка. Тази кръв беше тествана в NP-ELISA, за да се потвърди липсата на майчини антитела срещу AIV.

HVT ваксините след това се прилагат подкожно на групите "HVT-H5 Ceva" и "HVT-H5 VI".

На 8-ия ден инактивираната ваксина Nobilis беше приложена подкожно в различни дози на групите с „Nobilis MSD“ и „Nobilis MSD titre group“, с изключение на контактните животни от титърната група.

На 14-ия ден ДНК ваксината беше приложена интрамускулно на групата "ДНК НР".

На 21-ия ден всички животни получиха номер на крилото за идентификация. В допълнение, на ден 21 беше взета кръв за определяне на титъра на антитялото (хуморален имунен отговор) чрез HAR. Това се повтаря на ден 42. На базата на измерения титър на антитела на ден 42, заразените животни бяха избрани в "Nobilis MSD titre group". Неподбраните животни са евтаназирани.

На 49-ия ден всички пилета бяха преместени в новата къща и произволно разделени на групи А и В. Последва аклиматизация за една седмица. На ден 56, денят на заразяването, или 0 дни след заразяването (dpi), резервните животни бяха евтаназирани. След това контактните животни бяха временно отделени от заразените животни, така че контактните животни да не са заразени с вируса чрез контакт с инокулума.

Заразените животни бяха инфектирани интраназално с 0,1 ml от вируса, така че всяко животно получи  $10^6$  EID50 HPAI H5N1 вирус. След 8 часа контактните животни бяха върнати при инфекциозните животни. През първата седмица от всички животни ежедневно се взимат тампон-проби от гърлото и клоаката, за да се определи отделянето на вируса. Тампон-пробите се събират през ден (9, 11, 13 dpi) през втората седмица и на всеки четири дни (17 и 21 dpi) през третата седмица. В края на изследването за предаване на всички животни е взета кръв под седация.

Ежедневни инспекции и грижи за животните се извършват по време на цялото изследване. Ако по време на проверката се наблюдават леки до тежки симптоми на инфекция, същият ден се извършва допълнителна проверка. Отбелязват се всички

Red     Amber     Green     White

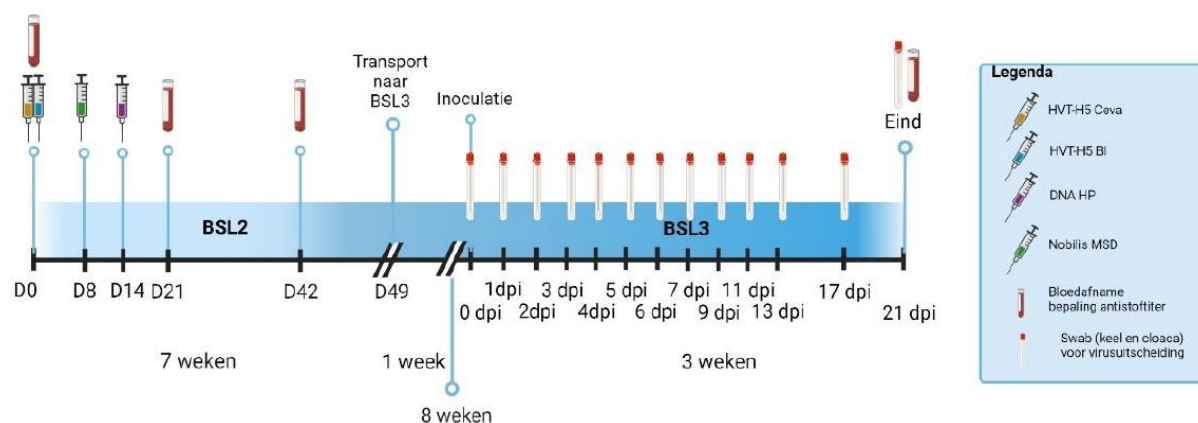
гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



симптоми на заболяването. Пилетата бяха хуманно евтаназирани, когато достигнаха крайната точка на експеримента, както е предварително определено.



**Фигура 1 Проучване на предаване на тестов дизайн**

*BSL: Ниво на биосигурност; D: ден; Dpi: дни след заразяването.*

Ефективността на различните ваксини за защита срещу предаване на вируси беше основният параметър за отчитане на проучването. Отговорът на антитялото след ваксинация и предизвикване се определя за всички групи. Освен това беше оценена ефективността на ваксината за намаляване на заболяемостта и смъртността. Накрая, данните бяха използвани, за да се изследва дали титрите на HAI са добри корелати на защитата по отношение на предаването на вируса за групите, които са получили ваксината Nobilis.

#### 4.2.7 NP ELISA

NP-ELISA е вътрешнофирмен ELISA на WBVR, който открива антитела на вируси на инфлуенца по птиците в серума. Серумът е течността, останала, когато кръвта се съсирва и съсирекът се отстранява. NP-ELISA е насочен към един от единадесетте вирусни протеини, а именно нуклеокапсидния протеин (NP) на вируса на инфлуенца по птиците и методът е описан по-рано [104]. NP-ELISA се използва два пъти в това изследване. Първо, кръвта, взета от 10-те пилета, се проверява за отсъствие на майчини антитела срещу AI преди началото на изследването. Второ, кръвта, събрана в последния ден от изследването, се тества в NP-ELISA. Ако се открият антитела с NP-ELISA, това е резултат от инфекция с вируса HPAI H5N1, тъй като трите съвременни ваксини съдържат само гена HA. Това не се отнася за ваксината Nobilis, тъй като този инактивиран вирус също съдържа NP гена, така че антитела срещу NP протеина ще присъстват след ваксинацията. Следователно след ваксиниране с Nobilis вече не е възможно да се прави разлика между ваксинирани и заразени животни на базата на NP-ELISA (без принцип DIVA). Контактните животни в „групата с титри на Nobilis MSD“ не са ваксинирани, така че при тези животни положителен резултат от NP-ELISA наистина означава инфекция.

#### 4.2.8 HAI

Количеството антитела, стимулирани от поствакциналния хуморален имунен отговор, може да се определи количествено чрез теста за инхибиране на хемагутинацията (HAI). HAI използва хемагутиниращите свойства на вируса на инфлуенца по птиците, който причинява слепване на червените кръвни клетки. Ако антителата в серума се свържат с вируса в теста, слепването на червените кръвни клетки се предотвратява. Чрез тестване на серума в серия от разреждания може да се определи количеството на HA-специфичните антитела (титъра) в кръвта. Методът на HAI е

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



описан в Наръчника на WOAH [105]. Всички серуми преди инфекцията (ден 21 и 42) и след инфекцията (ден 77) се тестват в HAR. HAR се извършва с различни антигени (вируси). Първо, серумите на ваксинираните групи бяха тествани с антиген, тясно свързан с H5 на ваксината (хомоложен антиген). За групата Nobilis шамът на ваксината е използван като антиген, докато за другата група на ваксината са използвани вируси, които са тясно свързани с щама на ваксината (почти хомоложни). В допълнение, всички серуми бяха тествани срещу вируса HPAI H5N1 (хетероложен антиген), използван за инфекция. Всички тестове бяха извършени в два екземпляра и след това резултатите от двата теста бяха осреднени за анализ.

#### 4.2.9 M PCR

За определяне на отделянето на вируса се вземат натривки от гърлото и клоаката. След вземане тампоните незабавно се поставят в 2 ml триптозно фосфатен буфер и се замразяват при  $-80^{\circ}\text{C}$  до обработка. След размразяване, РНК се изолира с MagNA Pure 96 и РНК се тества в PCR за откриване на грипния М ген (M-PCR), както е описано по-рано [106]. Калибрационна крива се включва във всеки PCR цикъл, за да се определи количеството на вируса и по този начин да се определи титърът на екскретирания вирус. Тъй като границата на откриване на PCR е около титър 1,7, стойности  $<1,7$  се считат за отрицателни.

#### 4.2.10 Статистически анализи

##### Предаване на вируси: изчисляване на репродуктивния номер

За да се определи ефективността на ваксината, беше изследвано предаването на вируса от заразените животни към контактните животни. Предаването на вируса в стадото се изразява с репродуктивния номер (R). Числото на възпроизвеждане беше изчислено съгласно метода на „крайния размер“, както е описано по-рано в De Jong и Kimman (1994) [107] и „анализа на данни от интервали“, както е описано във Velthuis, et al., (2007) [108]. Подгрупи А и В са включени като отделни групи за тези анализи. При метода на окончателния размер (FS), R се изчислява въз основа на броя на пилетата, които са (или са били) заразени в края на експеримента, като се има предвид общият брой пилета в изходната ситуация, броят на контактните животни и броят на заразените животни. Този метод зависи от по-малко предположения от „интервалния анализ на данните“ [108]. Въпреки това, тъй като методът FS не взема под внимание продължителността на инфекцията, R0 може да бъде подценен [108] и методът FS се използва само в това проучване в подкрепа на анализа на интервалните данни. С интервалния анализ на данните R се изчислява, като се използва скоростта на предаване на ден (параметър на скоростта на предаване,  $\beta$ ).  $\beta$  представлява броя на новите инфекции, причинени от едно животно в напълно възприемчивата популация за един ден. Чрез изчисляване на R с помощта на  $\beta$  ( $R = \beta \times$  среден инфекциозен период), „интервалният анализ на данните“ взема предвид продължителността на инфекциозния период на заразено пиле. Това е важно, тъй като инфекциозният период на ваксинираните пилета е по-дълъг, тъй като те не умират от заразата. „Интервалният анализ на данните“ се извършва с GLM, където броят на случаите (C)/броят на контактните животни (S) се приема като зависима променлива и броят на заразените животни (I)/общият брой животни (N) като отместване [108]. Това дава оценка и дисперсията на  $\ln(\beta)$ . В допълнение, за всеки отделен тип инфектиран индивид (висок или нисък титър) се определя продължителността на инфекциозния период (T) и от това очакването и дисперсията на  $\ln(T)$ . След това оценката на R се определя от уравнението  $\ln(R) = \ln(\beta) + \ln(T)$  и дисперсията на  $\ln(R)$  е  $\text{var}(\ln(\beta)) + \text{var}(\ln(T))$  за изчисляване на доверителния интервал [19].

