

ГЛАВА 3.3.4.

ГРИПП ПТИЦ (ИНФЕКЦИЯ ВИРУСАМИ ГРИППА ПТИЦ)

РЕЗЮМЕ

Возбудителями гриппа птиц (ГП) являются специфичные вирусы семейства Orthomyxoviridae рода вирусов гриппа А. Существует три рода гриппа – А, В, и С; но только в отношении вирусов гриппа типа А известно, что они заражают птиц. Диагностика проводится путем выделения вируса и характеристики фрагментов его генома. Причиной этому служит то, что инфекции у птиц могут вызвать множество клинических признаков, которые могут отличаться в зависимости от хозяина, штамма вируса, иммунного статуса хозяина, присутствия других обостряющих инфекцию вторичных организмов и условий окружающей среды.

Идентификация агента: *Суспензии в антибиотическом растворе ротоглоточных и клоакальных смывов (или фекалии) от живых птиц, или фекалии и пулы образцов органов павших птиц вводят в аллантоисную полость 9-11-дневных куриных яиц с развивающимися эмбрионами. Яйца инкубируют при температуре 37°C (35-39°C) в течение 2-7 дней. Аллантоисную жидкость яиц, в которых содержатся мертвые или умирающие эмбрионы во время инкубирования, и все яйца в конце периода инкубирования тестируют на наличие гемагглютинирующей активности. Наличие вируса гриппа типа А можно подтвердить в реакции иммунодиффузии между концентрированным вирусом и антисывороткой к нуклеокапсидным или матриксным антигенам, оба из которых присущи всем вирусам гриппа типа А, или посредством полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР) аллантоисной жидкости. Выделение в эмбрионах недавно было заменено, при определенных обстоятельствах, обнаружением одного или более сегментов генома гриппа А с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени или других валидированных молекулярных методов.*

Для серологического субтипирования вируса референтная лаборатория должна проводить реакции торможения гемагглютинации и нейраминидазы против ряда поликлональных или моноспецифических антисывороток к каждому из 16 подтипов вируса гриппа А по гемагглютинину (Н1-16) и 9 подтипов по нейраминидазе (N1-9) или идентифицировать геном специфичных по Н и N подтипов с использованием технологии обнаружения РНК с подтип-специфичными праймерами и зондами (например, ОТ-ПЦР в реальном времени) или секвенирования и филогенетического анализа.

Поскольку термины «высокопатогенный грипп птиц» и исторический термин «чума птиц» относятся к заражению вирулентными штаммами вируса гриппа типа А, необходимо оценить вирулентность изолята вируса гриппа типа А в отношении домашней птицы. Хотя все возникающие в природе вирулентные штаммы, выделенные к настоящему моменту, были подтипами или Н5, или Н7, большинство из них имели низкую вирулентность. Методы, используемые для определения вирулентности штамма для птиц, за последнее время эволюционировали благодаря большему пониманию

молекулярной основы патогенности, но до сих пор требуется внутривенное заражение, как минимум, восьми восприимчивых 4-8-недельных цыплят инфекционным вирусом; штаммы считаются высокопатогенными, если они вызывают более 75% смертности в течение 10 дней или заражение 10 восприимчивых 6-недельных цыплят с полученным индексом внутривенной патогенности выше 1,2. Характеристика штаммов вируса с подозрением на высокую вирулентность должна проводиться в лаборатории с соответствующим уровнем биозащиты. Вне зависимости от их вирулентности для цыплят, вирусы H5 и H7 с аминокислотной последовательностью сайта расщепления HA0 идентичной тем, которые наблюдаются у вирулентных вирусов, считаются вирусами высокопатогенного гриппа птиц. Изоляты H5 и H7, не обладающие патогенным действием для цыплят, и не имеющие аминокислотной последовательности сайта расщепления HA0, идентичной тем, которые наблюдаются у вирусов высокопатогенного гриппа птиц, считаются вирусами низкопатогенного гриппа птиц. В целях Ветеринарно-санитарного кодекса МЭБ грипп птиц подлежит уведомлению в МЭБ и определяется как инфекция домашней птицы, вызываемая любым вирусом гриппа А с высокой патогенностью (ВПГП) и вирусами подтипов H5 и H7 с низкой патогенностью (H5/H7 НППП). Вирусы гриппа А с высокой патогенностью для птиц кроме домашней птицы, включая дикую птицу, также подлежат уведомлению. Низкопатогенные вирусы гриппа А подтипов, отличных от H5 и H7 (например, H1-4 и H8-16) не определяются как грипп птиц или не подлежат уведомлению.

Серологические тесты: Поскольку все вирусы гриппа типа А имеют схожие по антигенам нуклеокапсидные и матриксные антигены, они являются предпочитаемыми мишенями для серологических методов выявления группы вирусов типа А. Для выявления антител к таким антигенам можно использовать иммунодиффузию в агаровом геле. Для таких тестов используются концентрированные вирусные препараты, содержащие один из двух или оба типа антигенов. Не у всех птиц вырабатываются обнаруживаемые преципитирующие антитела. Для обнаружения антител к типоспецифическим антигенам вируса гриппа типа А используется твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) в зависящем от вида (непрямом) или независящем от вида (конкурентном) формате. Реакции торможения гемагглютинации также применяются в качестве стандартных диагностических серологических методов, но при использовании этого метода существует вероятность пропустить некоторые инфекции, поскольку гемагглютинин является подтип-специфическим.

