

**ПОЛУЧЕНИЕ КАНДИДАТНОГО ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА  
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ ПОДТИПА А(H5N1)  
МЕТОДОМ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ\***

М.В. СЕРГЕЕВА<sup>1</sup>, К.С. КУДРЯ<sup>1</sup>, М.А. ПЛОТНИКОВА<sup>1</sup>, В.В. ВЕРЕТЕННИКОВ<sup>2</sup>,  
Э.Д. ДЖАВАДОВ<sup>2</sup>, Д.А. КРАСКОВ<sup>2</sup>, А.А. ИВАНОВА<sup>1</sup>, П.А. ПЕТРОВА<sup>1</sup>,  
Н.В. ТАРЛАВИН<sup>2</sup> ✉

Высокопатогенный вирус гриппа птиц подтипа H5N1 активно циркулирует среди домашней и дикой птицы по всему миру и становится причиной массовой гибели домашних птиц. Основные способы борьбы против гриппа птиц — уничтожение поголовья птиц и вакцинация. Указанные меры позволили установить контроль за распространением вируса гриппа подтипа H5N1, обеспечить снижение числа новых вспышек данного заболевания и вирусной нагрузки на окружающую среду. Среди современных технологий создания вакцин против вирусов гриппа А получил распространение метод обратной генетики. В настоящей работе впервые описано создание рекомбинантного штамма вируса гриппа подтипа H5N1 клэйда 2.3.4.4b с модифицированным гемагглютинином антигенно актуального вируса, выделенного на территории России в 2023 году. Мы показали, что сконструированный штамм обладает высокими производственными характеристиками в системе РКЭ (развивающиеся куриные эмбрионы) и в клеточной культуре MDCK. Также мы впервые применили его в составе вакцины с добавлением гидроксида алюминия в качестве адьюванта для иммунизации целевых животных и установили, что вакцинация стимулирует выработку антител у цыплят 1-суточного возраста. Нашей целью было конструирование методом обратной генетики вакцинного штамма-кандидата, который может быть использован для создания ветеринарной вакцины против современных вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1. Работу проводили в 2024 году в ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России. Источником РНК служил лизированный образец, содержащий генетический материал вируса А/черноголовая чайка/Сыктывкар/19987/2023 (H5N1). Амплификацию полноразмерных кДНК копий вирусных генных сегментов HA и NA осуществляли с использованием набора универсальных пар праймеров. Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора ОТ-ПЦР Экстра микс (ООО «Биолабмикс», Россия) на приборе Gentier 96E («Xi'an Tianlong Science and Technology, Co., Ltd.», Китай). Полученные продукты клонировали в вектор pHW2000, предназначенный для сборки вирусов гриппа методом обратной генетики. Плазмидами трансформировали бактериальные клетки *Escherichia coli* DH5- $\alpha$ . Нуклеотидную последовательность отобранных клонов верифицировали методом секвенирования по Сэнгеру (ЗАО «Евроген», Россия). Для модификации сайта расщепления HA осуществляли поиск нуклеотидных последовательностей близкородственных низкопатогенных вирусов гриппа А/H5N1 клэйда 2.3.4.4b с использованием базы данных EpiFlu («GISAID», Германия). Нуклеотидные последовательности сайтов расщепления выбранных низкопатогенных вирусов использовали для модификации плазмиды, кодирующей ген HA методом сайт-направленного мутагенеза (ЗАО «Евроген», Россия). Для сборки рекомбинантного вируса методом обратной генетики использовали смесь плазмид на основе вектора pHW2000: модифицированный HA и NA подтипа H5N1 (описаны выше), а также плазмиды, кодирующие гены внутренних и неструктурных белков (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) высокопродуктивного штамма-донора А/PR/8/34 (H1N1). Смесь плазмид трансфицировали в ко-культуру клеток HEK293FT/MDCK, выращенных в среде DMEM/F12. Для трансфекции использовали липосомы GenJect39 (ООО «Молекта», Россия). Через 1 сут проводили смену среды на бессывороточную с ТРСК-трипсином («Sigma», США). Далее каждые сутки проверяли наличие цитопатического действия (ЦПД) вируса визуально в световой микроскоп AxioVert A1 («Carl Zeiss AG», Германия), а также контролировали появление вируса в культуральной среде с помощью реакции гемагглютинации (РГА). Для накопления вируса 10-11-суточные РКЭ заражали вирусосодержащим материалом в различных разведениях в объеме 0,2 мл в аллантоисную полость. Для определения инфекционной активности в системе РКЭ из вирусосодержащей жидкости готовили серии 10-кратных разведений на DPBS (ООО «БиолоГ», Россия) с добавлением антибиотика-антимикотика. Расчет 50 % эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД<sub>50</sub>) проводили по методу L.J. Reed и H. Muench и выражали в lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Полногеномные нуклеотидные последовательности вируса получали методом секвенирования нового поколения по технологии «Illumina, Inc.» (США). Характерный для низкопатогенных вирусов гриппа птиц фенотип подтверждали по отсутствию репродукции в пермиссивной культуре клеток MDCK в отсутствие эндогенной трипсиноподобной протеазы. Антигенные свойства вируса изучали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) со специфическими

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-76-10044, <https://rscf.ru/project/24-76-10044>.

крысинными антисыворотками, полученными к вирусам гриппа А подтипа H5 различных лет выделения, и соответствующими вирусами из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ. Способность штамма вызывать формирование вирус-специфических антител оценивали на 1-суточных цыплятах кросса Декалб Уайт. Методом обратной генетики был собран рекомбинантный вакцинный штамм A/Syktuykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1), представляющий собой реассортант с составом генома 6:2, на основе высокорепродуктивного донора A/PR/8/34 с поверхностными антигенами высокопатогенного вируса гриппа птиц подтипа H5N1. Штамм охарактеризован и депонирован в Государственной коллекции вирусов. Для оценки штамма был проведен антигенный анализ с антисыворотками, полученными к вирусам гриппа подтипа H5N1 различных клонов, циркулировавших на территории России в период 2000-2025 годов. Анализ показал, что разработанный штамм не взаимодействует с антисыворотками клонов 1 и 2.2, а с антисывороткой клайда 2.3.4.4b взаимодействие было ниже, чем с гомологичной сывороткой. При оценке стабильности разработанного вакцинного штамма отмечена высокая репродукция вируса в системе РКЭ в течение 5 последовательных пассажей. Методом секвенирования было исключено появление в геноме вируса дополнительных мутаций. С разработанным штаммом была сконструирована инактивированная вакцина с добавлением гидроксида алюминия в качестве сорбентного адьюванта в конечной концентрации 0,2 %. Опыт на цыплятах кросса Декалб Уайт показал пригодность использования разработанного штамма в качестве антигена в составе вакцины. При введении вакцины цыплятам в 1-суточном возрасте в объеме 0,5 мл/гол. (прививная доза составляла 8,4 Ig/гол.) титр антител спустя 28 сут составил 1:388 в РТГА. Этот титр антител существенно превышает требуемый для стойкой и продолжительной защиты (1:32 в РТГА). Таким образом, полученный рекомбинантный штамм вируса гриппа A/Syktuykar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) полностью подходит для производства биопрепаратов для ветеринарного применения, в том числе инактивированных вакцин.

