

УДК: 619:616.98:578.831.11:615.371
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.1.41

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНОВ ВИРУСА VII И II ГЕНОТИПА

Мороз Н.В. – канд. ветеринар. наук, зав. лаб. (orcid.org/0000-0002-9672-8594);
Долгов Д.Л. – канд. ветеринар. наук, зав. сект. лаб. (orcid.org/0009-0009-5177-953X);
Комаров И.А. – мл. научн. сотр. (orcid.org/0000-0002-2084-4484); **Кулаков В.Ю.** – канд.
ветеринар. наук, вед. научн. сотр. (orcid.org/0000-0002-1898-4576); **Вершинина М.А.** –
асп. (orcid.org/0009-0002-6406-9229).

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

*moroz@arriah.ru

Ключевые слова: ньюкаслская болезнь, вирус ньюкаслской болезни, инактивированная вакцина, антитела, антигенное родство.

Key words: Newcastle disease, Newcastle disease virus, inactivated vaccine, antibodies, antigenic affinity.

Поступила: 27.02.2024

Принята к публикации: 25.03.2024

Опубликована онлайн: 02.04.2024



РЕФЕРАТ

В настоящее время ньюкаслская болезнь широко распространена во многих странах Евразии, Африки и Америки и наносит значимый экономический ущерб птицеводству. В Российской Федерации ежегодно регистрируются новые неблагополучные по ньюкаслской болезни пункты, кроме того, увеличилось количество хозяйств с бессимптомным течением на привитом поголовье с проявлением высоких титров специфических антител, снижением продуктивности и сохранности. Это связывают с эволюцией вируса, в процессе которой возникают новые генотипы, представленные высоковирулентными штаммами. Так, начиная с 2019 года в России в очагах ньюкаслской болезни выделяют субгенотип VII-L, против которого имеющиеся на рынке вакцины не обеспечивают полноценной защиты ввиду несоответствия антигенных свойств между вакцинными штаммами и данным субгенотипом. Создание вакцины на основе субгенотипа VII-L позволит обеспечить защиту стад домашней птицы против ньюкаслской болезни, вызываемой новыми изолятами возбудителя. На цыплятах кросса «Хайсекс Браун» в возрасте 30 сут. исследовали иммунологические свойства эмульсионных инактивированных вакцин против ньюкаслской болезни на основе антигенов вируса генотипов VII (штамм «ВНИИЗЖ G7») и генотипа II (штамм «Ла-Сота»). Были протестированы различные иммунизирующие дозы антигенов. Оценивали уровень гуморального иммунитета (титр антител в РТГА), а также протективный эффект (PD50) вакцин после заражения высоковирулентным штаммом вируса генотипа VII. Было установлено, что антигенная активность и протективный эффект обоих препаратов зависели от концентрации антигенов в прививном объеме. Оценки титров антител всегда были выше при использовании в РТГА гомологичных антиге-

нов. В остром опыте показатели протективного эффекта (PD50) составили: 1:105 и 1:50 у препаратов на основе антигена вируса «ВНИИЗЖ G7» и на основе антигена вируса «Ла-Сота», соответственно. Установили, что при сравнении одинаковых доз антигенов иммунологические показатели вакцины на основе антигена из штамма «ВНИИЗЖ G7» были выше. Двустороннее родство испытанных антигенов составило 18,3%.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

В эпизоотиях ньюкаслской болезни (НБ), поразивших промышленное птицепоголовье Центральной Европы в конце 80-х годов XX столетия, были выделены вирусные изоляты, имеющие генетическую общность, которые впоследствии были отнесены к генотипу VII [1]. В последующие 30 лет представители данной генетической группы распространились практически по всему миру, включая Южную Америку и Китай [2]. В РФ в 2019 году в 17 очагах НБ был выделен субгенотип VII-L [3]. Проведенный в том же году силами лаборатории диагностики вирусных болезней птиц (ФГБУ ВНИИЗЖ) обширный серомониторинг показал наличие антител к вирусу НБ в 39% образцов у не прививавшихся дворовых кур и высокую серопревалентность синантропных птиц [4]. По данным ИАЦ Россельхознадзора на 21.08.2023 г. на территории РФ нездоровленными остаются 6 очагов НБ [5].