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



## Отделяне на вируси

В допълнение към определянето на предаването на вируса са изследвани и други параметри на ефективността на ваксината, включително отделянето на вируса, измерено чрез тампонни проби от гърлото и клоаката. Отделянето на вируса предоставя информация за възможната заразност на заразено животно и следователно също е свързано с предаването на вируса и може да бъде свързано с тежестта на симптомите на заболяването. Излъчването на вируса беше анализирано с R (софтуерен пакет R версия 4.2.2). Първо, вероятността от отделяне на вируса (отделяне/без отделяне) се изчислява с помощта на логистичен регресионен модел. Значимостта по отношение на контролната група се определя с помощта на точния тест на Fisher. Точният метод беше използван за изчисляване на 95% доверителен интервал (CI) за контролната група. Използването на точния метод беше необходимо, тъй като всички контролни животни бяха отделили вирус. Впоследствие беше използван линеен модел, за да се изчисли колко вирус е екскретиран общо в различните групи, така наречената средна „площ под кривата“ (AUC в  $\log 10$ ). В допълнение, продължителността на излъчване на вируса беше сравнена между различните групи, използвайки модела на пропорционалната опасност на Кокс.

## Корелати на защитата

Въпреки че титрите на H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> са добри корелати на защитата за инактивирани ваксинални вируси, това може да е по-малко при векторните ваксини и иРНК/ДНК ваксините, тъй като тези ваксини предизвикват както хуморален, така и клетъчен имуноен отговор. Хуморалният имуноен отговор на тези ваксини може да бъде по-нисък след ваксиниране, отколкото след ваксиниране с инактивирани ваксини, но може да защити домашните птици чрез предизвикания клетъчен имуноен отговор. Простите модели за изчисляване на ефективността на ваксината предполагат, че всички ваксинирани пилета са еднакво защитени. Методът на Sitaras, et al. (2016) отчита антигенната разлика между ваксината и полевия вирус и разликата в имунния отговор на различните пилета в експериментална група [19]. Статията на Sitaras, et al., показва, че за изследвания H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> вирус (A/turkey/Turkey/1/2005) 83,5% от пилетата трябва да имат H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> титър  $\geq 3$  спрямо полевия вирус, така че  $R < 1$ .

Извършен е анализ, за да се проучи дали (разпределението на) титрите на H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> в това проучване са добри корелати на защитата за инактивираната ваксина Nobilis. В това проучване върху животни ефектът от имунния отговор е изчислен на базата на три групи: контролната група, „групата с Nobilis MSD“ и „групата с титър на Nobilis MSD“. Хомоложните H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> титри на тези групи бяха наречени високи или ниски ( $\leq 0, \leq 1, \leq 4, \leq 4,5$  и  $\leq 5$ ) в анализа въз основа на различни гранични стойности. За всички тези гранични стойности бяха изчислени  $\beta$ s и продължителността на инфекциозния период за пилетата с ниски и високи титри на H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>. Има четири  $\beta$  за тези два типа индивиди, определени от четирите възможни пътя на предаване:  $\beta_{hh} \frac{S_h I_h}{N}, \beta_{hl} \frac{S_l I_h}{N}, \beta_{lh} \frac{S_h I_l}{N}, \beta_{ll} \frac{S_l I_l}{N}$ . Всички тези четири различни параметъра могат да бъдат оценени от GLM с cloglog [19].

След това се изчислява R за двете групи (високо/ниско). Впоследствие беше изчислен процентът на пилетата, които трябва да имат титър, по-висок от граничната стойност, за да се получи  $R < 1$  в група. Накрая, този процент беше тестван за група, тъй като от наблюденията беше ясно дали е имало предаване на вируса или не. Като контрола беше извършен анализ на чувствителността с GLM с връзка „запушване“ и компенсация за броя на заразените индивиди [19].

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



## 4.3 Резултати

### 4.3.1 Предаване на вирус: изчисляване на репродуктивно число

Основната цел на това изследване на предаването на вируси е да се изследва ефективността на ваксината за намаляване или предотвратяване на предаването на вируса, т.е. дали е  $R < 1$  във ваксинираните групи. За всички групи, с изключение на „титърните групи на Nobilis MSD“, числото на възпроизвеждане беше изчислено с помощта на метода FS и „метода на интервалните данни“ (Таблица 3).

В неваксинираната контролна група имаше ефективно предаване на вируса между заразените и контактните животни, тъй като  $R$ , определен чрез метода на интервалните данни, беше 3,64 (95% CI 1,89-6,99).

**Ваксините HVT-H5 от Ceва и от BIAN** значително намаляват предаването на вируса в сравнение с неваксинираната контролна група с изчислен репродуктивен брой 0 (95% CI 0-0,70) и за двете групи по метода на FS.

Не е доказано значително намаляване на предаването на вируса в сравнение с контролната група за ДНК ваксината и ваксината Nobilis. Репродуктивното число за ДНК ваксината по метода FS е 1,89 (95% CI 0,55-5,22), а за ваксината Nobilis 1,48 (95% CI 0,30-3,44). За ваксината Nobilis скоростта на предаване на ден (параметър за скорост на предаване,  $\beta$ ) е значително по-ниска, отколкото в контролната група, което означава, че ваксината инхибира предаването на вируса, но не достатъчно, за да достигне  $R < 1$ . Резултатите показват също, че  $R < 1$  не е значим, тъй като в една от групите на Nobilis, „Nobilis MSD група В“, не е наблюдавано предаване на вирус, докато предаването на вируса е предотвратено в „Nobilis MSD група А“.  $R$  не е изчислен за „титърна група на Nobilis MSD“, тъй като контактните животни от тази група не са били ваксинирани и следователно не можете да говорите за  $R$  за хомогенна група и тази група не е сравнима с другите групи.

Резултатите показват, че и двете HVT-H5 ваксини намаляват  $R$  значително под 1 и че по този начин предаването на вируса между пилета може да бъде предотвратено в този експеримент с животни.

Както за ДНК ваксината, така и за ваксината Nobilis, изчисленото число на репродукция не е значително под 1 (вижте таблица 3 по-долу). Предаването на вируси беше предотвратено в една от двете групи Nobilis, но не и в групите с „ДНК НР“.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**Таблица 3 Скорост на предаване за ден (параметър за скорост на предаване,  $\beta$ ) и число на възпроизвеждане (R) според метода на FS и метода на интервалните данни на различните групи.**

| Група                           | Параметър на скоростта на предаване $\beta$ (ден-1) средно (95% CI)         | Номер на възпроизвеждане (R)               |                                  |
|---------------------------------|---|--|----------------------------------|
| Groep                           | Transmissie rate parameter $\beta$ (dag <sup>-1</sup> ) gemiddelde (95% BI) | Interval data methode' gemiddelde (95% BI) | 'FS-methode' gemiddelde (95% BI) |
| 1 Controle A en B               | 1,13 (0,60-2,13)  | 3,64 (1,89-6,99)                           | NA                               |
| 2 HVT-H5 Ceva A en B            | 0 (0-NA) <sup>a</sup>   | 0 (0-NA)                                   | 0 (0-0,70) <sup>a</sup>          |
| 3 HVT-H5 BIAH A en B            | 0 (0-NA) <sup>a</sup>   | 0 (0-NA)                                   | 0 (0-0,70) <sup>a</sup>          |
| 4 DNA HP A en B                 | 0,47 (0,24-0,95)  | 2,15 (1,03-4,50)                           | 1,89 (0,55-5,22)                 |
| 5 Nobilis MSD A en B            | 0,21 (0,09-0,50) <sup>a</sup>   | 0,92 (0,37-2,27)                           | 1,48 (0,30-3,44)                 |
| 6 Nobilis MSD titergroep A en B | NA <sup>b</sup>   | NA <sup>b</sup>                            | NA <sup>b</sup>                  |

*a* Значително в сравнение с контролната група.

*b* За тази група не са определени репродуктивно число и  $\beta$ , тъй като контактните животни в тази група не са ваксинирани и следователно не може да се говори за R за хомогенна група.

NA: „неприложимо“ (не е приложимо); BI: доверителен интервал

#### 4.3.2 Имунен отговор след ваксинация

От кръвта, взета от 10-те пилета преди началото на изследването, NP-ELISA показва, че пилетата нямат майчини антитела срещу AIV. Кръвта, взета на 21 и 42 ден, т.е. преди заразяването, се изследва в HAR за определяне на титъра на антителата след ваксинацията. Резултатите от HAR са показани на Фигура 2. На Фигура 2 титрите на HAR са изчислени отделно за заразените и контактните животни и резервните животни не са включени. В текста са групирани ваксинираните заразни, контактни и резервни животни.

На 21-ия ден всички групи вече имат няколко пилета с хомоложни и хетероложни титри, с изключение на групата „ДНК HP“, където има само едно пиле с хомоложен титър и нито едно от пилетата няма хетероложен титър.

Всичките 25 пилета, ваксинирани с ваксинацията HVT-H5 на Ceva, имат хомоложни титри (среден титър 4,53 (95% CI 2,23-6,82)).

От пилетата, ваксинирани с ваксината BIAH HVT-H5, 22/25 имат хомоложен титър (среден титър 2,73 (95% CI 0-6,62)).

В Nobilis MSD, 13/25 пилета имат хомоложен титър (среден титър 2,12 (95% CI 0-6,32)). В „титърната група на Nobilis MSD“ 19 от 37 ваксинирани пилета имат хомоложен титър (среден титър 2,16 (95% CI 0-6,59)).