Требования к вакцинам: Исторически, в большинстве стран использование вакцин, специально созданных для сдерживания или профилактики высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП), запрещено или не рекомендуется государственными органами, поскольку они могут помешать проведению стратегии полного санитарного уоя. Впервые вакцинацию в рамках программы искоренения гриппа птиц использовали против НППП типа H5/H7. В рамках этих программ использовались инактивированные масляно-эмульсионные вакцины с теми же подтипами гемагглютинина и нейраминидазы, что и у циркулировавших полевых вирусов, а инфицированные стада выявляли путем обнаружения вируса или антител к вирусу у невакцинированных индикаторных животных. В 1990-х годах в Мексике и Пакистане в профилактических целях использовали инактивированные масляно-эмульсионные вакцины для борьбы с широкомасштабными вспышками ВПГП и НППП типа H5/H7; рекомбинантная вакцина на основе вируса оспы птиц, экспрессирующая гомологичный ген гемагглютинина, также применялась в Мексике, Сальвадоре и Гватемале. Во время вспышки НППП типа H7 в

Италии в 1999-2001 годах использовали инактивированную вакцину с таким же типом гемагглютинаина (т.е. гомологичным), что и у полевого вируса, но с другим (т.е. гетерологичным) типом нейраминидазы. Это позволило серологическими методами дифференцировать неинфицированных вакцинированных птиц и птиц, инфицированных полевым вирусом, что в конечном итоге способствовало искоренению полевого вируса. Профилактическое применение вакцин против типов H5 и H7 имело место в различных частях Италии с целью профилактики инфекций НППП типа H5/H7, а также в некоторых странах Азии, Африки и Ближнего Востока с целью борьбы с заражением вирусами ВППП типа H5N1. Вирусы ВППП нельзя использовать в качестве посевных вирусов при производстве вакцин.

Если вирус ВППП используется в исследованиях с контрольным заражением, лаборатория должна соответствовать требованиям МЭБ к учреждениям, работающим с патогенами группы 4.

А. ВВЕДЕНИЕ

Грипп птиц вызывает инфекция вирусов семейства *Orthomyxoviridae* рода *вирусов гриппа А*. Вирусы гриппа А – это единственные вирусы семейства ортомиксовирусов, которые способны к заражению птиц в естественных условиях. Было выявлено, что многие виды птиц восприимчивы к заражению вирусами гриппа типа А; водоплавающие птицы представляют собой основной резервуар для этих вирусов, однако, подавляющее большинство изолятов показали низкую патогенность (низкую вирулентность) в отношении кур и индеек. Вирусы гриппа типа А имеют родственные по антигену нуклеокапсидные и матриксные белки, но они классифицируются по на подтипам на основании антигенов гемагглютинаина (H) и нейраминидазы (N) (Экспертный комитет Всемирной организации здравоохранения, 1980 г.). В настоящее время, распознаны 16 подтипов по гемагглютинину (H1 – H16) и 9 подтипов по нейраминидазе (N1 – N9) и предложены новые подтипы (H17, H18) вирусов гриппа А от летучих мышей в Гватемале (Swayne *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2012; 2013). До настоящего времени естественно возникающими высоковирулентными вирусами гриппа типа А, вызывающими острую клиническую болезнь у кур, индеек и других птиц, имеющих экономическую важность, считали только вирусы подтипов H5 и H7. Большинство вирусов подтипа H5 и H7, выделенные у птиц, обладали низкой вирулентностью для домашней птицы. Ввиду риска того, что вирус H5 или H7, обладающий низкой патогенностью (низкопатогенный вирус гриппа H5/H7 [НППП]), может стать высоко патогенным вследствие мутации, все вирусы H5/H7 НППП от домашней птицы подлежат уведомлению в МЭБ. Кроме того, все высокопатогенные вирусы от домашней птицы и прочих птиц, включая дикую птицу, подлежат уведомлению в МЭБ.

В настоящее время в *Ветеринарно-санитарном кодексе МЭБ по наземным животным (Кодекс по наземным животным)* «Грипп птиц» определяется как инфекция **домашней птицы**, вызываемая вирусом гриппа А высокой патогенности (ВППП) и вирусами подтипа H5 и H7 низкой патогенности (H5/H7 НППП). В предыдущих редакциях *Кодекса по наземным животным* и *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных (Руководство по наземным животным)* вирусы ВППП и H5/H7 НППП определялись как вирусы «гриппа птиц, подлежащего уведомлению», но вследствие противоречий при использовании термина «подлежащий уведомлению» с

другими болезнями, описанными в *Кодексе по наземным животным*, термины «грипп птиц, подлежащий уведомлению», «высокопатогенный грипп птиц, подлежащий уведомлению» и «низкопатогенный грипп птиц, подлежащий уведомлению» удалены из *Кодекса по наземным животным* и из *Руководства по наземным животным*. Во избежание смешения с научным использованием термина «грипп птиц», применение которого началось в 1955 г., в настоящей редакции Руководства по наземным животным будут использоваться термины ВПГП, H5/H7 НПГП и грипп А. Последний термин указывает на любой вирус гриппа от птиц подтипа H1-N16.