Рассмотренная информация свидетельствует о необходимости специфической профилактики НБ и целесообразности проведения доказательного анализа эффективности используемых препаратов. Задачей настоящих исследований являлась сравнительная оценка иммунологических свойств двух вариантов инактивированных вакцин, изготовленных на основе антигенов вируса НБ штамма «ВНИИЗЖ G7» генотипа VII и штамма «Ла-Сота» генотипа II.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Вирусы. В эксперименте были использованы: – вирус НБ генотипа VII субгенотипа VII.1.1. штамм NDV/by/chicken/612/2022 (в тексте: «ВНИИЗЖ G7»); – вирус НБ генотипа II штамма «Ла-Сота» (в тексте: «Ла-Сота»). Вирусными материалами являлись образцы экстраэмбриональной жидкости (ЭЭЖ), получен-

ные после инфицирования СПФ-эмбрионов кур (VALO BioMedia GmbH, Германия).

Вирусные антигены. Вирусные материалы инактивировали аминокэтилэтилендиаминном (0,25%) в течение 24 ч. при температуре 37 °С. Титр антигена определяли в реакции гемагглютинации (РГА) [6] и выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ). Антигены «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» содержали $9 \log_2$ ГАЕ/0,1 см³ (5120 ГАЕ/см³) и $10 \log_2$ ГАЕ/0,1 см³ (10240 ГАЕ/см³) соответственно.

Вакцины. На основе вирусных антигенов и масляного адьюванта (Montanide ISA 70 VG, SEPPIC, Франция) готовили образцы эмульсионных вакцин. Каждый образец содержал антиген в заданной концентрации (разведении). Испытывали образцы, имеющие концентрацию антигена (D): 1(цельный); 1/25 и 1/50. Антиген объединяли с масляным адьювантом в соотношении 30:70 (по весу) и эмульгировали.

Иммунизация птиц. Использовали цыплят яичного кросса «Ломан Браун» из хозяйства, благополучного по острым инфекционным болезням, в возрасте 4 недель, серонегативных к вирусу НБ. Каждый образец вакцины испытывали на отдельной группе птиц. Вакцину вводили внутримышечно в объеме 0,5 см³ в область груди. В контрольной группе птиц не иммунизировали.

Оценка напряженности поствакцинального гуморального иммунитета. В реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [6] в сыворотках крови птиц, полученных через 28 сут. после вакцинации (п\в), определяли титр антител к вирусу НБ.

Контрольное заражение. Для заражения использовали вирулентный вирус НБ шт. «ВНИИЗЖ G7». Вакцинированных и контрольных птиц заражали через 28 сут. п\в. Вирусный материал вводили в дозе

6,0 IgЭИД₅₀/0,5 см³ внутримышечно в область бедра. В течение последующих 10 сут. контролировали клиническое состояние зараженной птицы.

Обработка данных. Вычислительные операции и графические построения выполняли в приложении Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Оценками напряженности поствакцинального гуморального иммунитета слу-

жи установленные в РТГА средние логарифмические титры антител к вирусу НБ (Т). Для постановки реакции параллельно использовали антигены «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота». Результаты клинических наблюдений в группах после контрольного заражения выражали в виде клинических показателей и индексов защиты. Установленные величины приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели иммунологического действия инактивированных вакцин против НБ на основе антигенов «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота»

Оценки показателей соответственно испытанным препаратам и дозам антигенов					
Вакцина на основе антигена	Доза антигена (D)	результаты РТГА соответственно антигену		Клинический показатель	Индекс защиты
		log ₂ (T±S)**			
	D* (lg D)	«Ла-Сота»	«ВНИИЗЖ G7»	(∑c)/n***	P=1-(∑c)/n
«ВНИИЗЖ G7»	1 (0)	3,55±0,3	5,60±0,6	0/10	1,0
	1:25 (1,40)	3,33±0,3	5,67±0,6	0/10	1,0
	1:50 (1,70)	3,43±0,5	5,43±0,7	3/10	0,7
	1:100 (2,00)	1,25±0,3	3,00±0,6	5/10	0,5
«Ла-Сота»	1(0)	6,00±0,4	3,61±0,4	0/10	1,0
	1:25 (1,40)	6,00±0,6	3,44±0,4	2/10	0,8
	1:50 (1,70)	4,33±0,4	2,83±0,4	7/10	0,3
	1:100 (2,00)	3,50±0,8	1,83±0,3	7/10	0,3
контроль	не вакцинирован	2,10±1,6	1,8±1,2	10/10	0,0