На 42-ия ден както хомоложните, така и хетероложните титри на групите с ваксина са по-високи, отколкото на 21-ия ден. Във всички групи, с изключение на ДНК HP, титрите на антителата срещу хомоложния антиген са значително по-високи, отколкото в контролната група. Всички пилета в групата HVT-H5 Ceva имат хомоложен титър (среден титър 7,68 (95% CI 5,91-9,44)), а 6/25 пилета имат хетероложен титър. От

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

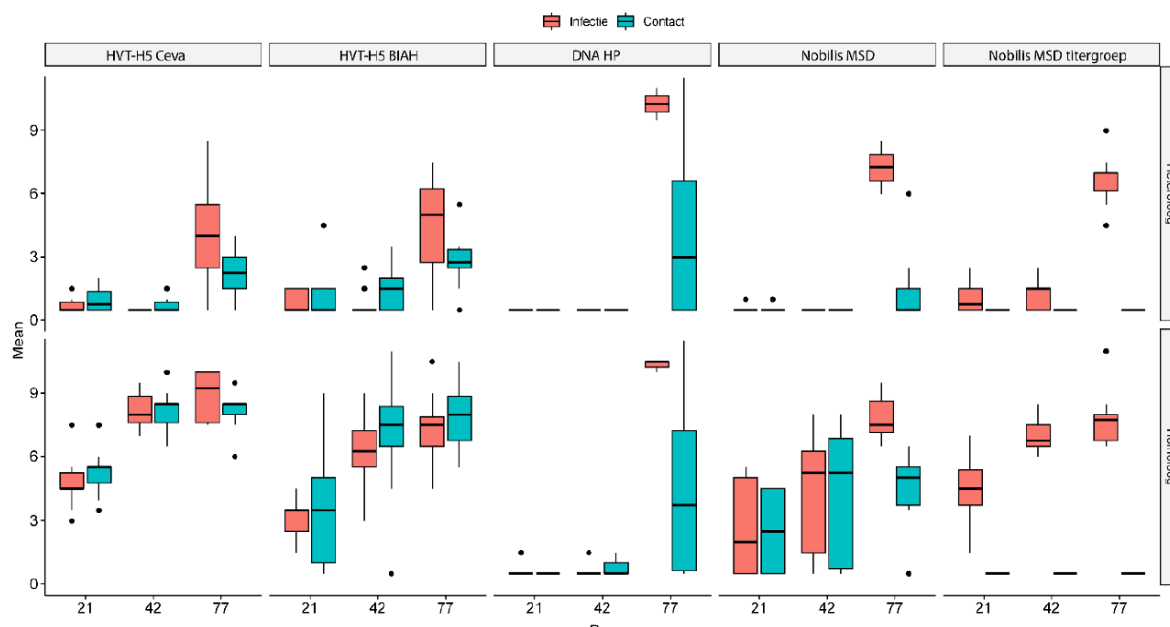
гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056





пилетата, ваксинирани с ваксината HVT-H5 BIAH, всички с изключение на 1 контактното животно имат хомоложен титър (среден титър 6,05 (95% CI 1,36-10,74)), а 11/25 пилета имат хетероложен титър. От пилетата, ваксинирани с HP ДНК ваксината, 6/25 животни имат хомоложен титър (среден титър 0,25 (95% CI 0-1,06)). От пилетата, които са получили пълната доза ваксина Nobilis, 72% (18/25) пилета имат хомоложен титър (среден титър 3,80 (95% CI 0-9,50)). В групата за избор на титри 12-те контактни животни (и резервни животни) не са ваксинирани и следователно нямат титър. От ваксинираните пилета 23/35 пилета имат хомоложен титър (среден титър 3,99 (95% CI 0-10,37)), а 6/35 имат хетероложен титър. От животните с хетероложен титър 0 (но с висок хомоложен титър), 1 или 2, бяха избрани десет инфекциозни животни. В „DNA HP“ и „Nobilis MSD“ не е направена селекция за титър и така относително голям брой пилета са заразени, за които не може да бъде измерен титър на антитела в HAR на ден 42. Това е възможно обяснение защо има предаването на вируса в тези групи е настъпило от заразените към контактните животни.

Отговорът на антитялото след инфекция, на 77-ия ден, се обсъжда допълнително в раздел 4.3.4.



**Фигура 2 Титърът на HAR на инфекциозните и контактните животни от различните групи. Кръвта, взета преди инфекцията (на дни 21 и 42) и след инфекцията (ден 77) беше тествана в HAR срещу антиген, тясно свързан с вируса на ваксината (хомолог) и настоящия вирус на HPAI H5N1 (хетеролог).**

### 4.3.3 Защита срещу симптоми след инфекция

За да се оцени ефективността на ваксините за намаляване на симптомите на заболяването, моментът, в който пилето е умряло или е достигнало хуманната крайна точка (евтаназирано е), е отбелязан за всяко пиле. Смъртността, настъпила в групите, е показана в „криви на оцеляване“ (Фигура 3), а признаците на заболяване, които са наблюдавани, са обобщени в Таблица 4. В контролната група всички заразени животни както от групата А, така и от групата В са умрели в рамките на 3 и съответно 4 дни. умрели след заразяване. Смъртността на контактните животни също се наблюдава от ден 4 и в крайна сметка всички животни, с изключение на едно контактното животно, умряха. От етична гледна точка контактното животно е евтаназирано 18 дни след заразяването,

Red Amber Green White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

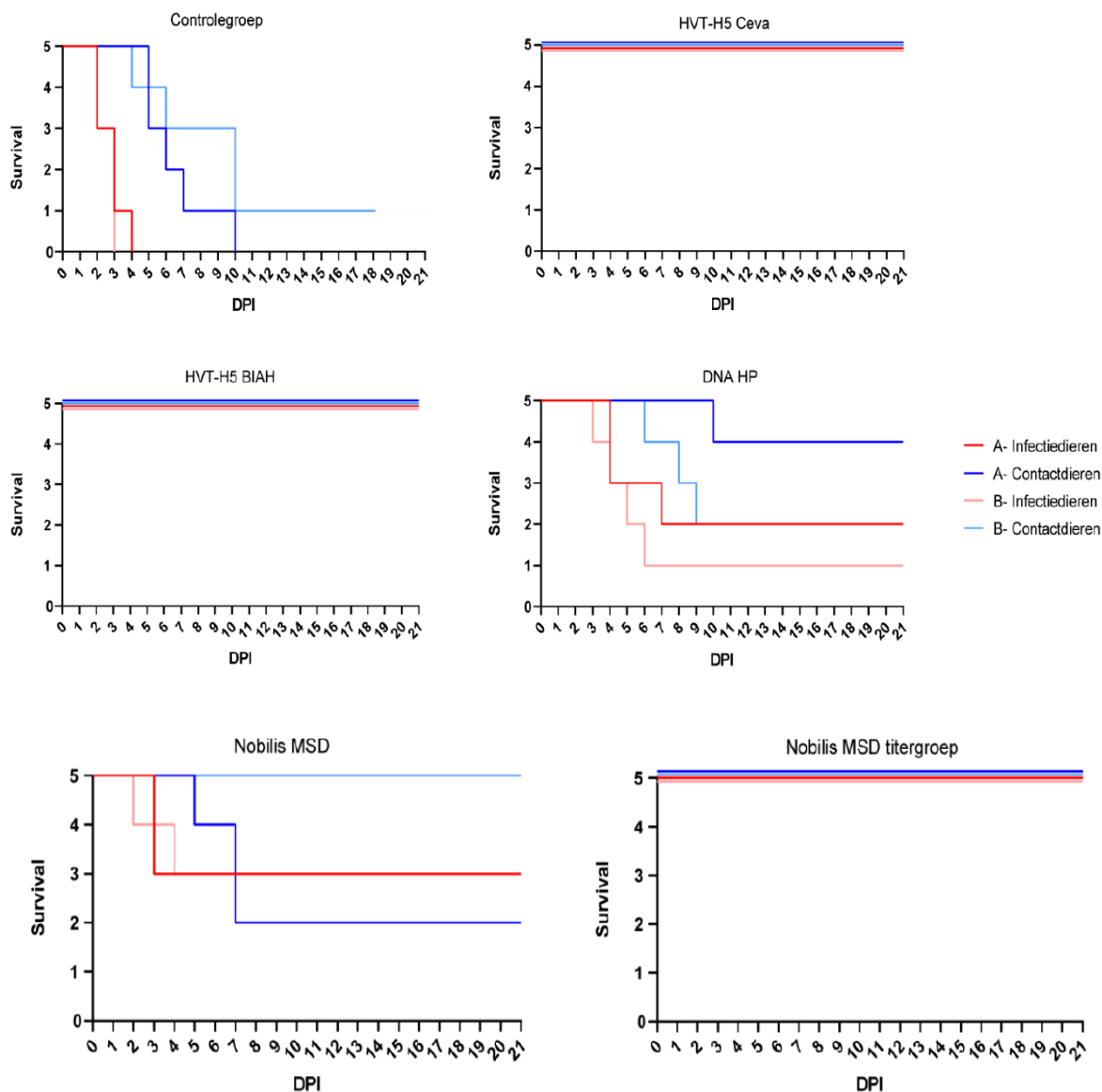
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



тъй като самотното настъпване причинява дистрес и не е уместно за проучването пилето да се проследява по-дълго. При 9/10 пилета, пилетата са били апатични или лежащи за 1 до 2 дни преди смъртта или евтаназията. По времето преди евтаназията, тежка депресия е отбелязана при 5 пилета, от които това е придружено от треперене при 2 пилета. Две пилета имаха нарушен баланс и 1 пиле имаше потрепвания на главата.

В контролната група Б симптомите на заболяването са сравними. Две кокошки бяха намерени мъртви, без първо да бъдат забелязани признаци на заболяване. Другите 7 пилета бяха апатични 1-2 дни и лежаха. По време на евтаназията при 2 пилета се наблюдава тежка депресия в комбинация с нарушено равновесие. Контактното животно, което е евтаназизирано 18 дни след заразяването, е хранено в продължение на 1 ден, но иначе не са наблюдавани признаци на заболяване.



**Фигура 3** Крива на оцеляване на шестте групи. Групите А и В са групирани заедно в една фигура. DPI: дни след заразяването.

Всички пилета, които са получили HVT-H5 от Ceva или BIAH, са преживели инфекцията, без да се разболеят.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☐ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



ДНК ваксината на НР не е ефективна за намаляване на заболяемостта и смъртността. В група А умряха 3 заразени животни и 1 контактно. В група Б 4 заразени животни и 3 контактни животни умряха след заразяване. В група А не са наблюдавани симптоми на заболяване при 5 пилета, 3 от които са контактни животни. Две кокошки са открити мъртви, без първо да са показали симптоми. Други две пилета бяха лежащи и апатични за 1 до 2 дни, преди да умрат или да бъдат евтаназирани. Едно инфекциозно животно внезапно стана апатично 7 дни след заразяването, беше лежащо и показва признаци на парализа. На 7-ия ден след заразяването, 1 от контактните животни беше лежащо, но на следващия ден не бяха наблюдавани повече симптоми на заболяването при това пиле.

В група В на "ДНК НР" 2/10 пилета не са се разболели. Седем пилета престояха един ден и бяха апатични до много апатични, преди да бъдат намерени мъртви или евтаназирани. Шест пилета показаха тежка депресия при евтаназия и 1 пиле имаше необичайно придвижване. Друго пиле нямаше апетит и имаше посинели крака. Едно заразено животно беше апатично и лежащо от 4 до 9 дни след заразяването, но не умря и беше евтаназизирано преждевременно.