**Ключевые слова:** высокопатогенный грипп птиц, вакцина, рекомбинантные вакцины, обратная генетика, инфекционные болезни птиц, конструирование плазмид, вирус гриппа А подтипа H5N1.

Высокопатогенный вирус гриппа птиц подтипа H5N1 широко циркулирует среди домашней и дикой птицы по всему миру и становится причиной массовой гибели миллионов сельскохозяйственных птиц (1, 2). По данным Всемирной организации здоровья животных (ВОЗЖ; World Organisation for Animal Health, WOAH), в 2022 году более 25 млн домашних и диких птиц были инфицированы высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/H5N1 (3). Этот вирус характеризуется пандемическим потенциалом (4, 5). Он обладает способностью преодолевать межвидовой барьер и поражать млекопитающих, в отношении которых ведется сельскохозяйственная деятельность (6). В октябре 2022 года сообщалось о резком увеличении смертности среди животных на ферме по разведению норок в Испании, причиной которой стал вирус A/H5N1 (7). В 2024 году на территории США было зафиксировано инфицирование крупного рогатого скота вирусом A/H5N1 (клайд 2.3.4.4b), при этом большое количество вирусной РНК было обнаружено в образцах молока (8). Основные способы борьбы против гриппа птиц и вызываемых им панзоотий — уничтожение поголовья и вакцинация (9). Указанные меры позволили установить контроль за распространением вируса гриппа подтипа H5N1, добиться снижения числа новых вспышек заболевания и вирусной нагрузки на окружающую среду (10). В настоящее время внедрение в практику специфических вакцин против высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1 одобрили 58 % стран мира (11).

Среди современных технологий получения вакцинных штаммов вируса гриппа метод обратной генетики (12) занимает особое место, поскольку с его помощью можно не только создавать вакцины с требуемой антигенной специфичностью, но и быстро модифицировать их в случае значимых мутаций циркулирующих полевых штаммов (13). Вирусы, полученные при помощи методов обратной генетики, обладают антигенными свойствами полевых изолятов, при этом не патогенны при внутривенном введении (14).

В России с применением этой технологии несколькими научными группами были получены рекомбинантные вирусы гриппа на основе высоко-

патогенного штамма А/кураца/Курган/05/2005 (H5N1) (клайд 2.2) (15-17). Вакцина на основе штамма гесPR8-H5N1 протестирована в остром эксперименте на цыплятах и показала эффективность в защите от гомологичного высокопатогенного вируса (15).

В Китае с 2004 года при помощи методов обратной генетики были созданы десятки вакцинных вирусов гриппа подтипа H5 для производства инактивированной вакцины. Вакцинный вирус гриппа H5-Re1, который получил гены гемагглютинина и нейраминидазы от изолята А/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1), начал использоваться в 2004 году и обеспечил надежную защиту от вирусов гриппа подтипа H5 клайда 0, клайда 1, клайда 2.2 и 2.3.4 (18). В марте 2008 года вирус H5-Re1 был заменен вирусом H5-Re5, который получил гены гемагглютинина и нейраминидазы от штамма А/duck/Anhui/1/2006 (H5N1). В связи с существенным изменением антигенных свойств циркулирующих вирусов подтипа H5 в 2015 году был разработан новый вакцинный штамм H5-Re8 на основе вирусов клайда 2.3.4.4b, который, в свою очередь, в 2018 году был обновлен до H5-Re11 (19).

Таким образом, из-за высокой мутационной изменчивости вирусов гриппа птиц подтипа H5 для обеспечения надежной защиты требуется обновление вакцинных штаммов в составе вакцинных препаратов. С 29 апреля 2021 года на территории Евразийского Экономического союза патент на метод обратной генетики прекратил действие (20), и этот метод стал открытым для получения штаммов, в том числе вакцинных штаммов вирусов гриппа для коммерческого использования.

В настоящей работе впервые описано создание рекомбинантного штамма вируса гриппа подтипа H5N1 клайда 2.3.4.4b с модифицированным гемагглютинином антигенно актуального вируса, выделенного на территории России в 2023 году. Мы показали, что сконструированный штамм обладает высокими производственными характеристиками в системе РКЭ и в клеточной культуре MDCK. Также мы впервые применили его в составе вакцины с добавлением гидроксида алюминия в качестве адъюванта для иммунизации целевых животных и установили, что вакцинация стимулирует выработку антител у цыплят 1-суточного возраста.

Нашей целью было конструирование методом обратной генетики вакцинного штамма-кандидата, который может быть использован для создания ветеринарной вакцины против современных вирусов высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5N1.

*Методика.* Исследование проводили в 2024 году в ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России. Все работы выполняли в условиях биологической безопасности для микроорганизмов III-IV групп патогенности, соблюдали требуемые ветеринарные, санитарные правила и нормы (21, 22). Источником РНК служил лизированный образец, содержащий генетический материал вируса А/черноголовая чайка/Сыктывкар/19987/2023 (H5N1). Амплификацию полноразмерных кДНК копий вирусных генных сегментов HA и NA осуществляли с использованием набора универсальных пар праймеров (Bm-HA-1/Bm-NS-890R: 5'-TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGC-AGGGG-3'/5'-ATATCGTCTCGTTATTATAGAAACAAGGGTGTPTTT-3' для HA и Ba-NA-1/Ba-NA-1413R: 5'-TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAG-GAGT-3'/5'-ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTPTTTT-3' для NA), описанных в работе (23).

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили с использованием набора ОТ-ПЦР Экстра микс (ООО «Биолабмикс», Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя на приборе Gentier 96E («Xi'an Tianlong Science and Technology,

Со., Ltd.», Китай). Температурный профиль реакции был следующим: 40 мин при 55 °С (ревертирование); 5 мин при 93 °С (активация полимеразы); 15 с при 93 °С, 3 мин при 68 °С (40 циклов амплификации); 4 мин при 72 °С (дополнительная элонгация). Полученные продукты ОТ-ПЦР клонировали в вектор рНВ2000, предназначенный для сборки вирусов гриппа методом обратной генетики (24).