* - величина разведения антигена в составе препарата (D=1 обозначен не разведенный антиген);

** - средний логарифмический титр антител и соответствующее стандартное отклонение, установленные перед заражением птиц;

*** ∑c - суммарное количество клинически больных и погибших особей за период наблюдений; n – число птиц в группе до заражения.

Таблица 2 – Прогнозируемые дозы вирусных антигенов, обеспечивающих защиту 50% (PD₅₀; PA₅₀) и 95% (PD₉₅; PA₉₅) иммунизированных птиц

Антиген	lgPD ₅₀ *	PD ₅₀	PA ₅₀ , ГАЕ	lgPD ₉₅	PD ₉₅	PA ₉₅ , ГАЕ
«ВНИИЗЖ G7»	3,817/1,890 = 2,02	1:105	8,13	(3,817-1,279)/1,890 = 1,34	1:22	38,79
«Ла-Сота»	3,736/2,200 = 1,70	1:50	34,13	(3,736-1,279)/2,200 = 1,12	1:13	131,28

* - рассчитаны по регрессионным уравнениям для f₅₀ = lg(0,5/(1-0,5)) = 0 и f₉₅ = lg(0,95/(1-0,95)) = 1,279

Из данных таблицы следует: а) антигенная активность и протективный эффект обоих препаратов зависели от концентрации антигенов в прививном объеме; б) оценки титров антител всегда были выше при использовании в РТГА гомологичных антигенов; в) препарат на основе антигена «ВНИИЗЖ G7» (гомологичный заражающему штамму) демонстрировал больший протективный эффект.

Исследовали зависимость между дозой антигена и индексом защиты. Для приближения зависимости к линейному виду использовали формулу Берксона [7, с. 267], позволяющую получить линейные эквиваленты индексов: $f = \log(P/(1-P))$. Для значений $P = 1$, приняли условные оценки $P_1 = (1 - 1/5n)$ [8, с. 246]. Использовали регрессионный анализ. Построенные модели (уравнения) регрессии f по $\lg D$ для антигенов «ВНИИЗЖ G7» (1) и «Ла-Сота» (2) имели вид: 1) $f = (-1,890) \lg D + 3,817$; $R^2 = 0,836$ и 2) $f = (-2,200) \lg D + 3,736$; $R^2 = 0,915$, где: f - ожидаемый эквивалент для заданного значения $\lg D$. Используя приведенные уравнения произвели расчет прогнозируемых доз антигенов, обеспечивающих защиту 50% (PD_{50}) и 95% (PD_{95}) вакцинированных птиц. Кроме этого, вычислили соответствующие концентрации в единицах гемагглютинации (РА, ГАЕ). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 демонстрирует, что для достижения защиты 50% вакцинированных

птиц антигена «ВНИИЗЖ G7» требовалось меньше, чем антигена «Ла-Сота», как в относительных единицах ($105/50=2,10$), так и в ГАЕ ($34,13/8,13=4,20$). Аналогичное сравнение для достижения 95% защиты показало следующие соотношения $22/13 = 1,70$ и $131,28/38,79 = 3,40$.

На основании данных РТГА исследовали антигенную родственность штаммов «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота». Анализировали результаты наибольших иммунизирующих доз. Использовали стандартную процедуру Архетти и Хорсвала, в соответствии с которой для двух антигенов и двух сывороток в гомо- и гетерологичных реакциях (hom и het) определяли значения титров (T_{hom} и T_{het}), оценивали два отношения (r_1 и r_2) вида $r = T_{het} / T_{hom}$, и вычисляли результирующий процентный показатель $R = 100\sqrt{r_1 \times r_2}$.