**Таблица 4 Броят на болните животни за група и продължителността, през която са наблюдавани признаци на заболяване за група**

| Groep                    | Ziek/<br>totaal | I/C    | DPI |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------------|-----------------|--------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                          |                 |        | 0   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Controle A               | 10/10           | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Controle B               | 10/10           | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| HVT-H5 Ceva A            | 0/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| HVT-H5 Ceva B            | 0/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| HVT-H5 BIAH A            | 0/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| HVT-H5 BIAH B            | 0/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA HP A                 | 5/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| DNA HP B                 | 8/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Nobilis MSD A            | 6/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Nobilis MSD B            | 5/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Nobilis MSD titergroep A | 1/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| Nobilis MSD titergroep B | 0/10            | I<br>C |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |

**Червено:** симптоми на болестта при заразените животни, **синьо:** симптоми на болестта при контактните животни; **черно:** всички животни от групата са умрели. **DPI:** дни след инокулацията.

В групата „Nobilis MSD“ 2 заразени животни умряха както в група А, така и в група Б. В група А са умрели 3 контактни животни, докато в група Б няма умрели контактни животни. В група А 4 пилета, включително 2 контактни животни, не са се разболели. Пет пилета лежаха 1 до 2 дни и бяха (много) апатични, преди да умрат или да бъдат евтаназирани. Три от тези пилета показаха тежка депресия при евтаназията. Едно пиле беше апатично и лежащо от 6 до 10 дни след заразяването, но след това не бяха наблюдавани признаци на заболяване. В група В симптомите на заболяването се наблюдават само при заразените животни. Едно пиле беше лежащо и апатично, преди да бъде намерено мъртво. Едно друго пиле е намерено мъртво без забелязани предишни

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



симптоми. Три пилета бяха апатични за 1 или 2 дни, но след това се възстановиха. В групата Nobilis, където селекцията е направена на базата на „титърна група Nobilis MSD“, всички заразени и контактни животни и в двете групи А и В са оцелели след инфекцията. В група А, 1 заразено животно беше апатично и лежачо 7 дни след заразяването, но не бяха наблюдавани други признаци на заболяване. В група В всички животни останаха здрави.

Следователно и двете HVT-H5 ваксини са били много ефективни за намаляване на заболяемостта и смъртността в експеримента с животни, докато заболяемостта и смъртността все още се наблюдават след ваксиниране с ДНК ваксината и ваксината Nobilis (100% доза) след заразяване с HPAI H5N1 вируса.

#### 4.3.4 Брой заразени пилета в експеримента с животни

На възраст от 8 седмици вирусът HPAI H5N1 беше приложен на пилетата. Три седмици по-късно, в последния ден от изследването, ден 77, беше взета кръв. Тази кръв е тествана в NP-ELISA и H5 HAR. Тези резултати предоставят информация за броя на пилетата, които са били заразени и впоследствие са произвели антитела (Фигура 4а). Серологичните тестове предоставят информация само за пилетата, които са били все още живи в последния ден от изследването. В групите с HVT 50% от заразените животни (2 до 3 пилета) са развили антитела в резултат на инфекция, тъй като те са положителни в NP-ELISA. Въпреки това, контактните животни от групите с HVT ваксина са отрицателни при NP-ELISA, така че не е настъпило предаване на вирус от заразените животни на контактните животни. В групите с „ДНК НР“ 3 контактни животни са положителни в NP-ELISA (1 в група А и 2 в група В). Това показва, че е станало предаване на тези контактни животни.

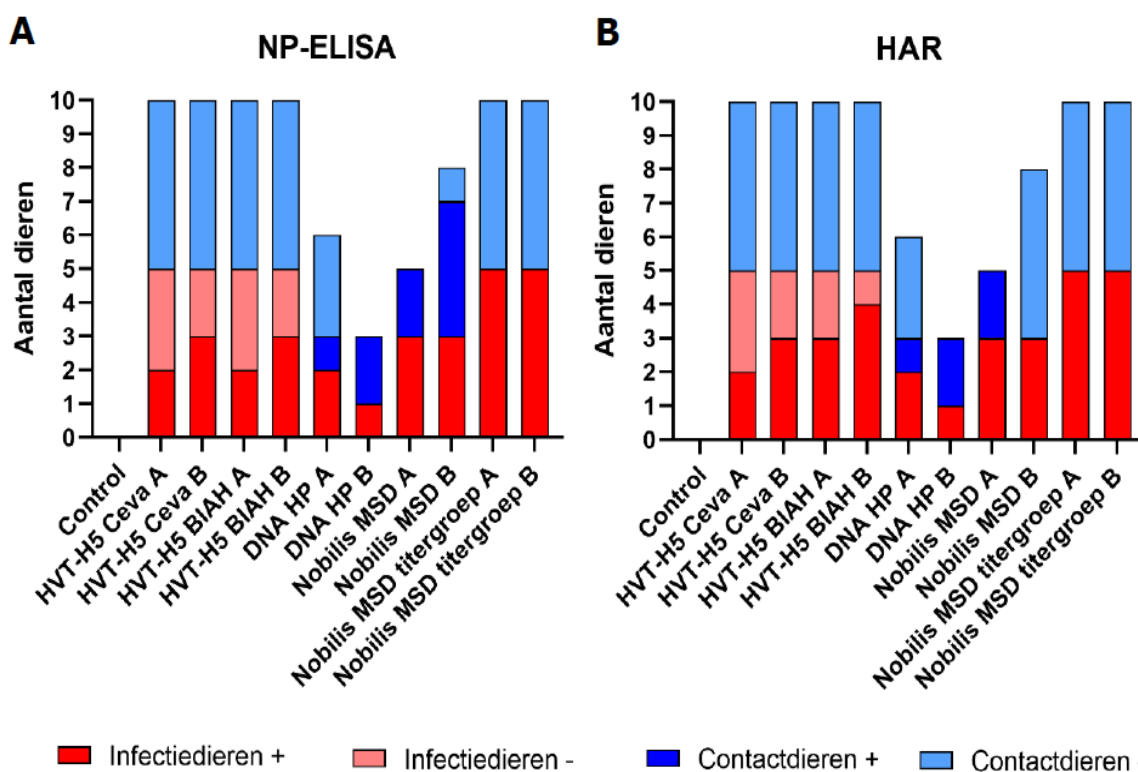
Пилетата от "Nobilis MSD" са ваксинирани с ваксината Nobilis, която съдържа NP протеина. Следователно се очаква всички животни да бъдат положителни в NP-ELISA. Едно контактено животно от група В е отрицателно при NP-ELISA. Това животно също е отрицателно в HAR и следователно не произвежда никакви антитела след ваксинацията. В групата с титри на Nobilis MSD, всички заразени животни са, както се очаква след ваксинацията, положителни в NP-ELISA. Контактните животни от тази група не са ваксинирани и пилетата са отрицателни в NP-ELISA, което показва, че не е настъпило предаване на вируса от заразените животни към контактните животни.

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**Фигура 4 Броят на пилетата, които са претърпели инфекцията въз основа на серологията, извършена върху кръвта, събрана в последния ден от изследването (ден 77). А) Резултатите от NP-ELISA. Положителен резултат означава, че пилетата са имали инфекция, с изключение на пилетата от „Nobilis MSD“ и заразените животни от „Nobilis MSD titre group“. Тези пилета са ваксинирани с ваксината Nobilis, която съдържа NP протеина, така че не може да се прави разлика между ваксинация и предишна инфекция. В) Резултатите от HAR. Положителните пилета имат повишение на кръвния титър на ден 77 с  $\geq 3$  в сравнение с ден 42 срещу хетероложния антиген (провокационния вирус).**

Титрите на HAR са по-високи след инфекцията (ден 77), отколкото преди инфекцията (ден 42), както е показано на фигура 2. На ден 77 групата HVT-H5 Ceva има среден хомоложен титър от 8,03 (95% CI 5,92 -10,13) и среден хетероложен титър от 2,65 (95% CI 0-7,10).

Пилетата, ваксинирани с ваксината HVT-H5 BIAN, имат среден хомоложен титър 7,15 (95% CI 4,08-10,22), а 18/20 пилета имат среден хетероложен титър 3,13 (95% CI 0-7,14).

От пилетата, ваксинирани с HP ДНК ваксината, 6/9 животни имат хомоложен титър (среден титър 6,00 (95% CI 0-14,76)) и същите животни също имат хетероложен титър (среден титър 5,83 (95% CI 0-14,86)). Средният хомоложен титър се е повишил рязко от ден 42.

От пилетата, които са получили пълната доза от ваксината Nobilis, средният хомоложен титър е 5,46 (95% CI 0,85-10,08), а хетероложният титър е 3,69 (95% CI 0-10,13). В групата за селекция на титъра пилетата имат среден хомоложен титър 7,30 (95% CI 4,76-9,84) и среден хетероложен титър 6,20 (95% CI 3,91-8,49). Броят животни с хетероложен HAR титър  $\geq 3$  срещу HPAI H5N1 предизвикан вирус в последния ден от изследването в сравнение с ден 42 е показан на Фигура 4b. Само в групата ДНК HP A,

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☐ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



ДНК NP B' и 'Nobilis MSD A' контактните животни имат хетероложен HAR титър  $\geq 3$  увеличение.

Отделянето на вируса от всяко пиле се измерва чрез редовно вземане на тампонни проби от гърлото и клоаката и тестването им в М-PCR. Въз основа на вирусната екскреция, определена с М-PCR, може да се определи и броят на заразените инфекциозни и контактни животни. Фигура 5 показва броя на заразените пилета въз основа на излъчването на вируса от гърлото и/или клоаката.