В зависимости от вида, возраста, от типа птицы, специфических характеристик штамма вируса и от факторов окружающей среды высокопатогенная болезнь у полностью восприимчивых птиц может протекать по-разному: от случаев внезапной смерти с незначительными признаками до более характерных случаев болезни с респираторными симптомами, включающими выделение из глаз и носа, кашель, щелканье и одышку, отек синусов и/или головы, вялость, снижение вокализации, выраженное сокращение потребления корма и воды, синюшность непокрытых перьями кожных покровов, сережек и гребешка, нарушение координации и нервной системы и диарею. У несушек дополнительные клинические признаки включают значительное снижение яйценоскости, обычно сопровождающееся повышением количества яиц плохого качества. Как правило, высокий уровень заболеваемости сопровождается высокой и быстро нарастающей частотой смертности по невыясненным причинам. Однако ни один из этих признаков нельзя считать патогномоничными. У определенных видов хозяев, например, у пекинской утки, некоторые вирусы ВПГП не обязательно вызывают значительные клинические проявления болезни. Кроме того, вирусы низкопатогенного гриппа А, которые обычно вызывают легкое или бессимптомное протекание болезни, могут, при определенных обстоятельствах, вызывать ряд клинических признаков, схожих по своей тяжести с таковыми при высокопатогенном гриппе птиц, особенно, на фоне усугубляющих инфекций и/или неблагоприятных условий окружающей среды. Подтверждающая диагностика болезни, следовательно, зависит от выделения вируса-возбудителя и демонстрации того, что он соответствует одному из определенных критериев, описанных в разделе В.2. Исследование сывороток от птиц с подозрением на инфекцию методом обнаружения антител может дополнить диагностику, однако, эти методы не подходят для подробной идентификации. Для целей борьбы с болезнью на государственном уровне постановка диагноза осуществляется на основании согласованных официальных критериев для патогенности в соответствии с *in vivo* тестами или молекулярными детерминантами (то есть наличие сайта расщепления белка предшественника гемагглютинина HA0, соответствующего вирусу ВПГП) и субтипирования гемагглютинина. Эти определения продолжают развиваться по мере повышения научных знаний о заболевании.

ВПГП и H5/H7 НПГП подпадают под действие государственного контроля. Вирусы-возбудители ВПГП и H5/H7 НПГП могут легко распространяться за пределы лаборатории при отсутствии надлежащего уровня биозащиты и безопасности. Вирусы гриппа птиц классифицированы, минимум, в Группу риска 2 инфекций человека и животных, и с ними следует обращаться, применяя соответствующие меры, описанные в Главе 1.1.4 *Биобезопасность и биозащита: Стандарт контроля биологического риска в ветеринарной лаборатории и в виварии*. Меры по биосдерживанию следует определять посредством анализа риска, описанного в Главе 1.1.4 *Стандарт для управления биологическим рисками в ветеринарной лаборатории и в виварии*. Необходимые меры

могут зависеть от подтипа; более высокий уровень сдерживания (например, Группа риска 3 или 4) предписан для вирусов H5/N7 НППП и ВППП. Страны, в которых отсутствуют такие специализированные национальные и региональные лаборатории, должны отправлять образцы в Референтную лабораторию МЭБ.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Таблица 1. Методы тестирования, используемые для диагностики гриппа птиц и их цели

Метод	Цель					
	Свобода поголовья от инфекции	Свобода отдельных животных от инфекции перед перемещением	Вклад в стратегию искоренения	Подтверждение клинических случаев	Профилактика инфекции - надзор	Иммунный статус отдельных животных или поголовий после вакцинации
Идентификация возбудителя ¹						
Выделение вируса	+	+++	+	+++	+	-
Выявление антигена	+	+	+	+	+	-
ОТ-ПЦР в реальном времени	++	+++	++	+++	++	-
Выявление иммунного ответа ²						
РИД	+ (грипп А)	+ (грипп А)	++ (грипп А)	+ (конвалесцентные животные)	++ (грипп А)	++ (грипп А)
РТГА	+++ (H5 или H7)	++ (H5 или H7)	+++ (H5 или H7)	+++ (конвалесцентные животные)	++ (H5 или H7)	+++ (H5 или H7)
ИФА	+	+	++	+ (конвалесцентные животные)	++	++

Примечания: +++ = рекомендуемый метод; ++ = подходящий метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность или другие факторы весьма ограничивают его применение; - = не подходит для данной цели

Несмотря на то, что все тесты, перечисленные в категории +++ или ++ прошли официальную валидацию, их рутинная природа и тот факт, что они широко применяются без сомнительных результатов, делает их приемлемыми.

ОТ-ПЦР = обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией; РИД = реакция иммунодиффузии в агаровом геле; РТГА = реакция торможения гемагглютинации; ИФА = иммуноферментный анализ

1. Идентификация возбудителя

Выделение вируса является «золотым стандартом», но трудозатратен и нечувствителен по времени, и используется, в основном, для диагностики первого клинического случая и получения выделенного вируса для дальнейших лабораторных исследований.