Расчеты выполняли с использованием логарифмов. Полученные результаты приведены в таблице 3.

Результаты, представленные в таблице 3, показали, что обе оценки $\log_2(r)$ по критерию двух стандартных отклонений были статистически значимы ($p < 0,05$), что позволило считать показатель $R=18,3\%$ достоверной оценкой двустороннего антигенного родства между штаммами «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» вируса НВ.

Таблица 3 – Оценка двустороннего антигенного родства (R) в РТГА между штаммами «ВНИИЗЖ G7» и «Ла-Сота» вируса НВ *

Вариант реакции**	$\log_2 T$	$\log_2(r) = \log_2 T_{het} - \log_2 T_{hom}$	$R^{***} = \times 100 (\%)$
hom: s («ВНИИЗЖ G7») × a («ВНИИЗЖ G7»)	5,67±0,6	- 2,34±0,67	18,3 (13,0 ÷ 25,7) [#]
het: s («ВНИИЗЖ G7») × a («Ла-Сота»)	3,33±0,3		
hom: s («Ла-Сота») × a («Ла-Сота»)	6,00±0,6	- 2,56±72	
het: s («Ла-Сота») × a («ВНИИЗЖ G7»)	3,44±0,4		

* - по результатам испытания наибольших иммунизирующих доз (данные из таблицы 1);

** - hom, het - гомо- и гетерологичные реакции; s - сыворотка; a - антиген;

*** - $\log_2 R = [\log_2(r)_1 + \log_2(r)_2]/2$;

- в скобках указаны границы ошибки измерения R.

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Вирус НБ является РНК-содержащим, что предполагает высокую частоту ошибок считывания генома при репликации [9]. Это объясняет быструю эволюцию возбудителя. Например, установлено, что наследуемая вариация структуры эпитопа гемагглютинин-нейраминидазы произошла в течение 6 лет у 22 из 56 изолятов вируса НБ [10]. Таким образом антигенная удаленность вакцинных и полевых штаммов, может быть, одной из главных причин снижения эффективности вакцин против НБ, применяемых на практике. Кроме этого известно, что иммунные сыворотки, полученные после вакцинации птиц антигеном штамма «Ла-Сота», тестируемые в РТГА с гомо- и гетерологичными антигенами (штаммов генотипа VII) демонстрировали значительные различия [11]. Это предполагает, что для оценки поствакцинального иммунитета птиц против НБ целесообразно использовать в РТГА антигены актуальных эпизоотических штаммов вируса.

Эмульсионная инактивированная вакцина против НБ, изготовленная на основе антигена из штамма «ВНИИЗЖ G7», по изученным свойствам (интенсивности гуморальной иммунной реакции и протективному действию против вируса генотипа VII) продемонстрировала более высокие показатели, чем аналогичный препарат на основе антигена из штамма «Ла-Сота».

IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF INACTIVATED NEWCASTLE DISEASE VACCINES BASED ON VIRUS OF VII AND II GENOTYPES

Moroz N.V. – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Laboratory of Prophylaxis of Avian Diseases, (orcid.org/0000-0002-9672-8594), **Dolgov D.L.** – Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Inactivated Vaccines Sector of Laboratory of Prophylaxis of Avian Diseases (orcid.org/0009-0009-5177-953X), **Komarov I.A.** – Junior Research Scientist of Inactivated Vaccines Sector of Laboratory of Prophylaxis of Avian Diseases (orcid.org/0000-0002-2084-4484), **Kulakov V.J.** – Leading Research Scientist

of Live Vaccines Sector of Laboratory of Prophylaxis of Avian Diseases (orcid.org/0000-0002-1898-4576), **Vershinina M.A.** – PG student of Laboratory of Prophylaxis of Avian Diseases (orcid.org/0009-0002-6406-9229)

FGBI «Federal Center for Animal Health» (FGBI «ARRIAH»)