Полученными плазмидами (лигазной смесью) трансформировали бактериальные клетки *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  (коллекция лаборатории векторных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России) по стандартному протоколу (25). Скрининг полученных колоний на наличие целевой вставки проводили методом ПЦР с использованием набора БиоМастер HS-Тақ ПЦР-Color (2 $\times$ ) (ООО «Биолабмикс», Россия) со служебными праймерами, фланкирующими ген-вставку (последовательности праймеров: INS-F: 5'-TGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTG-3', INS-R: 5'-CTAGAAGGCACAGTTCGAGGCTGATC-3'). Температурный профиль реакции: 5 мин при 95 °С (денатурация); 10 с при 95 °С; 10 мин при 55 °С, 2,5 мин при 72 °С (35 циклов). Нуклеотидную последовательность отобранных клонов верифицировали методом секвенирования по Сэнгеру (ЗАО «Евроген», Россия). Работу с нуклеотидными последовательностями проводили с использованием программного обеспечения UGENE v48.0 (ООО НЦИТ «УНИПРО», Россия).

Нуклеотидные последовательности генов HA и NA штамма А/черноголовая чайка/Сыктывкар/19987/2023 (H5N1) получали из базы данных ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ. Для модификации сайта расщепления HA осуществляли поиск нуклеотидных последовательностей близкородственных низкопатогенных вирусов гриппа А/H5N1 клайда 2.3.4.4b с использованием базы данных EpiFlu («GISAID», Германия). Нуклеотидные последовательности сайтов расщепления выбранных низкопатогенных вирусов использовали для модификации плазмиды, кодирующей ген HA, методом сайт-направленного мутагенеза (ЗАО «Евроген», Россия). Соответствие внесенных замен также подтверждали секвенированием.

Для сборки рекомбинантного вируса методом обратной генетики использовали смесь плазмид на основе вектора рНВ2000: модифицированный HA и NA подтипа H5N1 (описаны выше), а также плазмиды, кодирующие гены внутренних и неструктурных белков (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) высокопродуктивного штамма-донора А/PR/8/34 (H1N1) из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России. Смесь плазмид трансфицировали в ко-культуру клеток НЕК293FT/MDCK, выращенных в среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением стабильного глутамина (GlutaMAX, «Gibco», США), 1 мМ пирувата натрия (Sodium Pyruvate 100 mM, «Gibco», США), смеси пенициллин/стрептомицин/амфотерицин В (Anti-anti 100 $\times$ , «Gibco», США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия). В работе были использованы клетки НЕК293FT («Invitrogen», США) и клетки MDCK London Line, полученные из Международного ресурсного центра (International Reagent Resource, США). Для трансфекции использовали липосомы GenJect39 (ООО «Молекта», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Через 1 сут проводили смену среды на бессывороточную с ТРСК-трипсином («Sigma», США). Далее каждые сутки проверяли наличие цитопатического действия (ЦПД) вируса визуально (световой микроскоп AxioVert A1, «Carl Zeiss AG», Германия), а также контролировали появление вируса в культуральной среде с помощью реакции гемагглютинации (РГА).

Для накопления вируса 10-11-суточные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) заражали вирусосодержащим материалом в разных разведениях в объеме 0,2 мл в аллантоисную полость. Через 48 ч инкубации при 34 °С количество вируса, накопленного в аллантоисной жидкости, определяли в РГА и методом титрования инфекционной активности в РКЭ.

Для определения инфекционной активности в системе РКЭ из вирусосодержащей жидкости готовили серии 10-кратных разведений на DPBS (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением антибиотика-антимикотика. Каждым разведением заражали по 3-4 РКЭ. Через 48 ч инкубации определяли развитие инфекции в РГА с аллантоисной жидкостью. Расчет 50 % эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД<sub>50</sub>) проводили по методу L.J. Reed и H. Muench (26), представлены десятичные логарифмы 50 % эмбриональной инфекционной дозы (lg ЭИД<sub>50</sub>/мл).

Полногеномные нуклеотидные последовательности вируса получали методом секвенирования нового поколения по технологии «Illumina, Inc.» (США). Выделение вирусной РНК выполняли с использованием набора реагентов Qiagen RNeasy Mini kit («Qiagen GmbH», Германия). Для амплификации полного генома проводили ОТ-ПЦР по протоколу B. Zhou с соавт. (27) с использованием набора реагентов SuperScript III One-Step High Fidelity RT-PCR kit («Life Technologies», США). Полученные ампликоны очищали с помощью набора реагентов Qiagen QiaQuick PCR Purification kit («Qiagen GmbH», Германия). Для подготовки библиотеки был использован набор реагентов Illumina Nextera XT («Illumina, Inc.», США). Секвенирование проводили на платформе Illumina Miseq («Illumina, Inc.», США). Сборку полученных последовательностей на референс осуществляли в программе BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Для получения консенсусной последовательности использовали программу SamTools (<http://www.htslib.org/>).

Характерный для низкопатогенных вирусов гриппа птиц фенотип подтверждали по отсутствию репродукции в пермиссивной культуре клеток MDCK в отсутствие эндогенной трипсиноподобной протеазы. Использовали 96-луночные культуральные планшеты («Nunc A/S», Дания) с суточным монослоем клеток MDCK London Line, которые культивировали в питательной среде АльфаМЕМ с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки SC (ООО «БиолоТ», Россия). Из вирусосодержащей жидкости готовили серии 10-кратных разведений в культуральной среде АльфаМЕМ с добавлением антибиотика-антимикотика и ТРСК-трипсина в концентрации 2,5 мкг/мл (или без добавления трипсина). Учет результатов проводили визуально по наличию ЦПД.

Антигенные свойства вируса изучали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (28) со специфическими крысиными антисыворотками, полученными к вирусам гриппа А подтипа H5 различных лет выделения, и соответствующими вирусами из коллекции ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ (21). Титром антигемагглютинирующих антител считали наибольшее разведение сыворотки, в котором отсутствовала агглютинация.