Пробы, взятые от павших птиц, должны включать содержимое кишечника (фекалии) или клоакальные смывы и ротоглоточные смывы. Можно также собрать трахеальные пробы,

¹ Рекомендуется применение комбинации методов для идентификации возбудителя на одном и том же клиническом образце

² Достаточно одного из перечисленных серологических методов

пробы из воздухоносных мешков легких, кишечника, селезенки, почек, головного мозга, печени и сердца и обрабатывать их или отдельно, или в виде пула.

Пробы от живых птиц должны включать как трахеальные, так и клоакальные смывы. Во избежание причинения вреда маленьким хрупким птицам, смывы от мелких птиц можно сделать с использованием специальных маленьких тампонов, имеющих в продаже и предназначенных применения в педиатрии. Если таких тампонов нет, адекватной альтернативой может послужить сбор свежих фекалий. Однотипные смывы можно объединить в пулы (т.е. клоакальные смывы с клоакальными смывами, ротоглоточные смывы с ротоглоточными смывами), наиболее часто в пул объединяют 5 или 11 проб, но следует использовать специфические типы тампонов (Spackman *et al.*, 2013).

Пробы следует помещать в изотонический фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH 7,0-7,4, содержащий антибиотики или в раствор белков и антибиотиков. Антибиотики можно менять в зависимости от местных условий, это могут быть, например, пенициллин (2000 ед/мл), стрептомицин (2 мг/мл), гентамицин (50 мкг/мл) и микостатин (1000 ед/мл) для тканей и ротоглоточных смывов, но для фекалий и клоакальных смывов их концентрации должны быть в пять раз выше. Важно повторно откорректировать pH раствора до pH 7,0-7,4 после добавления антибиотиков. Рекомендуется включить в состав раствора для транспортировки смывов протеин для стабилизации вируса (например, агар с сердечно-мозговой вытяжкой, до 5% (объем/объем) сыворотки КРС, 0,5% альбумина КРС (масса/объем) или похожую транспортную среду, имеющуюся в продаже). Фекалии и измельченные ткани должны быть приготовлены в виде 10-20% (масса/объем) суспензий в растворе антибиотика. Суспензии необходимо обрабатывать сразу после инкубирования в течение 1-2 часов при комнатной температуре. Если не представляется возможным провести немедленную обработку, образцы можно хранить при температуре 4°C до 4 дней. Для более длительного хранения диагностические образцы и изоляты необходимо хранить при температуре -80°C. Повторное замораживание и оттаивание не допускается.

Наиболее предпочтительный метод выращивания вирусов гриппа типа А – это заражение свободных от специфических патогенов (СПФ) или, по крайней мере, отрицательных в отношении специфических антител (SAN) куриных эмбрионов. Надосадочные жидкости фекалий или суспензий тканей, полученные при освещении в процессе центрифугирования при 1000 g, вводят в аллантоисный мешочек трех-пяти СПФ или SAN яиц с развивающимися эмбрионами после 9-11 дней инкубации. Яйца инкубируют при температуре 37°C (диапазон 35°C-39°C) в течение 2-7 дней. Яйца, содержащие мертвых или умирающих эмбрионов, и все яйца, оставшиеся к концу периода инкубирования, сначала охлаждают до температуры 4°C в течение 4 часов или в течение ночи, а затем отбирают их аллантоисные жидкости и исследуют в скрининг-тесте (например, реакция гемагглютинации (РГА)), типоспецифическом тесте на грипп А (например, реакция иммунодиффузии (РИД) в агаровом геле) или в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) с захватом антигена или в подтип-специфическом тесте на грипп А (например, реакция торможения гемагглютинации (РТГА) и торможения нейраминидазы (РТН)) или посредством молекулярного метода для обнаружения сигнатур нуклеиновых кислот, специфичных для гриппа А (например, в обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени), как описано ниже (см. Раздел В.3.2). Обнаружение гемагглютинирующей активности в амниоаллантоисных жидкостях, не содержащих бактерии, подтвержденное микробиологическим методом, означает высокую вероятность присутствия вируса гриппа

типа А или парамиксовируса птиц. Жидкости, которые дают отрицательную реакцию, необходимо пассировать, как минимум, еще на одной партии яиц.

Присутствие вируса гриппа типа А можно подтвердить с использованием РИД путем демонстрации присутствия нуклеокапсидных или матриксных антигенов, оба из которых характерны для всех вирусов гриппа типа А (см. Раздел В.3.1.). Антигены можно приготовить путем концентрирования вируса из инфекционной аллантоисной жидкости или экстрагирования инфицированных хориоаллантоисных мембран; их исследуют против известных положительных антисывороток. Вирус можно концентрировать из инфекционной аллантоисной жидкости путем ультрацентрифугирования или путем преципитации в кислотной среде. Последний метод состоит в добавлении 1,0 М HCl к инфекционной аллантоисной жидкости до тех пор, пока рН не будет равен примерно 4,0. Смесь помещают на лед на 1 час, затем осветляют центрифугированием при 1000 *g* при температуре 4°C. Супернатантную жидкость отбраковывают. Концентраты вируса ресуспендируют в глицин/ саркозиловом буфере, который состоит из 1% (вес/объем) натрия лауроила саркозината, забуференного до рН 9,0 0,5 М глицина. Эти концентраты содержат и нуклеокапсидные, и матриксные полипептиды.