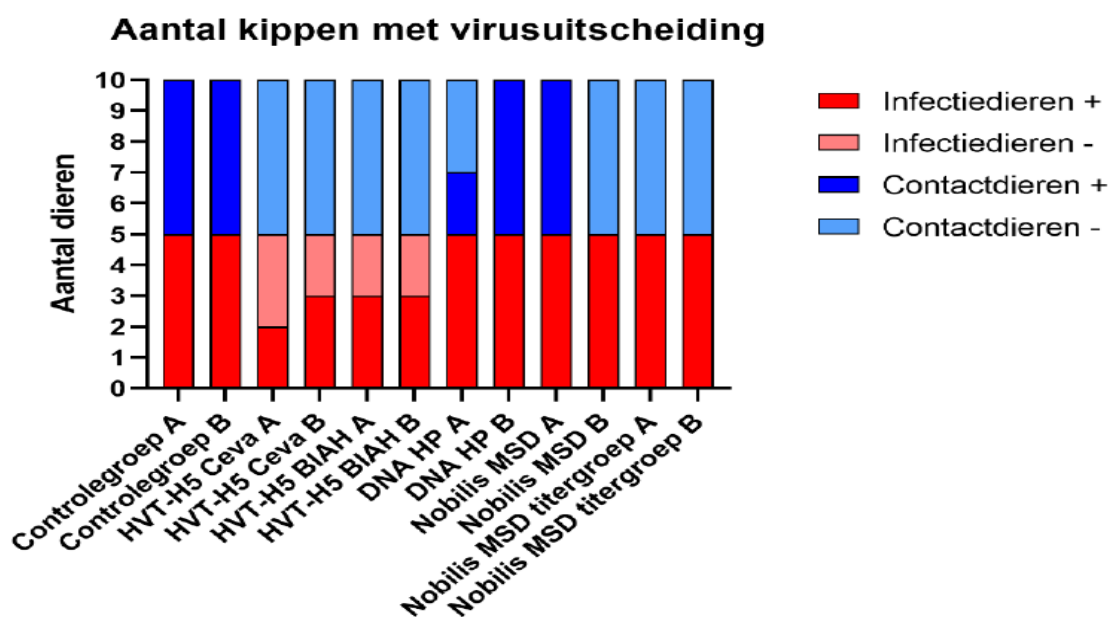
Пилето се счита за заразено, когато вирусът е бил отделен в продължение на 2 дни или повече ( $\geq 2$  дни) с минимален титър  $\geq 1,7$ . В контролни групи А и В 20/20 заразени и контактни животни са имали инфекция.

В групата „HVT-H5 Ceва“ 5/10 заразени животни отделят вирус, но контактните животни не са се заразили.

В „HVT-H5 BI“ 6/10 заразени животни и никакви контактни животни отделят вирус.

В ДНК NP групата 5/5 инфекциозни животни и 2/5 контактни животни в група А отделят вирус, докато в група В 5/5 инфекциозни животни и 5/5 контактни животни отделят вирус.

В групата „Nobilis MSD“ всички инфекциозни и контактни животни от група А отделят вирус. В група В 5/5 заразени животни излъчват вирус, но 0/5 контактни животни. И накрая, в титърната група на Nobilis MSD, всички заразени животни (10/10) излъчват вирус, но нито едно контактното животно не се заразява.



**Фигура 5** Броят на пилетата, за които е измерено  $\geq 2$  дни излъчване на вирус с титър  $\geq 1,7$  по време на експеримента с животни.

Когато резултатите от NP-ELISA, HAR теста и М-PCR се вземат заедно, може да се определи дали пилетата са се заразили. Пиле е заразено с положителен NP-ELISA резултат, увеличение от  $\geq 3$  в титъра на HAR и  $\geq 2$  дни отделяне на вируса (титър  $\geq 1,7$ ).

Фигура 6 показва броя на заразените пилета на група. В контролните групи 20/20 пилета са заразени.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☐ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

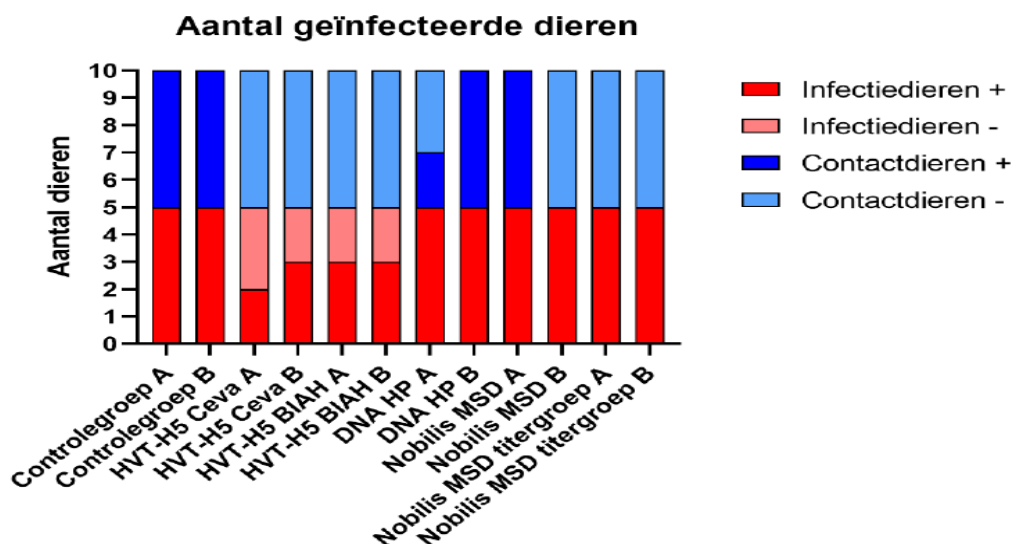
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



След ваксиниране с ваксината HVT-H5 от Ceva и BIAH, съответно 5/10 и 6/10 заразени животни се заразиха, но не беше доказана инфекция на контактните животни.

В групите „DNA HP“ и „Nobilis MSD“ всички инфекциозни животни (10/10) са претърпели инфекция след прилагане на вируса HPAI H5N1. Също така, съответно 7/10 и 5/10 контактни животни се заразиха. В „групата с титри на Nobilis MSD“ всички инфекциозни животни се заразиха, но не беше доказана инфекция при контактните животни.



**Фигура 6** Броят пилета, които са били заразени въз основа на резултатите от NP-ELISA, HAR и M-PCR. Пиле е заразено с положителен NP-ELISA резултат, увеличение от  $\geq 3$  в титър на HAR и  $\geq 2$  дни отделяне на вируса (титър  $\geq 1,7$ ).

#### 4.3.5 Количествено определяне на отделянето на вируса след инфекция

Екскрецията на вируса беше допълнително количествено определена и измерените титри са показани на Фигура 7. **Фигурата показва, че екскрецията на вируса през гърлото е по-висока, отколкото през клоаката.** Когато контактните животни се заразят и започнат да отделят вирус, това е няколко дни след първия ден на отделяне на вируса от заразените животни. В контролните групи А и В пикът на излъчване на вируса е висок (максимален титър е 7,3).

В групата с HVT-H5 Ceva, инфекциозните животни отделят вирус през гърлото, но не е измерено отделяне на вирус за контактните животни. Не е измерена екскреция на вируса през клоаката нито за заразените, нито за контактните животни.

В групите с HVT-H5 BIAH вирусът се отделя през гърлото за един или няколко дни, но не се отделя клоакално. Не е измерена и екскреция на вирус за контактните животни, с изключение на 1 наблюдение на контактно животно (титър 2,3 на ден 7) в гърлото.

В групата с ДНК HP, екскрецията на вируса през гърлото и клоаката беше измерена както при инфекциозни, така и при контактни животни.

В групата „Nobilis MSD“ отделянето на вируса е измерено в гърлото и клоаката на инфекциозни животни. В подгрупа А вирусната екскреция е измерена за контактните животни, но не и в подгрупа В.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

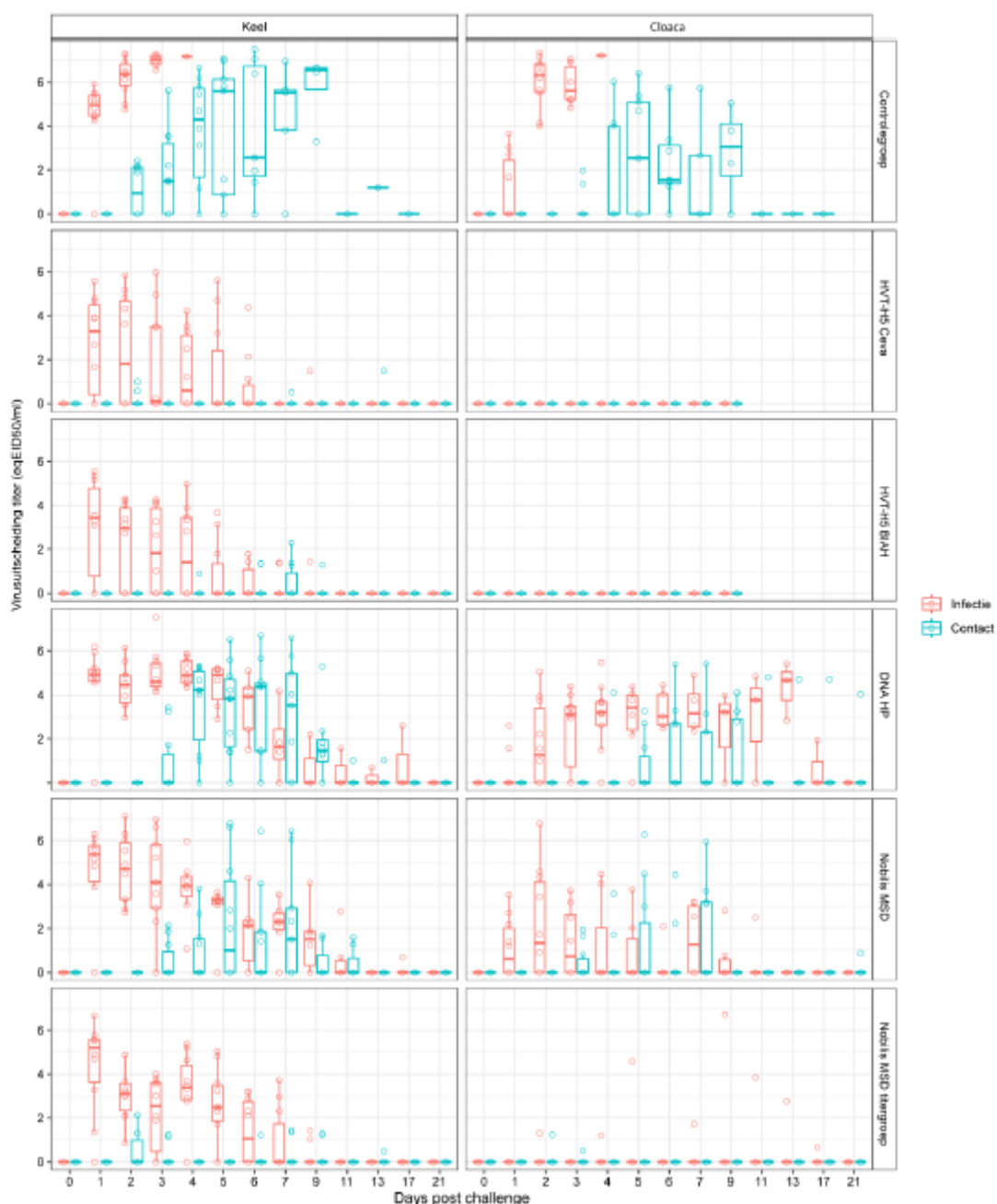
гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



В последната група, „Nobilis MSD titre group“, всички инфекциозни животни отделят вирус през гърлото, но 1 инфекциозно животно в клоаката. И в двете групи с титри на Nobilis MSD е измерено излъчването на вируса в гърлото на инфекциозни животни, но контактните животни не отделят никакъв вирус.