Способность штамма вызывать формирование вирус-специфических антител оценивали на 1-суточных цыплятах кросса Декалб Уайт. Вирус накапливали в РКЭ, инактивировали формалином (0,1 %, 24 ч при +4 °С) и смешивали с гидроксидом алюминия (0,2 %). Животным вводили препарат вируса внутримышечно, 2-кратно с интервалом 14 сут. Доза составила 8,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/гол. Наличие антител оценивали в РТГА на 28-е сут после начала эксперимента.





Низкопатогенный фенотип вируса А/Н5N1\_НА20 подтверждали по отсутствию репродукции в высокопермиссивной культуре клеток MDCK в отсутствие эндогенной трипсиноподобной протеазы. При заражающей дозе 0,005-0,00005 ТИД<sub>50</sub>/клетка, в присутствии трипсина продуктивная инфекция развивалась в 83-100 % лунок. В отсутствие трипсина вирус А/Н5N1\_НА20 не вызывал продуктивную инфекцию ни для одной из исследованных заражающих доз (табл. 2). Полученные данные подтверждают, что внесенная модификация сайта расщепления обеспечила вирусу наличие трипсинозависимого фенотипа, характерного для низкопатогенных штаммов, как было показано ранее в аналогичных исследованиях (31).

### 1. Результаты слепых восстановительных пассажей рекомбинантных вирусов гриппа А/Н5N1, сконструированных методом обратной генетики

Вирус	Пассаж М0 (трансфекция) РГА/ЦПД	Пассаж Е1 (без разведения) РГА/ЭИД <sub>50</sub>	Пассаж Е2 (без разведения) РГА/ЭИД <sub>50</sub>
А/Н5N1_НА18	1 ГАЕ/100 %	2 ГАЕ/0,5 lg ЭИД <sub>50</sub>	0/нп
А/Н5N1_НА20	4 ГАЕ/100 %	32-128 ГАЕ/6,5 lg ЭИД <sub>50</sub>	*

Примечание. РГА — реакция гемагглютинации, ЦПД — цитопатогенное действие, ЭИД<sub>50</sub> — 50 % эмбриональная инфекционная доза, нп — не применимо; \* — вирус восстановлен после первого пассажа, дальнейшие пассажи см. таблицу 4.

### 2. Результаты оценки репродукции вируса А/Н5N1\_НА20 в культуре клеток MDCK в присутствии и в отсутствие трипсина

Множественность инфицирования, ТИД <sub>50</sub> /клетка	Цитопатическое действие (ЦПД), % разрушения монослоя									
	с добавлением трипсина					без добавления трипсина				
0,005	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,0005	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0
0,00005	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0

Антигенные свойства вируса А/Н5N1\_НА20 оценивали в РТГА с антисыворотками, специфичными к различным вирусам гриппа А подтипа Н5. Анализ показал, что вирус А/Н5N1\_НА20 не взаимодействовал с антисыворотками против ранних вариантов высокопатогенных вирусов гриппа подтипа Н5N1 (клайды 1, 2.2), при этом взаимодействовал с типоспецифической сывороткой к вирусам гриппа подтипа Н5 клайда 2.3.4.4.b (табл. 3). Полученные данные подтверждают антигенную специфичность и антигенную актуальность вируса А/Н5N1\_НА20.

### 3. Антигенный анализ штамма А/Н5N1\_НА20 (данные реакции торможения гемагглютинации РТГА)

Вирус	Подтип (клайд)	Крысиные антисыворотки против			
		NIBRG-14	A/chicken/Kurgan/5/2005	A/common tern/Uvs-Nuur/26/2016	A/black headed gull/Sykytyvkar/19987/2023
NIBRG-14	H5N1 (1)	640 <sup>a</sup>	40	< 10	< 10
A/chicken/Kurgan/5/2005	H5N1 (2.2)	40	160 <sup>a</sup>	< 10	< 10
A/common tern/Uvs-Nuur/26/2016	H5N8 (2.3.4.4b)	< 10	< 10	160 <sup>a</sup>	< 10
A/black headed gull/Sykytyvkar/19987/2023	H5N1 (2.3.4.4b)	< 10	< 10	80	320 <sup>a</sup>
А/Н5N1_НА20	H5N1 (2.3.4.4b)	< 10	< 10	40	160

Примечание. По главной диагонали (<sup>a</sup>) указаны титры против гомологичных вирусов.

Способность штамма А/Н5N1\_НА20 вызывать формирование вирусспецифических антител изучали на 10-суточных цыплятах. Введение инактивированного штамма А/Н5N1\_НА20, сорбированного на гидроксид алюминия, вызывало формирование антигемагглютинирующих антител у привитых птиц в среднегеометрическом титре 1:147 (доверительный интервал 100-216) после 1-кратного введения и 1:388 (доверительный интервал

242-622) после 2-кратного введения на 28-е сут после начала эксперимента.

Для оценки стабильности репродуктивных свойств вируса, получения рабочего банка, а также референс-культуры штамма рекомбинантного вируса A/H5N1\_HA20 проводили дополнительные пассажи в системе РКЭ (табл. 4). Уже начиная с третьего пассажи после трансфекции, вирус стабильно демонстрировал высокую репродуктивную активность. Материал пятого пассажи штамма был лиофилизирован в качестве референс-культуры. Отсутствие мутаций в генах гемагглютинина и нейраминидазы по сравнению с использованными для сборки вируса плазидами было подтверждено полногеномным секвенированием. Образцы референс-культуры депонированы в Государственной коллекции вирусов II-IV групп патогенности на базе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

#### 4. Характеристика репродуктивных свойств рекомбинантного вируса гриппа A/H5N1\_HA20 на протяжении пяти пассажей в системе растущих куриных эмбрионов (РКЭ)

Пассаж	Разведения, использованные для заражения РКЭ, и результирующие титры, ГАЕ										Титр, lg ЭИД <sub>50</sub> /мл	
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>		
E1	128	128	128	128	128	128	128 <sup>a</sup>					7,2
	128	128	128	128	128	128 <sup>a</sup>	128 <sup>a</sup>					
E2					64	64	32-64	0	0	0	0	7,2
					64	64	64 <sup>a</sup>	4-8	0	0	0	
E3						64	64	64	64			9,2
						64	64	64	128 <sup>a</sup>			
						64	64	128 <sup>a</sup>	64-128 <sup>a</sup>			
E4				128-256	128	256 <sup>a</sup>	256 <sup>a</sup>	128-256 <sup>a</sup>	0	0	0	8,2
				128	128-256	128	128	128	0	0	0	
E5							256	64	64	0	0	9,5
							64-128	128	256	32		
							128-256	128	64-128	0		

Примечание. В каждом пассаже число биологических повторностей (эмбрионов) не менее двух; <sup>a</sup> — эмбрионы, использованные для следующего пассажа.