Получить антиген, обогащенный нуклеокапсидами, также можно из хориоаллантоисных мембран для использования в РИД (Beard, 1970 г.). Этот метод требует удаления хориоаллантоисных мембран из инфицированных яиц, имеющих аллантоисные жидкости с ГА активностью. Затем мембраны гомогенизируют и размельчают до состояния пасты. Эту массу подвергают трем циклам замораживания-оттаивания, затем центрифугируют при 1000 *g* в течение 10 минут. Осадок отбраковывают, а супернатант используют как антиген с последующей обработкой 0,1 % формалином.

Использование РИД для выявления нуклеокапсидных или матриксных антигенов достаточно для того, чтобы установить присутствие вируса гриппа птиц в амниоаллантоисной жидкости, но в настоящее время доступны экспериментальные и коммерческие наборы экспресс-тестов ИФА с захватом антигена, которые могут стать эффективной альтернативой РИД (Swayne *et al.*, 2013). Большинство наборов ИФА с захватом антигена зарегистрированы и продаются для обнаружения вируса гриппа А человека в клинических образцах. Некоторые из них доказали свою эффективность при выявлении вируса гриппа А, но многие из этих коммерческих наборов, к сожалению, обладают низкой чувствительностью (Woolcock & Cardona, 2005). Для ветеринарного применения рекомендовано использование валидированных тестов.

Любая ГА активность стерильных жидкостей из зараженных яиц, вероятнее всего, связана с вирусом гриппа А или парамиксовируса птиц, но некоторые штаммы реовируса птиц, а также нестерильная жидкость, содержащая гемагглютинин бактериального происхождения, могут вызывать агглютинацию эритроцитов. В настоящее время существует 12 подтвержденных серотипов парамиксовирусов птиц (Miller *et al.*, 2010). В большинстве лабораторий хранятся антисыворотки, специфичные для вируса болезни Ньюкасла (парамиксовирус птиц типа 1), и ввиду его широкого распространения и почти универсального использования в качестве живой вакцины для домашней птицы, рекомендуется оценить его присутствие в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) (см. Главу 2.3.14 *Болезнь Ньюкасла*).

Другим способом подтверждения присутствия вируса гриппа может стать обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) или ОТ-ПЦР в

реальном времени с использованием нуклеотид-специфичных или матрикс-специфичных праймеров (Altmuller *et al.*, 1991; Spackman *et al.*, 2002). Также, присутствие подтипов вируса гриппа H5 или H7 можно подтвердить с использованием праймеров, специфичных для H5 или H7 (Monne *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2007.; Spackman *et al.*, 2002).

Субтипирование антигена можно проводить с использованием моноспецифичных антисывороток, приготовленных против очищенных или рекомбинантных белков, специфичных по подтипу гемагглютинина или нейраминидазы, которые применяются в реакциях торможения гемагглютинина (РТГА) и нейраминидазы (РТНА), или поликлональных антисывороток против ряда интактных вирусов гриппа и используемых в РТГА и РТНА. Генотипирование проводят с использованием праймеров, специфичных по подтипу гемагглютинина и нейраминидазы, в реакциях ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени; или с использованием анализа последовательности генов гемагглютинина и нейраминидазы. Большинство диагностических лабораторий, не специализирующихся на гриппе птиц, не имеют возможности проводить идентификацию подтипа с помощью этих методов. Помощь можно получить из Референтных лабораторий МЭБ (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным*).

1.1.1. Оценка патогенности

Термин ВПГП относится к оценке вирулентности у кур и подразумевает участие вирулентных штаммов вируса. Он используется для описания болезни высоко восприимчивых кур с такими клиническими признаками, как выделения из глаз и носовой полости, кашель, хрипы и одышка, отек синусов и/или головы, апатия, сниженная способность издавать звуки, выраженное снижение потребления корма и воды, цианоз непокрытой перьями кожи, сережек и гребешка, нарушение координации, признаки со стороны нервной системы и диарея. У несушек могут наблюдаться дополнительные клинические признаки в форме выраженного снижения яйценоскости, обычно, в сопровождении повышенного количества яиц плохого качества. Чаще всего, заболеваемость сопровождается высоким и быстро нарастающим уровнем смертности. Однако ни один из этих симптомов нельзя считать патогномичным, и высокий уровень смертности может отмечаться при их отсутствии. Кроме того, вирусы гриппа А низкой патогенности, которые обычно вызывают болезнь только в легкой форме или без клинических проявлений, могут приводить к гораздо более тяжелой болезни при наличии отягчающих инфекций или неблагоприятных факторов внешней среды, а также при определенных обстоятельствах спектр клинических признаков может соответствовать таковому при ВПГП.