*moroz@arriah.ru

ABSTRACT

Newcastle disease (ND) is now widely spread in many countries of Eurasia, Africa and the Americas and causes significant economic damage to poultry farming. New ND-infected localities are reported in the Russian Federation every year; besides, the number of farms with vaccinated poultry demonstrating high specific antibody titres, decreased performance and survivability while being asymptomatic has increased. This is attributed to the virus evolution leading to the emergence of new genotypes represented by highly virulent strains. Since 2019, subgenotype VII-L has been isolated from Newcastle disease outbreaks in Russia. The vaccines currently available on the market do not confer appropriate protection against it due to the lack of antigenic matching between vaccine strains and this subgenotype. The development of a vaccine based on subgenotype VII-L will allow to ensure protection of poultry flocks against Newcastle disease caused by new NDV isolates. The immunological properties of emulsion inactivated vaccine against Newcastle disease based on genotype VII NDV (ARRIAH G7 strain) antigen were studied in 30-day-old Hisex Brown chickens. A similar vaccine based on genotype II NDV LaSota strain antigen was used as control. Tests of different immunizing antigen doses were carried out. The vaccines were tested for induced humoral immunity level (HI antibody titres), as well as for protective effect (protective index) after challenge with a highly virulent genotype VII NDV strain. The tests revealed that the antigenic activity and protective effect of both vaccines depended on the antigen concentration in the

inoculation volume. Antibody titres were always higher when homologous antigens were used in HI tests. The vaccine based on the antigen of ARRIAH G7 strain (homologous to the challenge strain) was more effective than the control vaccine. Less ARRIAH G7 strain antigen was required to protect 50% of vaccinated poultry, compared with LaSota strain antigen. The comparative assessment of the same doses of the antigens showed that the vaccine based on ARRIAH G7 strain antigen had better immunological properties. The tested antigens demonstrated 18.3% bilateral affinity.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Dimitrov K.M., Claudio L.A., Qingzhong Yu, Patti J.M. Newcastle disease vaccines – A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*. 2017; 206:126-136. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113516308045?via%3Dihub> (дата обращения: 23.10.2023).

2. Lomniczi B., Wehmann E., Herczeg J., Ballagi-Pordany A., Kaleta E.F., Werner O, et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology*. 1998; 143:49-64. URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s007050050267?utm_source=getftr&utm_medium=getftr&utm_campaign=getftr_pilot (дата обращения: 23.10.2023).

3. Фролов С.В., Мороз Н.В., Чвала И.А., Ирза В.Н. Эффективность вакцин против ньюкаслской болезни производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» в отношении актуальных вирусов VII генотипа. *Ветеринария сегодня*. 2021;1(1):44-51. URL: <https://veterinary.ariah.ru/jour/article/view/543> (дата обращения: 23.10.2023).

4. Волкова М.А., Чвала Ир.А., Осипова О.С., Кулагина М.А., Андрейчук Д.Б. Серологический мониторинг гриппа птиц и ньюкаслской болезни в Российской Федерации в 2019 году. *Ветеринария сегодня*. 2020;(2):76-82. URL: <https://veterinary.ariah.ru/jour/article/view/471> (дата обращения: 23.10.2023).

5. Россельхознадзор. Информация по бо-

лезни Ньюкасла в Российской Федерации. Вспышки болезни Ньюкасла на территории РФ в 2023 г. (по данным на 21.08.2023); URL: <https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/maps/2023/21-08/bn.pdf> (дата обращения: 23.10.2023).

6. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). Chapter 3.3.14. *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 12-th ed. 2023. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm (дата обращения: 23.10.2023).

7. Ван дер Ваден Б. Л. Математическая статистика. Москва: Издательство иностранной литературы; 1960. 434 с. URL: https://www.studmed.ru/van-der-warden-vl-matematicheskaya-statistika_5edc08a882c.html (дата обращения: 23.10.2023).

8. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. Москва: Медицина; 1975. 297 с. URL: https://www.studmed.ru/urbah-vyu-statisticheskij-analiz-v-biologicheskikh-i-medicinskih-issledovaniyah_732e15c6942.html (дата обращения: 23.10.2023).

9. Жданов В.М. Эволюция вирусов. Москва: Медицина. 1990, 376 с. URL: https://www.studmed.ru/zhdanov-vm-evolyuciya-virusov_718275230fd.html (дата обращения: 23.10.2023).