**Фигура 7 Титърът на излъчване на вируса (eqEID50/ml) на заразените животни (червено) и контактните животни (синьо), измерен в тампони от гърлото и клоаката. Подгрупи А и В са показани заедно на една фигура на група. Границата на откриване на PCR е 1,7, а титри  $\leq 1,7$  се считат за отрицателни.**

Отделянето на вируса се анализира с вероятността за отделяне на вируса, общото количество на екскретирания вирус (AUC) и продължителността на отделяне на вируса, определени за различните групи (Таблица 5).

Всички пилета от контролната група отделят вирус. Следователно вероятността е 1.

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☐ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





Вероятността за екскреция на вируса през гърлото е значително по-ниска в „HVT-H5 Ceva“, „HVT-H5 BI“ и „Nobilis MSD titre group“ в сравнение с контролната група.

Вероятността за излъчване на вирус от клоаката и за двете HVT-H5 ваксини е 0, тъй като не се отделя вирус.

Във всички групи, с изключение на „DNA HP“ и за отделянето на вируса в гърлото на „Nobilis MSD“, вероятността за отделяне на вируса е значително по-ниска, отколкото за контролната група.

Когато погледнем количеството отделяне на вируса, удивително е, че то е значително по-ниско във всички ваксинирани групи, отколкото в контролната група, с изключение отделянето от клоаката на групата „Nobilis MSD titer group“. Например, в гърлото групата HVT-H5 Ceva отделя 5.11 log 10 вирус, докато контролната група отделя 7.05 log 10 вирус.

Няма излъчване на клоакален вирус в групите HVT-H5 Ceva и BIAH. Следователно AUC е 0 log 10 и не е изчислена значимост за тези групи. Средната продължителност на излъчване на вируса в контролната група е 3 дни. Това е относително кратко, защото пилетата умират бързо. При останалите групи това е максимум 1-2 дни повече. Само в групата на "Nobilis MSD" отделянето на вируса е значително по-дълго в сравнение с контролната група.

**Таблица 5** Вероятността за излъчване на вирус (вирусно/без отделяне на вирус), общото количество на екскретирания вирус (в AUC Log 10) и средната продължителност на отделяне на вируса в гърлото и клоаката в дни.

| Група                           | Вероятност за излъчване на вирус (95% BI)     |                               | Общо отделяне на вирус в AUC Log 10 (95% BI)    |                               | Средна продължителност на излъчване на вируса (95% BI) в дни |
|---------------------------------|---|-------------------------------|---|-------------------------------|--|
|                                 | Гърлена                                       | клоакална                     | Гърлена   | клоакална                     |  |
| Groep                           | Waarschijnlijkheid virusuitscheiding (95% BI) |                               | Totale virusuitscheiding in AUC Log 10 (95% BI) |                               | Gemiddelde duur virus-uitscheiding (95% BI) in dagen         |
|                                 | Keel  | Cloaca                        | Keel  | Cloaca                        |  |
| 1 Controlegroep                 | 1 (0,84-1,00)                                 | 0,95 (0,72-0,99)              | 7,05 (6,52-7,59)                                | 6,02 (5,45-6,59)              | 3 (3-5)  |
| 2 HVT-H5 Ceva A en B            | 0,30 (0,14-0,53) <sup>a</sup>                 | 0 (0-0,16) <sup>a</sup>       | 5,11 (4,27-5,96) <sup>a</sup>                   | 0                             | 4 (3-NA)   |
| 3 HVT-H5 BIAH A en B            | 0,40 (0,21-0,62) <sup>a</sup>                 | 0 (0-0,16) <sup>a</sup>       | 4,59 (3,86-5,33) <sup>a</sup>                   | 0                             | 4 (3-6)  |
| 4 DNA HP A en B                 | 0,90 (0,68-0,97)                              | 0,75 (0,52-0,89)              | 6,02 (5,48-6,57) <sup>a</sup>                   | 4,82 (4,24-5,41) <sup>a</sup> | 5 (4-6)  |
| 5 Nobilis MSD A en B            | 0,75 (0,52-0,89)                              | 0,60 (0,38-0,79) <sup>a</sup> | 5,82 (5,25-6,38) <sup>a</sup>                   | 4,52 (3,85-5,19) <sup>a</sup> | 5 (4-7) <sup>a</sup>   |
| 6 Nobilis MSD titergroep A en B | 0,60 (0,38-0,79) <sup>a</sup>                 | 0,05 (0,01-0,28) <sup>a</sup> | 4,69 (4,09-5,30) <sup>a</sup>                   | 7,02 (4,90-9,14)              | 4 (3-6)  |

<sup>a</sup> значително ( $p < 0.05$ ) в сравнение с контролната група

NA: неприложимо; CI: 95% доверителен интервал

Резултатите показват, че и двете HVT-H5 ваксини напълно предотвратяват отделянето на вируси през клоаката и също така значително намаляват вероятността и количеството на отделяне на вируси през гърлото в сравнение с контролната група.

Въпреки това, не е измерено значително намаляване на вероятността от екскреция на вируса за ДНК ваксината и ваксината Nobilis, с изключение на екскрецията в клоаката за ваксината Nobilis. Има значително намаление на количеството отделяне на вируси за тези ваксини с изключение на „титърната група Nobilis MSD“.

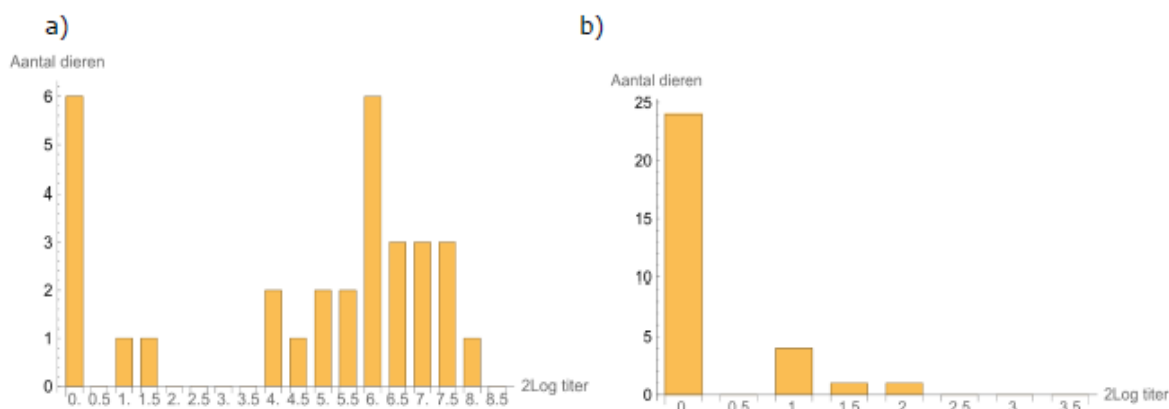
☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



#### 4.3.6 Корелати на защитата

За да се проучи до каква степен нивото и разпределението на HAR титрите са свързани с предаването на вируса, за ваксината Nobilis беше изследвано дали HAR титрите също са добри корелати на защитата в областта на предотвратяването на предаването на вируси. Ефектът от вакцинацията, като функция на състава на групата, изразен в HAR титър, беше изчислен с помощта на контролната група, „Nobilis MSD групата“ и „Nobilis MSD титърната група“. Фигура 8 показва разпределението на HAR титрите на ден 42 на 20-те животни от „Nobilis MSD групата“ и 10 заразени животни от „Nobilis MSD титърната група“. Повечето хетероложни титри са 0, поради което хомоложните HAR титри са избрани за анализа. Въз основа на разпределението на хомоложните HAR титри (Фигура 8) бяха избрани всички възможни различни гранични стойности за разделянето между високи и ниски титри ( $\leq 0$ ,  $\leq 1$ ,  $\leq 4$ ,  $\leq 4,5$  и  $\leq 5$ ). След това числото на възпроизвеждане беше изчислено за различните гранични стойности (Таблица 6). Това показва, че няма голяма разлика между изчисления R, ако се избере различна гранична стойност за разделянето на ниски/високи HAR титри. Всяко животно с различен титър има свой собствен R, но те не могат да бъдат оценени въз основа на тези експерименти, тъй като нямаме достатъчно наблюдения на животни с един специфичен титър. Във всички оценки с различни гранични стойности, разликата в R между групата с висок и нисък титър се дължи единствено на намаляване на инфекциозността поради предаване на вируса. Това идва от статистическия анализ на предаването на вируса, където моделът с данни с пълен интервал включва както ефект за чувствителност, така и за инфекциозност.



**Фигура 8 За целите на изчисляване на ефективността на ваксината, като се вземат предвид разликите в имунния отговор, разпределението на а) хомоложните; б) Показани са хетерогенни HAR титри на ваксинираните животни от "групата Nobilis MSD" и "групата на титрите Nobilis MSD". Въз основа на това разпределение са избрани категориите за анализ.**

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056

**Таблица 6 Разпределение (%) на броя на високите HAR титри на ден 42 на заразените животни за група в различните категории**

| Група                      | Разпространение на вирус | ≤0        |                  | ≤1        |                  | ≤4        |                  | ≤4,5        |                  | ≤5        |                  |
|----------------------------|--------------------------|-----------|------------------|-----------|------------------|-----------|------------------|-------------|------------------|-----------|------------------|
|                            |                          | Общо      | Заразени животни | Общо      | Заразени животни | Общо      | Заразени животни | Общо        | Заразени животни | Общо      | Заразени животни |
| <b>Groep</b>               | <b>Virusverspreiding</b> | <b>≤0</b> |                  | <b>≤1</b> |                  | <b>≤4</b> |                  | <b>≤4,5</b> |                  | <b>≤5</b> |                  |
|                            |                          | Totaal    | Infectie dieren  | Totaal    | Infectie dieren  | Totaal    | Infectie dieren  | Totaal      | Infectie dieren  | Totaal    | Infectie dieren  |
| 1 Controle A               | Ja                       | 0         | 0                | 0         | 0                | 0         | 0                | 0           | 0                | 0         | 0                |
| 1 Controle B               | Ja                       | 0         | 0                | 0         | 0                | 0         | 0                | 0           | 0                | 0         | 0                |
| 5 Nobilis MSD A            | Ja                       | 60        | 60               | 50        | 60               | 40        | 60               | 30          | 40               | 20        | 20               |
| 5 Nobilis MSD B            | Nee                      | 80        | 80               | 80        | 80               | 70        | 60               | 70          | 60               | 70        | 60               |
| 6 Nobilis MSD titergroep A | Nee                      | 50        | 100              | 50        | 100              | 50        | 100              | 50          | 100              | 50        | 100              |
| 6 Nobilis MSD titergroep B | Nee                      | 50        | 100              | 50        | 100              | 50        | 100              | 50          | 100              | 50        | 100              |

Както беше съобщено по-рано в таблица 1, антигенното разстояние от ваксината Nobilis до заразния вирус е 5,71. Ето защо като отправна точка беше избрана гранична стойност от 5. За високо/ниско разпределение с гранична стойност 5, след това се изчислява процентът на пилетата, които трябва да имат HAR титър >5, за да се изчисли R<1. От изчисленията с гранични стойности на HAR титър 5 изглежда, че 76% от животните трябва да имат хомоложен HAR титър >5, за да бъде R<1. В контролната група А и В и „Nobilis MSD група А“ имаше предаване на вируса на контактните животни. В тези групи само 0% или 20% (в Nobilis MSD група А) са имали HAR титър >5. Това обяснява предаването на вируса в тези групи.