Исторический термин «чума птиц» заменили на более точный термин «высокопатогенный грипп птиц». Поскольку на настоящий момент все естественно возникавшие вирусы ВПГП относились к подтипам H5 и H7, а геномные исследования подтвердили, что вирусы ВПГП возникают в результате мутации вирусов НППП H5/H7, все вирусы НППП H5/H7 признали потенциально патогенными. Сдвиги патогенности связаны с изменениями в сайте протеолитического расщепления гемагглютинина, включая: 1) замены неосновных аминокислот основными (аргинин и лизин); 2) вставки многочисленных основных аминокислот из кодонов, дублированных из сайта расщепления гемагглютинина; 3) короткие вставки основных и неосновных аминокислот из неизвестного источника; 4) рекомбинация с вставками из других сегментов гена, которые удлиняют сайт протеолитического расщепления; и 5) потеря сайта защитного гликозилирования в остатке 13 в сочетании с множественными основными

аминокислотами в сайте расщепления. Секвенирование аминокислот в сайтах расщепления изолятов вируса гриппа подтипов H5 и H7 низковирулентных для птиц позволяет идентифицировать вирусы, обладающие способностью – после простой мутации – становиться высокопатогенными для домашней птицы.

Следующие критерии приняты МЭБ для определения патогенности вируса гриппа А:

а) Используется один из следующих методов определения патогенности для кур. Высокопатогенный вирус гриппа А – это:

i) любой вирус гриппа, который является летальным³ для шести, семи или восьми из восьми восприимчивых кур в возрасте 4-8 недель в течение 10 дней после внутривенного заражения 1/10 разведением свободной от бактерий инфекционной аллантоисной жидкости в объеме 0,2 мл.

или

ii) любой вирус гриппа А с индексом внутривенной патогенности выше 1,2. Ниже приведена процедура определения индекса внутривенной патогенности:

- свежую инфекционную аллантоисную жидкость с ГА титром более 1/16 (>24 или $>\log_2 4$, если выражен в виде обратного титра) разводят 1/10 в стерильном изотоническом растворе.
- 0,1 мл разведенного вируса внутривенно вводят десяти 4-8-недельным восприимчивым SAN курам; по возможности следует использовать СПФ кур
- птиц наблюдают каждые 24 часа в течение 10 дней. Во время каждого наблюдения каждой птице присваивается 0 баллов, если птица здорова, 1 балл, если птица больна, 2 – если тяжело больна, 3 – если пала. (Суждение о больной птице и о тяжести заболевания птицы основано на субъективной оценке. Обычно, у «больных» птиц наблюдается один из следующих признаков, а у «тяжело больных» - несколько: поражение дыхательных путей, депрессия, диарея, цианоз кожи без перьев или сережек, отек лицевой части головы и/или самой головы, нарушения со стороны нервной системы. Павшим птицам присваивается по 3 балла в каждый из оставшихся дней периода наблюдения после их смерти²).
- Индекс внутривенной патогенности – это средний балл у птицы за одно наблюдение в течение 10-дневного периода наблюдения. Индекс 3,00 означает, что все птицы пали в течение 24 часов, а индекс 0,00 означает, что у птиц не наблюдалось клинических признаков в течение 10-дневного периода наблюдения.

б) Для всех H5 и H7 вирусов низкой патогенности для кур нужно определить аминокислотную последовательность соединительного пептида. Если последовательность идентична таковой у других изолятов высокопатогенного гриппа птиц, исследуемый изолят будет считаться высокопатогенным (см. таблицу, в которой перечислены все опубликованные сайты протеолитического расщепления

³ Когда птицы слишком больные, чтобы есть или пить, их следует гуманно убить.

² Когда птицы слишком больные, чтобы есть или пить, их следует гуманно убить и присвоить балл как павшим при следующем наблюдении.

гемагглютинаина белка HA0 вирусом H5 и H7 и вирусом ВППП, основанные на расшифрованных последовательностях аминокислот, которые можно найти на сайте OFFLU: http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf.

МЭБ разработало следующую систему классификации для идентификации вирусов, в отношении которых необходимо принимать меры по сообщению о болезни и ее контролю:

- a) Все изоляты гриппа А, которые соответствуют вышеуказанным критериям, считаются изолятами ВПППУ.
- b) Изоляты H5 и H7 от домашней птицы, не вирулентные для кур и аминокислотная последовательность сайта расщепления HA0 которых не идентична последовательности, наблюдавшееся у вирусов ВППП, считаются изолятами H5/H7 НППП и подлежат уведомлению.
- (c) В целях Кодекса по наземным животным ВППП и H5/H7 НППП у домашней птицы определяются как «грипп птиц» и подлежат уведомлению. Грипп А, не являющийся H5/H7 (т.е. H1-4, H6 и H8-16), не считается «гриппом птиц» и не подлежит уведомлению.
- (d) Вирусы гриппа А, высокопатогенные для птиц, кроме домашней птицы, включая дикую птицу, подлежат уведомлению.

Успешно были использованы многие стратегии и методы для секвенирования нуклеотидов в части HA гена, кодирующего область сайта расщепления гемагглютинаина вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7, позволяя вычислить аминокислоты. Это можно сделать путем экстрагирования образца с последующим прямым секвенированием протеолитического сайта расщепления или путем клонирования гемагглютинаина с последующим секвенированием кДНК. Разные стадии процедуры проводить при использовании имеющихся в продаже наборов и автоматических секвенаторов.