10. Sun-Hee Cho, Hyuk-Joon Kwon, Tae-Eun Kim, Jae-Hong Kim, Han-Sang Yoo, Sun-Joong Kim. Variation of a newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46:1541–1544. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292945/> (дата обращения: 23.10.2023).

11. Jingjing Liu, Jie Zhu, Haixu Xu, Juan Li, Zenglei Hu, Shunlin Hu, et al. Effects of the HN Antigenic Difference between the Vaccine Strain and the Challenge Strain of Newcastle Disease Virus on Virus Shedding and Transmission. *Viruses*. 2017;9(8):225. URL: https://www.mdpi.com/1999-4915/9/8/225/html#table_body_display_viruses-09-00225-t002 (дата обращения: 23.10.2023).

REFERENCES

1. Dimitrov K.M., Claudio L.A., Qingzhong Yu, Patti J.M. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*. 2017; 206:126-136. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113516308045?via%3Dihub> (accessed: 23.10.2023).
2. Lomniczi B., Wehmann E., Herczeg J., Ballagi-Pordany A., Kaleta E.F., Werner O, et al. Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology*. 1998; 143:49-64. URL: https://link.springer.com/article/10.1007/s007050050267?utm_source=getftr&utm_medium=getftr&utm_campaign=getftr_pilot (accessed: 23.10.2023).
3. Frolov S.V., Moroz N.V., Chvala I.A., Irza V.N. Effectiveness of vaccines produced by the Federal State-Financed Institution “ARRIAH” against topical genotype VII Newcastle disease viruses. *Veterinary Science Today*. 2021;1(1):44-51. URL: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/543> (accessed: 23.10.2023).
4. Volkova M.A., Chvala Ir.A., Osipova O.S., Kulagina M.A., Andreychuk D.B. Serological monitoring of avian influenza and Newcastle disease in the Russian Federation in 2019. *Veterinary Science Today*. 2020;(2):76-82. URL: <https://veterinary.arriah.ru/jour/article/view/471> (accessed: 23.10.2023).
5. Rosselkhoz nadzor. Information on Newcastle disease in the Russian Federation. Outbreaks of Newcastle disease in the Russian Federation in 2023 (as of 08/21/2023); URL: <https://fsvps.gov.ru/sites/default/files/files/iac/maps/2023/21-08/bn.pdf> (accessed: 23.10.2023).
6. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). Chapter 3.3.14. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 12-th ed. 2023. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm (accessed: 23.10.2023).
7. Van der Vaden B.L. *Mathematical Statistics*. Moscow: Foreign Languages Publishing House; 1960. 434 c. URL: https://www.studmed.ru/van-der-varden-vl-matematicheskaya-statistika_5edc08a882c.html (accessed: 23.10.2023).
8. Urbah V.J. *Statistical Analysis in Biological and Medical Researches*. Moscow: Medicine; 1975. 297 c. URL: https://www.studmed.ru/urbah-vyu-statisticheskiiy-analiz-v-biologicheskikh-i-medicinskih-issledovaniyah_732e15c6942.html (accessed: 23.10.2023).
9. Zhdanov V.M. *Evolution of Viruses*. Moscow: Medicine. 1990, 376 c. URL: https://www.studmed.ru/zhdanov-vm-evolyuciya-virusov_718275230fd.html (accessed: 23.10.2023).
10. Sun-Hee Cho, Hyuk-Joon Kwon, Tae-Eun Kim, Jae-Hong Kim, Han-Sang Yoo, Sun-Joong Kim. Variation of a newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase linear epitope. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46:1541–1544. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292945/> (accessed: 23.10.2023).
11. Jingjing Liu, Jie Zhu, Haixu Xu, Juan Li, Zenglei Hu, Shunlin Hu, et al. Effects of the HN Antigenic Difference between the Vaccine Strain and the Challenge Strain of Newcastle Disease Virus on Virus Shedding and Transmission. *Viruses*. 2017;9(8):225. URL: https://www.mdpi.com/1999-4915/9/8/225/html#table_body_display_viruses-09-00225-t002 (accessed: 23.10.2023).