В другите три групи „Nobilis MSD В“, „Nobilis MSD титър група А“ и „Nobilis MSD титър група В“ не е имало предаване на вируса. Процентът на заразените животни с HAR титър >5 в тези групи е съответно 60%, 100% и 100%. Тези проценти са по-високи, отколкото в групите с предаване на вируса, но за 1 от 3-те групи това все пак е по-ниско от изчислените необходими 76%. Тази „Nobilis MSD група В“ има R=1,55 (0,4 x 3,57 + 0,6 x 0,2 = 1,55; вижте Таблица 7). Това означава, че когато едно животно е инокулирано, вероятността да не се предава вирус (малко огнище) е 0,65. Въпреки това, в проучването за предаване на вируса са инокулирани 5 пилета, следователно вероятността за липса на предаване на вируса е (0,65)<sup>5</sup>=0,113, но това не е значимо (p>0,05). Следователно R>1 не се отхвърля, въпреки че не е наблюдавано предаване на вирус в тази подгрупа.

Red   
 Amber   
 Green   
 White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



**Таблица 7 Числото за възпроизвеждане (R) за ниските и високите HAR титри, изчислени при всички гранични стойности**

| Отрязък | Ниски/високи HAR титри | R    | Процент животни с висок титър, необходими за R<1 (с 95% доверителен интервал)      |
|---------|------------------------|------|--|
| Cut-off | Laag/hoog HAR-titers   | R    | Benodigde percentage hoge titer dieren voor R<1 (met 95% betrouwbaarheidsinterval) |
| ≤0      | Laag                   | 3,77 | 83% (68% - 98%)  |
| >0      | Hoog                   | 0,44 |  |
| ≤1      | Laag                   | 3,70 | 83% (68% - 97%)  |
| >1      | Hoog                   | 0,43 |  |
| ≤4      | Laag                   | 3,63 | 81% (67% - 96%)  |
| >4      | Hoog                   | 0,40 |  |
| ≤4,5    | Laag                   | 3,84 | 81% (66% - 96%)  |
| >4,5    | Hoog                   | 0,31 |  |
| ≤5      | Laag                   | 3,57 | 76% (62% - 91%)  |
| >5      | Hoog                   | 0,20 |  |

*Laag – Ниско*

*Hoog – Високо*

Като анализ на чувствителността, анализът беше повторен без „титърна група Nobilis MSD“. Бяха получени подобни резултати, както в горния анализ (данните не са показани).

**Този анализ показва, че разпределението на броя на защитените животни в популацията е свързано с предаването на вируса. Титрите на HAR изглеждат добра мярка за защита (корелати на защита) в областта на предаването на вируса за ваксината Nobilis при експериментални условия. Въз основа на това изследване не могат да се правят изявления за новите видове ваксини, които също предизвикват клетъчен имунитет, както и в дългосрочен план при полеви условия.**

Липсата на предаване на вируса в „титърните групи на Nobilis MSD“, където са ваксинирани само инфекциозните животни, подкрепя оценката на параметъра на скоростта на предаване  $\beta$ . Липсата на предаване на вируса, когато контактните животни не са ваксинирани, е в съответствие със заключението на Sitaras, et al. инфекциозност на ваксинираните пилета [19]. Анализът е представен в Приложение 3.

#### 4.4 Заключение

Резултатите показват, че и двете HVT-H5 ваксини предотвратяват предаването на вируса в експеримента. Изчислените числа на възпроизвеждане (R) и за двете групи ваксина HVT-H5 в този експеримент бяха 0 (95% доверителен интервал (CI) 0-0,70) и следователно значително по-ниски от тези в контролната група, в която е настъпило предаване на вируса, и числото на възпроизвеждане беше 3,64 (95 % CI 1,89-6,99).

Предаването на вируси беше предотвратено в една от двете групи на Nobilis, но в нито една от групите „ДНК НР“. Както за ДНК ваксината, така и за ваксината Nobilis, изчисленият R не е значително под 1, 1,89 (95% CI 0,55-5,22) и 1,48 (95% CI 0,30-3, съответно) 44), според метода на „крайния размер“. В групата Nobilis не е измерен

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056



отговор на антитела за някои от заразените животни. При подбор на животни с титър на антитела в „титърната група Nobilis MSD“ не се наблюдава предаване на вирус.

Проучването върху животни допълнително показва, че и двете HVT-H5 ваксини са 100% ефективни за намаляване на заболяемостта и смъртността след инфекция с HPAI H5N1 вируса.

След ваксиниране с ДНК ваксината е имало 70% смъртност на заразените животни и 40% смъртност на контактните животни след заразяване. Симптоми на заболяването са наблюдавани и при оцелели животни.

След прилагане на ваксината Nobilis се наблюдава 40% смъртност на заразените животни и 30% смъртност на контактните животни. Смъртността при контактните животни в групата с Nobilis е само в групата, където е настъпило предаване, а не в групата, където не е настъпило предаване.

Също така, вероятността от отделяне на вирус и количеството на отделяне на вируса от ваксинираните заразени животни с HVT-H5 ваксини е значително по-малко от измереното в неваксинираната контролна група.

Вероятността за отделяне на вируса от пилетата, които са получили ДНК ваксината, не е по-ниска, отколкото за контролната група, но количеството вирус, което е отделено, е значително по-ниско.

Вероятността за отделяне на вируса след ваксинация с ваксината Nobilis е значително намалена в клоаката в сравнение с контролната група, но тази разлика не е значима в гърлото. След ваксинация с ваксината Nobilis на MSD, количеството на отделяне на вируса е значително по-малко от това на неваксинираната контролна група. Така че, въпреки че антигенното разстояние на ваксината на Nobilis до сегашния вирус на HPAI H5 клейд 2.3.4.4b е относително голямо, ваксината също е частично ефективна за този аспект.

И накрая, изследването на предаването илюстрира, че титрите на HAI при експериментални условия са добра мярка за защита (наричани също корелати на защита) в областта на предаването на вируса за ваксината Nobilis. Въз основа на това изследване не могат да се правят изявления за новите видове ваксини, които също предизвикват клетъчен имунитет, както и в дългосрочен план при полеви условия.

#### 4.5 Дискусия

В това проучване върху животни ваксините HVT-H5 са ефективни за предотвратяване на предаването на вируса. ДНК ваксината на HP не предотвратява предаването на вируса от заразени животни към контактни животни. В предишни проучвания върху животни, проведени от фармацевтичната компания, тази ваксина е ефективна за предотвратяване или намаляване на симптомите на заболяването и отделянето на вируси след еднократно приложение при пилета на същата възраст (в момента се пише публикация). Ваксината Nobilis на MSD в пълна доза в група В и групите за селекция на титър предотвратява предаването на вируса от заразените животни към контактните животни.

При експериментални условия ваксините HVT-H5 (и отчасти ваксината Nobilis) са ефективни за предотвратяване на предаването на вируса. За да могат ваксините да се използват на практика, ваксините трябва да отговарят на минималните изисквания, определени от Световната организация за здравеопазване на животните (WOAH). Наръчник за сухоземни животни за инфлуенца по птиците съдържа насоките, на които

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



трябва да отговаря една ваксина, преди да може да бъде одобрена за употреба при домашни птици [10]:

(i) Ваксините трябва да се тестват чрез експериментално заразяване на пилета след ваксинация (> 3 седмици след ваксинация) с доза от  $10^6$  EID<sub>50</sub>. Най-малко 80% от ваксинираните пилета трябва да преживеят тази инфекция. В това проучване за предаване пилетата са били заразени с доза от  $10^6$  EID<sub>50</sub> от вируса HPAI H5N1 най-малко 6 седмици след ваксинацията. И двете ваксини HVT-H5 отговарят на изискванията на WOAH, но ДНК ваксината и ваксината Nobilis не. Това може да се постигне с повторно приложение на същия или различен тип ваксина (бустер). Това е доказано преди това с други ваксини, например експерименталната ДНК ваксина, описана от Hussein, et al. (2016). Тази ваксина не дава HAR титри и никаква защита срещу смъртност след еднократно приложение. Въпреки това, след бустер с ваксината Volvac B.E.S.T (BIAN), титрите на HAR са по-високи и има 80% защита срещу смъртност [56].

(ii) Полевите HAR титри трябва да бъдат най-малко 5 за защита срещу смъртност и най-малко 7 за намаляване на излъчването на вируса. В това проучване при животни титрите на HAR преди инфекцията са определени на 42-ия ден.

Ваксината HVT-H5 на Ceва отговаря на изискването със среден хомоложен титър от 7,68.

HVT-H5 ваксината на BIAN просто не отговаря на изискването със среден хомоложен титър от 6,05. За тази ваксина обаче не беше възможно да се тества 100% хомолог в HAR, тъй като не беше наличен точен хомоложен антиген. Тестването беше извършено с полеви вирус, който е генетично много близък, но може да има малка антигенна разлика, която всъщност може да доведе до по-висок хомоложен титър.

Хомоложните титри за ДНК и ваксината Nobilis са средно съответно 3,80 и 0,25 и следователно не отговарят на изискването на WOAH.