Определение сайта расщепления с помощью секвенирования или других методов стало методом выбора для первоначальной оценки вирулентности этих вирусов и включено в согласованные определения. Это позволило сократить количество тестов *in vivo*, хотя в настоящее время заражение птиц все еще необходимо для подтверждения отрицательного результата, поскольку нельзя исключать возможность существования вирусных культур, содержащих смешанные популяции вирусов высокой и низкой вирулентности.

Несмотря на то, что все истинные ВППП вирусы, выделенные к настоящему моменту, относятся к подтипам H5 или H7, по поводу, как минимум, двух изолятов, оба из которых являются подтипами H10 (H10N4 и H10N5), сообщалось, что они соответствуют определениям установленных и МЭБ, и ЕС в отношении вирусов ВППП (Wood et al., 1996 г.), поскольку они стали причиной смерти 7/10 и 8/10 цыплят с показателями индекса внутривенной патогенности >1,2 при внутривенном заражении птиц. Однако, эти вирусы не приводили к смерти и не вызывали признаков болезни при внутриназальном заражении, а также не имели последовательности сайта расщепления гемагглютинаина, сопоставимой с таковой у вируса ВПППУ. Таким же образом, другие вирусы НППП при их внутривенном введении оказывают нефротропное действие, и у павших птиц обнаруживают высокие титры вируса в почках, что указывает на патологический процесс в почках (Slemons & Swayne, 1990 г.), однако, такой патобиологический процесс,

воспроизведенный в лабораторных условиях, не соответствует мультиорганному поражению и системному заболеванию, вызываемому вирусами ВППУ. С другой стороны, описано четыре вируса, которые имеют сайт расщепления HA0, содержащий множество основных аминокислот, но обладают низкой вирулентностью (ИВНП < 1,2) при внутривенном заражении 6-недельных кур (Londt et al., 2007 г.). Другие аномальные случаи – это изоляты Chile 2002 (Suarez et al., 2004 г.) и Canada 2004 (Pasick et al., 2005 г.) вируса ВПП подтипа H7N3, в которых имеются другие и необычные аминокислотные последовательности в сайте расщепления PEKPKTCSPLSRCRETR*GLF и PENPKQAYRKRMTTR*GLF, соответственно. Эти вирусы, по-видимому, возникли в результате рекомбинации между генами гемагглютинаина, нуклеопротеина и матриксным геном, соответственно, которая привела к вставке 11 аминокислот в сайте расщепления HA0 у Чилийского вируса и 7 аминокислот у Канадского вируса. Оба вируса продемонстрировали высокую вирулентность при внутривенном заражении 6-недельных кур.

В таблице на сайте OFFLU, в которой перечислены все зарегистрированные сайты протеолитического расщепления гемагглютинаина HA0 для H5 и H7 вирусов НПП и ВПП на основании вычисленной аминокислотной последовательности. Таблица будет обновляться по мере того, как будут охарактеризованы новые вирусы; адрес вебсайта OFFLU:

<http://www.offlu.net/OFFLU%20Site/Projects/Table%20HPAI%20cleavage%20site%20sequences.pdf>.

1.2. Методы с захватом антигена и молекулярные методы

В настоящее время предпочтительными методами для диагностики вируса гриппа А (хотя бы для первоначальной диагностики гриппа А) остаются традиционное выделение вируса и характеристика вируса. Однако традиционные методы, в основном, дорогие, трудоемкие и занимают много времени. В области молекулярных и других диагностических технологий постоянно проводится обширная деятельность по разработке и усовершенствованию методов, многие из которых применялись для диагностики гриппа А.

1.2.1. Обнаружение антигена

Существует несколько коммерческих наборов ИФА с захватом антигена, позволяющих обнаруживать присутствие вирусов гриппа А у домашней птицы (Swayne & Halvorson 2008; Woolcock & Cardona, 2005). Большинство наборов – это ИФА наборы или наборы, которые основаны на иммунохроматографии (исследование в латеральном потоке) и на использовании моноклональных антител против нуклеопротеина; такие наборы позволяют обнаруживать любой вирус гриппа А. Основное преимущество таких тестов состоит в том, что они могут продемонстрировать присутствие вируса гриппа А в течение 15 минут. К недостаткам относится недостаточная чувствительность, отсутствие возможности валидировать набор для различных видов птиц и идентифицировать подтип вируса, а также высокая стоимость наборов. Эти тесты нужно интерпретировать только на основе стада, а не для отдельных птиц. Наилучшую чувствительность обеспечивают ротоглоточные или трахеальные образцы от клинически больных или павших птиц. Несмотря на это, недостаточная чувствительность остается главным недостатком при использовании