В настоящее время вирусы гриппа подтипа H5N1 клайда 2.3.4.4b вызывают наибольший падеж диких и домашних сельскохозяйственных птиц на территории Российской Федерации (32). Для производства вакцин против высокопатогенного гриппа птиц в России используют различные вакцинные штаммы, которые, однако, не относятся к антигенно актуальной филогенетической группе 2.3.4.4b. Инактивированная вакцина ВНИИЗЖ-АвиФлуВак (ФГБУ ВНИИЗЖ, Россия) представляет собой инактивированный аминоэтилэтиленимином штамм Ямал подтипа H5N1 (33, 34). Штамм Ямал получен из низкопатогенного изолята A/wildduck/YaNAO/956-12/2021 (H5N1), который выделен в 2021 году и генетически удален от современных высокопатогенных вирусов (35). Тем не менее, по данным разработчиков, вакцина на его основе обеспечивает защиту от близкородственного современным штаммам вируса гриппа клайда 2.3.4.4 A/duck/KChR/1590-20/2020 (H5N8) (36).

Зарегистрированная в 2024 году инактивированная вакцина АВИ-ВАК-ГП-H5N1R (ООО НПП «АВИВАК», Россия) изготовлена из рекомбинантного штамма PR8-H5N1R (37), полученного по технологии, схожей с описываемой в настоящей статье. К сожалению, разработчики не приводят данных о генетической принадлежности гемагглютинина используемого штамма, поэтому сложно сделать заключение о его антигенной актуальности.

Наиболее часто в России применяется вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная Флу Протект H5 (ФКП «Ставрополь-

ская биофабрика», Россия) (38, 39), которая представляет собой классическую суспензию инактивированного формальдегидом патогенного полевого штамма Новосибирский в смеси с масляным адьювантом. Штамм Новосибирский (40) наиболее близок к изолятам с озера Цинхай (Западный Китай), выделенным в мае 2005 году во время вспышки гриппа у дикой водной птицы, которые принадлежат к генетическому клайду 2.2. Таким образом, штамм Новосибирский является представителем антигенно устаревшей группы вирусов. В связи с циркуляцией на территории Российской Федерации вирусов гриппа птиц А/Н5 клайда 2.3.4.4b возникает потребность обновления антигенного состава вакцины.

В настоящей работе мы сконструировали высокорепродуктивный рекомбинантный вакцинный штамм А/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1), содержащий гемагглютинин и нейраминидазу антигенно актуального эпидемического вируса гриппа птиц А/Н5N1 клайда 2.3.4.4b. При этом гемагглютинин был генетически модифицирован таким образом, чтобы обеспечить штамму фенотип низкопатогенных вирусов, что дает возможность нарабатывать вирус в РКЭ. Интересно, что из двух протестированных вариантов модификации только один оказался приемлемым. Несмотря на то, что у большинства родственных низкопатогенных вирусов имеется последовательность сайта расщепления, содержащая глутамин (QRETR), в нашем случае жизнеспособным оказался вирус, содержащий в соответствующем положении лейцин (LIETR). Полученные результаты подчеркивают не тривиальность задачи получения высокорепродуктивного рекомбинантного штамма А/Н5N1, которую ранее отмечали для реассортантов указанного подтипа (30).

Мы показали, что сконструированный в настоящей работе штамм А/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 взаимодействует с референсными антителами против вирусов гриппа подтипа H5N1 клайда 2.3.4.4b, а также способен вызывать формирование антигемагглютинирующих антител в среднегеометрическом титре 1:388 (8,5 log<sub>2</sub>) у привитых птиц при 2-кратном введении в составе инактивированной вакцины с добавлением в качестве адьюванта гидроксида алюминия до конечной концентрации 0,2 %. По данным литературы, для полноценной защиты птиц от высокопатогенного вируса гриппа необходимо формирование антител в титре не ниже, чем 1:32 в РТГА (5,0 log<sub>2</sub>) (34). Таким образом, полученные нами предварительные результаты свидетельствуют о пригодности штамма А/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) для разработки на его основе полноценного вакцинного препарата для защиты птиц от высокопатогенного вируса гриппа подтипа H5N1.

Итак, нами получены плазмиды, кодирующие нейраминидазу и модифицированный гемагглютинин высокопатогенного вируса гриппа птиц А/черноголовая чайка/Сыктывкар/19987/2023 (H5N1). Генно-инженерным методом последовательность сайта расщепления гемагглютинина заменена на мотив, характерный для современных низкопатогенных вирусов гриппа птиц А(Н5). Методом обратной генетики собран рекомбинантный вирус гриппа А/Syktvkar/PR8/6:2/HA20 (H5N1), представляющий собой реассортант с составом генома 6:2 на основе высокорепродуктивного донора А/PR/8/34 с поверхностными антигенами высокопатогенного вируса гриппа птиц А(Н5N1). Штамм обладал высокой репродуктивной активностью в куриных эмбрионах. Сыворотка к полученному штамму взаимодействовала с вирусами гриппа H5N1 клайда 2.3.4.4b. Полученный вирус может быть использован для создания ветеринарной вакцины против высокопатогенного

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
197022 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17,  
e-mail: mari.v.sergeeva@gmail.com, kira336@yandex.ru,  
anna\_e\_svododniy@mail.ru, biomalinka@mail.ru,  
suddenkovapolina@gmail.com;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный  
университет ветеринарной медицины,  
196084 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5,  
e-mail: tarlav1995@bk.ru ✉, vnivip1@mail.ru,  
vlad.veretennikov.96@mail.ru, kraskov-00@bk.ru

Поступила в редакцию  
9 февраля 2025 года  
Принята к публикации  
23 марта 2025 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2025, V. 60, № 6, pp. 1071-1084

## A CANDIDATE VACCINE STRAIN OF HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE A(H5N1) CONSTRUCTED BY REVERSE GENETICS METHODS

M.V. Sergeeva<sup>1</sup>, K.S. Kudrya<sup>1</sup>, M.A. Plotnikova<sup>1</sup>, V.V. Veretennikov<sup>2</sup>, E.D. Javadov<sup>2</sup>,  
D.A. Kraskov<sup>2</sup>, A.A. Ivanova<sup>1</sup>, P.A. Petrova<sup>1</sup>, N.V. Tarlavin<sup>2</sup> ✉