Трябва да се отбележи, че титрите на HAR са определени в експеримент с животни, а не на полето, както е предписано от WOAH. Титрите на HAR, постигнати при полева ваксинация, може да са по-ниски от титрите на HAR, постигнати в това изследване върху животни. В проучването при животни значително намаляване на предаването, отделянето на вируса и смъртността вече се наблюдава при по-ниски титри на HAR. Следователно резултатите от това изследване върху животни се отклоняват от предишно проучване за предаване, което е проведено [19] и трябва да бъдат проучени по-подробно в последващи проучвания.

В допълнение към горните изисквания от WOAH, трябва да е възможно от **насоките на ЕС да се докаже инфекция с полеви вирус при ваксинирани животни. Следователно е необходим принцип DIVA**, за да може да се направи това разграничение със специфична диагностика. Както HVT ваксините, така и ДНК ваксината отговарят на принципа DIVA, но това не се отнася за ваксината Nobilis.

И двете HVT-H5 ваксини отговарят на условията, поставени от изследователите. Ваксините предотвратяват предаването на вируса и осигуряват пълна защита срещу смъртност и заболяване след заразяване с HPAI H5N1 вируса. Ваксините отговарят на принципа DIVA и е възможно масово приложение, тъй като HVT-H5 ваксините могат да се прилагат чрез инжектиране или *in ovo* в люпилнята. Този тип векторна ваксина обаче е ефективна само при пилета и пуйки. Допълнителни изследвания трябва да покажат как различните ваксини се представят при полеви условия самостоятелно или евентуално в комбинация с бустер и каква е продължителността на защитата. **HVT-H5 ваксините са**

☒ Red    ☐ Amber    ☐ Green    ☒ White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056



**базиран на херпесен вирус, което означава, че могат да генерират антитела срещу вируса на инфлуенца по птиците за цял живот.** Могат обаче да се обмислят програми за ваксиниране, при които се прилага бустер с различен тип ваксина, тъй като на практика бустерите с различен тип ваксина изглежда са необходими за поддържане на достатъчна дългосрочна защита с HVT-векторни ваксини срещу други заболявания.

За да могат да се включат HVT-H5 ваксини в програмата за ваксиниране, трябва да се вземат предвид други HVT векторни ваксини, които вече са приложени на кокошки носачки или родителски животни (срещу, например, Marek, IBD, ILT и NDV). Когато две ваксини, базирани на HVT вектор, се дават на едно и също животно и това може да е вярно, ако се дават на майки, ваксините може да взаимодействат една с друга, което може да намали ефективността. Следователно програмите за ваксини трябва да бъдат изготвени по такъв начин, че да съдържат векторна ваксина срещу HVT само веднъж. Допълнителни изследвания на (клетъчния) имунен отговор също са необходими, за да се получи достатъчна представа за връзката между измерените имунологични стойности и защитата на пилетата от предаване на вируси. Особено в дългосрочен план и при полеви условия. Тази информация е необходима от насоките на ЕС за създаване на ефективна програма за мониторинг и наблюдение, които са предпоставка за прилагане на програма за ваксиниране срещу птичи грип. Накратко, препоръчват се допълнителни изследвания, преди да започнете да ваксинирате домашните птици срещу птичи грип в Холандия. И накрая, ваксините трябва да бъдат регистрирани от фармацевтичните компании, преди да могат да се прилагат на домашни птици в Холандия.

#### **ПРИЛОЖЕНИЕ 1: ОТЧЕТ ЗА АВТОРСТВОТО (по азбучен ред по категории)**

Първоначални подготвителни консултации и проекти на документи:

N. Beerens, M.C.M. de Jong, J.A. Stegeman, F.C. Velkers, J.J. de Wit

Изпълнение на изучаването на литературата:

E.A. Germeraad

Дизайн на проучване върху животни:

N. Beerens, E.A. Germeraad, J.L. Gonzales, M.C.M. de Jong, J.A. Stegeman, F.C. Velkers, J.J. de Wit

Подготовка на изследване върху животни:

N. Beerens, E.A. Germeraad, F.C. Velkers

Провеждане на изследване върху животни:

N. Beerens, E.A. Germeraad

Анализ:

M.C.M. de Jong (предаване на вирус и връзка между титрите на антителата), J.L. Gonzales (излъчителство на вируси)

Описание на резултатите от изследването върху животни:

E.A. Germeraad, J.L. Gonzales, M.C.M. de Jong, F.C. Velkers

Преглед на литературата и изследване върху животни:

N. Beerens, J.L. Gonzales, M.C.M. de Jong, J.A. Stegeman, F.C. Velkers, J.J. de Wit

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



## **Благодарности:**

Това изследване върху животни не би могло да бъде извършено без всички добри грижи от страна на гледачите на животни от WBVR и цялата лабораторна работа на анализаторите от WBaVR. Освен това бихме искали да благодарим на колегите от Erasmus MC, фармацевтичните компании, птицевъдния сектор и Министерството на земеделието, природата и качеството на храните, които обърнаха внимание на тази тема в подготовката на този процес и допринесоха към този проект.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ 2: ДАННИ ЗА ВАКСИНИТЕ**

### **HVT ваксина Ceva**

Име на продукта: Vectormune AI

Производител: Ceva Sante Animale

Партида ваксина: 395-117

Годност на ваксината: 03 март 2023 г

Партида разтворител: 21060741

Разтворител ехр: 12-2023

Синьо багрило V9030 партида: 91066B

Синьо багрило V9030 ехр: 2023-08-05

*Условия на съхранение:* ваксина <-140°C; разтворител и синьо багрило при стайна температура

*Приготвяне:* съгласно протокол Ceva: 0,5-1ml синьо багрило се добавя към разтворителя в чиста среда. Синята боя и разтворителят се смесват чрез въртене и след това се оставят да престоят 30 минути. Една ампула от ваксината се размразява на водна баня със стерилна вода (26-28°C) за 60-90 секунди. 5 ml от разтворителя се изтеглят с помощта на спринцовка от 20 ml и игла 18G x 1,5". След това съдържанието на ампулата се изтегля внимателно с игла 18G x 1,5" и се прилага към останалата част от разредителя в сака с ваксината. Не изсмуквайте ваксината.

Друго: ваксината трябва да се приложи <1 час след приготвянето

Начин на приложение: Подкожно в задната част на врата; 20G игла

Доза за приложение: 0,2 мл

Възраст на прием: 1-дневно пиленце

### **HVT ваксина Boehringer Ingelheim**

Име на продукта: HVT-H5

Производител: Boehringer Ingelheim (BIAH)

Партида ваксина: HVT-H5

Дата на попълване: 17-12-2021

Партида разтворител: 006/21

Разтворител ехр: 23 декември

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056





Условия на съхранение: ваксина <-140°C; разтворител при стайна температура

Приготвяне: по протокол ВІАН: в чиста среда една ампула от ваксината се размразява на водна баня със стерилна вода (26-28°C) за 60-90 секунди. 5 ml от разтворителя се изтеглят с помощта на спринцовка от 20 ml и игла 18G x 1,5". След това съдържанието на ампулата се изтегля внимателно с игла 18G x 1,5" и се прилага към останалата част от разредителя в сака с ваксината. Не изсмуквайте ваксината.

Друго: ваксината трябва да се приложи <1 час след приготвянето

Начин на приложение: Подкожно в задната част на врата; 20G игла

Доза за приложение: 0,2 мл

Възраст на прием: 1-дневно пиленце

### **ДНК ваксина Хювефарма**

Име на продукта: АІ ДНК ваксина

Производител: Хювефарма

Партида ваксина: АІV\_01Jul22

Годност на ваксината: NA

Условия на съхранение: 2-8°C

Приготвяне: Готов за употреба

Начин на приложение: Мускулно в гръдния мускул; 25G игла

Доза за приложение: 0,2 мл

Възраст на прием: 14 дни

### **Инактивирана ваксина MSD**

Име на продукта: Nobilis

Производител: MSD Animal Health Vохmeer

Партида ваксина: Н067А, дата на производство: март 2021 г

Годност на ваксината: март 2023 г

Условия на съхранение: 2-8°C

Приготвяне: Готов за употреба

Други: Разклатете добре преди употреба

Начин на приложение: Подкожно в задната част на врата; 20G игла

Доза на приложение: 100%, титърна група: 50% (125 µl) и 75% (188 µl)

Възраст на прием: 8 дни

### **Източници:**

Germeraad, E. A., Velkers, F. C., de Jong, M. C. M., Gonzales, J. L., de Wit, J. J., Stegeman, J. A., & Beerens, N. (2023). Transmissiestudie met vier vaccins tegen H5N1 hoogpathogeen vogelgriepvirus (clade 2.3.4.4b). (Rapport / Wageningen Bioveterinary Research; No. 2300528). <https://doi.org/10.18174/584306>

Red     Amber     Green     White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056

Мисията на Wageningen University & Research е „Да изследваме потенциала на природата за подобряване на качеството на живот“. В рамките на Wageningen University & Research, Wageningen University и специализираните изследователски институти на Wageningen Research Foundation обединяват усилия, за да допринесат за решаването на важни въпроси в областта на здравословната храна и жизнената среда. С приблизително 30 клона, 7 200 служители (6 400 FTE), 13 200 студенти и повече от 150 000 участници в обучението през целия живот, Wageningen University & Research е една от водещите институции за знания в своята област в световен мащаб. Интегрираният подход към проблемите и сътрудничеството между различни дисциплини са в основата на уникалния подход на Wageningen.

Този доклад може да бъде изтеглен безплатно от <https://doi.org/10.18174/584306> или от [www.wur.nl/bioveterinary-research](http://www.wur.nl/bioveterinary-research) (под публикациите на Wageningen Bioveterinary Research).

© 2023 Wageningen Bioveterinary Research

Wageningen Bioveterinary Research

PO box 65

8200 AB Lelystad

T 0320 23 82 38

info.bvr@wur.nl

[www.wur.nl/bioveterinary-research](http://www.wur.nl/bioveterinary-research)

Wageningen Bioveterinary Research

Report 2300528

© CC BY 4.0. Тази публикация може да бъде разпространявана, модифицирана и използвана, стига да има препратка към оригиналната публикация.



*Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:*

<http://corhv.government.bg/>

<http://corhv.government.bg/?cat=27>

<http://corhv.government.bg/?cat=71>

**Изготвил: ЦОРХВ**

12.05.2023 г.

Red  Amber  Green  White

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)

тел. 02/4273056