<sup>1</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, the Ministry of Health of the Russian Federation, 15/17, ul. Professora Popova, St. Petersburg, 197022 Russia, e-mail mari.v.sergeeva@gmail.com, kira336@yandex.ru, anna\_e\_svododniy@mail.ru, biomalinka@mail.ru, suddenkovapolina@gmail.com;

<sup>2</sup>Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5, ul. Chernigovskaya, St. Petersburg, 196084 Russia, e-mail tarlav1995@bk.ru (✉ corresponding author), vnivip1@mail.ru, vlad.veretennikov.96@mail.ru, kraskov-00@bk.ru

ORCID:

Sergeeva M.V. orcid.org/0000-0003-0411-9896

Kudrya K.S. orcid.org/0000-0003-4774-4294

Plotnikova M.A. orcid.org/0000-0001-8196-3156

Veretennikov V.V. orcid.org/0000-0001-9648-2259

Javadov E.J. orcid.org/0000-0002-1589-6300

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation grant № 24-76-10044, <https://rscf.ru/project/24-76-10044/>

Final revision received February 09, 2025

doi: 10.15389/agrobiol.2025.6.1071eng

Accepted March 23, 2025

### Abstract

The highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 actively circulates among domestic and wild poultry worldwide, causing widespread mortality. The primary methods of combating avian influenza include culling and vaccination. These measures have enabled control of the spread of the H5N1 influenza virus, reducing the number of new outbreaks and the viral load on the environment. Reverse genetics has become a widely used modern technology for creating vaccines against influenza A viruses. This study describes for the first time the creation of a recombinant strain of the H5N1 influenza virus subtype 2.3.4.4b with a modified hemagglutinin of an antigenically relevant virus isolated in Russia in 2023. We demonstrated that the constructed strain exhibits high production characteristics in the ECE (developing chicken embryos) system and in MDCK cell culture. We also used it for the first time in a vaccine with the addition of aluminum hydroxide as an adjuvant for immunization of target animals and found that vaccination stimulates antibody production in 1-day-old chickens. Our goal was to construct a candidate vaccine strain using reverse genetics that could be used to create a veterinary vaccine against modern highly pathogenic avian influenza viruses of the H5N1 subtype. The work was carried out in 2024 at the Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation. The RNA source was a lysed sample containing the genetic material of the A/black-headed gull/Sykytykvar/19987/2023 (H5N1) virus. Amplification of full-length cDNA copies of the HA and NA viral gene segments was carried out using a set of universal primer pairs. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the Extra Mix RT-PCR kit (Biolabmix LLC, Russia) and a Gentier 96E instrument (Xi'an Tianlong Science and Technology, Co., Ltd., China). The resulting products were cloned into the pHW2000 vector, designed for assembling influenza viruses by reverse genetics. *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  bacterial cells were transformed with plasmids. The nucleotide sequence of the selected clones was verified by Sanger sequencing (Eurogen CJSC, Russia). To modify the HA cleavage site, a search for nucleotide sequences of closely related low-pathogenic influenza A/H5N1 viruses of clade 2.3.4.4b was performed using the EpiFlu database (GISAID, Germany). The nucleotide sequences of the cleavage sites of the selected low-pathogenicity viruses were used to modify the plasmid encoding the HA gene by site-directed mutagenesis (Eurogen, Russia). To assemble the recombinant virus by reverse genetics, a

mixture of plasmids based on the pHW2000 vector was used: modified HA and NA of the H5N1 subtype (described above), as well as plasmids encoding the genes of internal and nonstructural proteins (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) of the highly reproductive donor strain A/PR/8/34 (H1N1). The plasmid mixture was transfected into a coculture of HEK293FT/MDCK cells grown in DMEM/F12 medium. GenJect39 liposomes (Molecta, Russia) were used for transfection. In 1 day, the medium was changed to a serum-free medium with TPCK-trypsin (Sigma, USA). Then, every day, the presence of cytopathic effect (CPE) of the virus was checked visually using an AxioVert A1 light microscope (Carl Zeiss AG, Germany), and the appearance of the virus in the culture medium was monitored using the hemagglutination assay (HA). To accumulate the virus, 10- to 11-day-old ECEs were infected with virus-containing material in various dilutions in a volume of 0.2 ml into the allantoic cavity. To determine the infectious activity in the ECE system, a series of 10-fold dilutions were prepared from the virus-containing fluid in DPBS (OOO BioloT, Russia) added with an antibiotic-antimycotic. Calculation of 50 % embryonic infectious dose (EID<sub>50</sub>) was performed according to the method of L.J. Reed and H. Muench and expressed as lg EID<sub>50</sub>/ml. Whole-genome nucleotide sequences of the virus were obtained by next-generation sequencing using Illumina, Inc. (USA). The phenotype characteristic of low-pathogenic avian influenza viruses was confirmed by the absence of replication in a permissive MDCK cell culture lacking endogenous trypsin-like protease. The antigenic properties of the virus were studied in a hemagglutination inhibition assay (HI assay) with specific rat antisera to influenza A H5 subtype viruses of various years of isolation and corresponding viruses from the collection of the Smorodintsev Research Institute of Influenza. The ability of the strain to induce the formation of virus-specific antibodies was assessed in 10-day-old Dekalb White chickens. A recombinant vaccine strain A/Sykytykvar/PR8/6:2/HA20 (H5N1), a reassortant with a 6:2 genome composition, was assembled using reverse genetics, based on the highly reproductive donor A/PR/8/34 with surface antigens of the highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1. The strain was deposited to the State Collection of Viruses. To evaluate the strain, an antigen analysis was performed with antisera obtained to influenza viruses of the H5N1 subtype of various clades circulating in Russia between 2000 and 2025. The analysis showed that the constructed strain does not interact with antisera to clades 1 and 2.2, and the interaction with the antiserum to clades 2.3.4.4b was lower than with the homologous serum. When assessing the stability of the developed vaccine strain, high virus reproduction in the ECE system was noted over 5 consecutive passages. The appearance of additional mutations in the viral genome was excluded by the sequencing method. An inactivated vaccine was constructed using the developed strain with the addition of aluminum hydroxide as a sorbent adjuvant at a final concentration of 0.2 %. A trial on Dekalb White chickens demonstrated the suitability of the developed strain as an antigen in a vaccine. When the vaccine was administered to 1-day-old chickens at a dose of 0.5 ml/head (the vaccination dose was 8.4 lg/head), the antibody titer after 28 days was 1:388 in the HI assay. This antibody titer significantly exceeds that required for stable and long-term protection (1:32 in the HI assay). Thus, the resulting recombinant influenza virus strain A/Sykytykvar/PR8/6:2/HA20 (H5N1) is fully suitable for the production of biopreparations for veterinary use, including inactivated vaccines.

Keywords: highly pathogenic avian influenza, vaccine, recombinant vaccines, reverse genetics, avian infectious diseases, plasmid construction, influenza A virus of the H5N1 subtype.

## REFERENCES

1. Chen W., Zhang X., Zhao W., Yang L., Wang Z., Bi H. Environmental factors and spatiotemporal distribution characteristics of the global outbreaks of the highly pathogenic avian influenza H5N1. *Environmental Science and Pollution Research*, 2022, 29(29): 44175-44185 (doi: 10.1007/s11356-022-19016-1).
2. Cui P., Shi J., Wang C., Zhang Y., Xing X., Kong H., Yan C., Zeng X., Liu L., Tian G., Li C., Deng G., Chen H. Global dissemination of H5N1 influenza viruses bearing the clade 2.3.4.4b HA gene and biologic analysis of the ones detected in China. *Emerging Microbes and Infections*, 2022, 11(1): 1693-1704 (doi: 10.1080/22221751.2022.2088407).
3. WAHIS. *High Pathogenicity Avian Influenza (HPAI) – Situation Report*. Available: <https://www.woah.org/en/document/high-pathogenicity-avian-influenza-hpai-situation-report-65/>. No date.
4. Dzhavadov E.D., Dmitrieva M.E. *Gripp ptits* [Bird flu]. St. Petersburg, 2011 (in Russ.).
5. Peacock T.P., Moncla L., Dudas G., VanInsberghe D., Sukhova K., Lloyd-Smith J.O., Worobey M., Lowen A.C., Nelson M.I. The global H5N1 influenza panzootic in mammals. *Nature*, 2025, 637(8045): 304-313 (doi: 10.1038/s41586-024-08054-z).
6. Mostafa A., Naguib M.M., Nogales A., Barre R.S., Stewart J.P., Garcia-Sastre A., Martinez-Sobrido L. Avian influenza A (H5N1) virus in dairy cattle: origin, evolution, and cross-species transmission. *MBio*, 2024, 15(12): e0254224 (doi: 10.1128/mbio.02542-24).
7. Agüero M., Monne I., Sánchez A., Zecchin B., Fusaro A., Ruano M.J., Arrojo M.D.V., Fernández-Antonio R., Souto A.M., Tordable P., Cañas J., Bonfante F., Giussani E., Terregino C., Orejas J.J. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Eurosurveillance*, 2023, 28(3): 2300001 (doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.3.2300001).

8. Spackman E., Jones D.R., McCoig A.M., Colonus T.J., Goraichuk I.V., Suarez D.L. Characterization of highly pathogenic avian influenza virus in retail dairy products in the US. *Journal of Virology*, 2024, 98(7): e0088124 (doi: 10.1128/jvi.00881-24).
9. Swayne D.E., Sims L.D., Brown I., Harder T., Stegeman A., Abolnik C., Delgado M., Awada L., Pavade G., Torres G. Strategic challenges in the global control of high pathogenicity avian influenza. *Revue Scientifique et Technique*, 2024(Special Edition): 89-102 (doi: 10.20506/rst.SE.3563).
10. *Global strategy for the prevention and control of highly pathogenic avian influenza (2024-2033)*. FAO and WOAHP, 2024. Available: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/6fff62da-80e1-43ab-94ee-3a5b69940b7c/content>. No date.
11. Zakharaova O.I., Burova O.A., Toropova N.N., Yashin I.V., Blokhin A.A. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka*, 2022, 23(3): 295-306 (doi: 10.30766/2072-9081.2022.23.3.295-306) (in Russ.).
12. *DNA transfection system for the generation of infectious influenza virus*. Hoffman E. WO/2001/083794. Available: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2001083794>. No date.
13. Neumann G., Ozawa M., Kawaoka Y. Reverse genetics of influenza viruses. In: *Methods in molecular biology*, vol. 865. Y. Kawaoka, G. Neumann (eds.). Humana Press, 2012: 193-206 (doi: 10.1007/978-1-61779-621-0\_12).
14. Subbarao K., Chen H., Swayne D., Mingay L., Fodor E., Brownlee G., Xu X., Lu X., Katz J., Cox N., Matsuoka Y. Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology*, 2003, 305(1): 192-200 (doi: 10.1006/viro.2002.1742).
15. Zaberezhniy A.D., Grebennikova T.V., Vorkunova G.K., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Norkina S.N., Aliper T.I., Nepoklonov E.A., L'vov D.K. *Voprosi virusologii*, 2014, 59(6): 23-27 (in Russ.).
16. Sergeeva M.V., Krokhin A., Matrosovich M., Matrosovich T., Volshek M., Kiselev O.I., Romanova Yu.R. *Microbiology Independent Research Journal*, 2014, 1(1): 1-11 (doi: 10.18527/2500-2236-2014-1-1-1-11) (in Russ.).
17. Timofeeva T.A., Sadikova G.K., Lomakina N.F., Gambaryan A.S., Rudneva Ya., Timofeeva E.B., Shilov A.A., Boravleva E.Yu., Zhuravleva M.M., Ivanov P.A., Ryazanova E.L., Prilipov A.G. *Molekulyarnaya biologiya*, 2020, 54(6): 980-989 (doi: 10.31857/S0026898420060129) (in Russ.).
18. Tian G., Zeng X., Li Y., Shi J., Chen H. Protective efficacy of the H5 inactivated vaccine against different highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated in China and Vietnam. *Avian Diseases*, 2010, 54(s1): 287-289 (doi: 10.1637/8707-031709-ResNote.1).
19. Zeng X., He X., Meng F., Ma Q., Yan W., Bao H., Liu Y., Deng G., Shi J., Li Y., Tian G., Chen H. Protective efficacy of an H5/H7 trivalent inactivated vaccine (H5-Re13, H5-Re14, and H7-Re4 strains) in chickens, ducks, and geese against newly detected H5N1, H5N6, H5N8, and H7N9 viruses. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(7): 2086-2094 (doi: 10.1016/S2095-3119(22)63904-2).
20. Gofman E. *Sistema transfektsii DNK dlya polucheniya infektsionnogo virusa gripa. Evraziyskiy patent na izobretenie № 006311* [DNA transfection system for producing infectious influenza virus. Eurasian patent for invention No. 006311]. Available: <https://www.eapo.org/ru/patents/reestr/patent.php?id=6311>. No date (in Russ.).
21. *eterinarnie pravila peremeshcheniya, khraneniya, pererabotki i utilizatsii biologicheskikh otkhodov (utv. prikazom Minsel'khoza Rossii ot 26 oktyabrya 2020 goda N 626)* [Veterinary rules for the movement, storage, processing and disposal of biological waste (approved by order of the Ministry of Agriculture of Russia dated October 26, 2020 N 626)]. Available: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202010300035>. No date (in Russ.).
22. *Sanitarnie pravila i normi SanPiN 3.3686-21 «Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya po profilaktike infektsionnykh bolezney» (utv. postanovleniem Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF ot 28 yanvarya 2021 g. № 4)* [Sanitary rules and regulations SanPiN 3.3686-21 "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases" (approved by Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation dated January 28, 2021 No. 4)]. Available: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202102180019>. No date (in Russ.).
23. Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, 146(12): 2275-2289 (doi: 10.1007/s007050170002).
24. Hoffmann E., Webster R.G. Unidirectional RNA polymerase I-polymerase II transcription system for the generation of influenza A virus from eight plasmids. *Journal of General Virology*, 2000, 81(12): 2843-2847 (doi: 10.1099/0022-1317-81-12-2843).
25. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, 96(1): 23-28 (doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-p).
26. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Hygiene*, 1938, 27: 493-497.
27. Zhou B., Donnelly M.E., Scholes D.T., St George K., Hatta M., Kawaoka Y., Wentworth D.E. Single-reaction genomic amplification accelerates sequencing and vaccine production for classical

- and swine origin human influenza A viruses. *Journal of Virology*, 2009, 83(19): 10309-10313 (doi: 10.1128/JVI.01109-09).
28. Hirst G.K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *Journal of Experimental Medicine*, 1942, 75(1): 49-64 (doi: 10.1084/jem.75.1.49).
  29. Horimoto T., Takada A., Fujii K., Goto H., Hatta M., Watanabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Ito M., Tagawa-Sakai Y., Yamada S., Ito H., Ito T., Imai M., Itamura S., Odagiri T., Tashiro M., Lim W., Guan Y., Peiris M., Kawaoka Y. The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 2006, 24(17): 3669-3676 (doi: 10.1016/j.vaccine.2005.07.005).
  30. Horimoto T., Murakami S., Muramoto Y., Yamada S., Fujii K., Kiso M., Iwatsuki-Horimoto K., Kino Y., Kawaoka Y. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology*, 2007, 366(1): 23-27 (doi: 10.1016/j.virol.2007.07.002).
  31. Shi H., Liu X.F., Zhang X., Chen S., Sun L., Lu J. Generation of an attenuated H5N1 avian influenza virus vaccine with all eight genes from avian viruses. *Vaccine*, 2007, 25(42): 7379-7384 (doi: 10.1016/j.vaccine.2007.08.011).
  32. Pyankova O.G., Susloparov I.M., Moiseeva A.A., Kolosova N.P., Onkhonova G.S., Danilenko A.V., Vakalova E.V., Shendo G.L., Nekeshina N.N., Noskova L.N., Demina J.V., Frolova N.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Isolation of clade 2.3.4.4b A(H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Eurosurveillance*, 2021, 26(24): 2100439 (doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100439).
  33. Moroz N.V., Frolov S.V., Irza V.N., Shcherbakova L.O., Kulakov V.Yu. *Veterinariya segodnya*, 2024, 13(3): 248-254 (doi: 10.29326/2304-196X-2024-13-3-248-254) (in Russ.).
  34. Moroz N.V., Frolov S.V., Kulakov V.Yu., Konstantinov A.V. *Effektivnoe zhivotnovodstvo*, 2023, 5(187): 58-61 (in Russ.).
  35. Zhestkov P.D. *Biologicheskie svoystva virusov grippa ptits podtipov H5 i H7 i sovershenstvovanie sredstv laboratornoy diagnostiki. Kandidatskaya dissertatsiya* [Biological properties of avian influenza viruses of subtypes H5 and H7 and improvement of laboratory diagnostic tools. PhD Thesis]. Vladimir, 2024 (in Russ.).
  36. Moroz N.V., Frolov S.V., Zhestkov P.D., Andreychuk D.B., Chvala I.A., Ruchnova O.I. *Shtamm «Yamal» virusa grippa ptits roda Alphainfluenzavirus vida Influenza A virus podtipa H5N1 dlya izgotovleniya biopreparatov dlya spetsificheskoy profilaktiki grippa ptits tipa A podtipa N5. FGBU «VNIIZZh». Patent RF 2796987. Opubl. 30.05.2023. Byul. № 16* [Strain “Yamal” of the avian influenza virus of the genus Alphainfluenzavirus, species Influenza A virus, subtype H5N1 for the production of biological products for the specific prevention of avian influenza type A, subtype H5. FSBI “ARRIAH”. RF patent 2796987. Publ. 05/30/2023. Bull. No. 16] (in Russ.).
  37. *Instruktsiya po veterinarnomu primeneniyu vaksini «AVIVAK-GP-N5N1R» (ot 19.09.2024)* [Instructions for veterinary use of the vaccine “AVIVAC-GP-N5N1R” (dated 09/19/2024)]. Available: <https://galen.vetrf.ru/files/c2963fbf-5737-47ad-a92a-b8fd9735ae37>. No date (in Russ.).
  38. Osipova N.I. *Veterinariya. Referativniy zhurnal*, 2007, 4: 1145 (in Russ.).
  39. Irza V.N., Volkov M.S., Varkentin A.V., Frolov S.V., Altunin D.A. *Ptitsa i ptitseprodukti*, 2017, 6: 12-15 (in Russ.).
  40. Borisov A.V., Borisov V.V., Gruzdev K.N., Drigin V.V., Manin T.B., Nepoklonov E.A., Starov S.K., Frolov S.V. *Shtamm «Novosibirskiy» virusa grippa ptits Influenzae virus avicum dlya kontrolya immunogennoy i antigennoy aktivnosti vaksini i izgotovleniya biopreparatov dlya diagnostiki i spetsificheskoy profilaktiki grippa ptits. FGBU «VNIIZZh». Patent RF 2323740. Opubl. 10.05.2008, Byul. № 13* [The “Novosibirsk” strain of the avian influenza virus Influenzae virus avicum for monitoring the immunogenic and antigenic activity of vaccines and the production of biological products for the diagnosis and specific prevention of avian influenza. FSBI “ARRIAH”. RF patent 2323740. Publ. 05/10/2008, Bull. No. 13] (in Russ.).