имеющихся тестов для выявления антигена. Chua *et al.* (Chua *et al.*, 2007) провели оценку пяти тестов для обнаружения антигена. Общая чувствительность по результатам оценки составила от 36,6% до 51,4%; авторы сообщают, что с точки зрения чувствительности лучше использовать клоакальные и трахеальные смывы, и что эти тесты меньше подходят для работы с образцами от водоплавающей птицы или диких птиц, чем с образцами от кур. Woolcock и Cardonna (Woolcock & Cardonna, 2005) изучили 5 коммерческих наборов, лицензированных для клинического применения у человека и подтвердили их различную способность обнаруживать вирус гриппа А в образцах от домашней птицы с минимальным пределом обнаружения в $10^{4,7}$ ЭИД₅₀ (50% инфицирующая эмбриональная доза) вируса на 1 мл для самых лучших тестов и минимум $10^{5,7}$ ЭИД₅₀ на 1 мл для остальных тестов. Вследствие низкой чувствительности выявление антигена, в основном используется для скрининга в полевых условиях при клинических случаях гриппа А с высокой смертностью, с последующим подтверждением результатов посредством более чувствительного лабораторного теста.

1.2.2. Прямое обнаружение РНК

Как продемонстрировано в действующих определениях ВППП, в диагностике гриппа птиц уже применяются молекулярные методы. Более того, недавно проводились разработки в области применения молекулярных методов для обнаружения и характеристики вируса гриппа птиц непосредственно из клинических образцов инфицированных птиц. Обязательным требованием при применении высокочувствительных молекулярных методов, позволяющих осуществлять быстрое прямое обнаружение вирусной РНК для подтверждающей лабораторной диагностики заражения гриппом А, является наличие строгих протоколов, предотвращающих риск перекрестной контаминации между клиническими образцами. Кроме того, методы обнаружения РНК должны быть валидированы по стандарту МЭБ (см. Главу 1.1.6 *Принципы и методы валидации диагностических тестов для инфекционных болезней*) с использованием клинических материала для демонстрации того, что данные тесты пригодны для применения в целях диагностики в полевых условиях, которые могут включать использование внутренних стандартов. Контрольные реакции позволяют достичь большей уверенности в единообразии молекулярных реакций, клинических образцов и результатов.

Методы на основе ОТ-ПЦР на клинических образцах, при условии правильно определенных праймеров, могут обеспечивать быстрое обнаружение и идентификацию подтипа (по крайней мере, Н5 и Н7), включая кДНК продукт, который может быть использован для нуклеотидного секвенирования (Suarez, 2007). Этот метод был успешно использован во время вспышек ВППП в Нидерландах в 2003 году. Gull *et al.* (2008; 2009) разработали вырожденные праймеры для выявления и секвенирования коротких фрагментов ГА (сайт разрезания) и гена НА, что позволяет проводить амплификации всех подтипов ГА (1-16) и НА (1-9). Однако предпочтительным молекулярным тестом для обнаружения вируса гриппа А является ОТ-ПЦР в реальном времени, модификация ОТ-ПЦР, которая сокращает время, затрачиваемое как на идентификацию подтипа вируса, так и на секвенирование. Например, Spackman *et al.* (2002) применяли систему праймера для одношаговой ОТ-ПЦР в реальном времени с флуорогенным гидролизным зондом для обнаружения вирусов гриппа птиц и определения подтипа Н5 или Н7. Тест дал хорошие результаты в отношении

выделения вируса и предложил более дешевый и более быстрый альтернативный метод, позволяющий ставить диагноз менее чем за 3 часа на основании клинических образцов. В ходе дополнительных исследований было показано, что ОТ-ПЦР в реальном времени обладает чувствительностью и специфичностью, эквивалентной методу выделения вируса на основании валидирования в полевых условиях в рамках программы контроля рынков живой птицы Нью-Йорка и Нью-Джерси в течение зимы 2002 года и во время вспышки НППП H7N2 и программы его искоренения в Вирджинии в 2002 году (Elvinger *et al.*, 2007 г.; Spackman *et al.*, 2003). Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что делает его эквивалентным методу выделения вируса из трахеальных и ротоглоточных смывов у кур и индеек, но недостаточно чувствителен для обнаружения вируса гриппа А в фекальных смывах, фекалиях и тканях некоторых видов птиц из-за присутствия ингибиторов ПЦР, которые дают ложноотрицательные результаты (Das *et al.*, 2006 г.). Включение внутреннего положительного контроля в тест подтверждает правильное проведение теста. Кроме того, разработаны усовершенствованные методы экстрагирования РНК для устранения большинства ингибиторов ПЦР из исследуемых проб.

Методы ОТ-ПЦР в реальном времени, обычно основанные на гидролизном зонде или методе 'TaqMan®' для получения направленного флуоресцирующего сигнала, становятся предпочтительным методом во многих лабораториях, как минимум, для частичной диагностики непосредственно по клиническим образцам. Метод позволяет получить быстрые результаты, при этом его чувствительность и специфичность сопоставимы с выделением вируса. Это идеальное качество для работы со вспышкой гриппа птиц, когда время, за которое можно поставить точный диагноз, важно для принятия решения соответствующим ветеринарным органом. Кроме того, можно создать системы ОТ-ПЦР в реальном времени для 96-лучночных планшетов, а также комбинировать их с роботизированными установками с высокой пропускной способностью для экстрагирования РНК из проб (Agüero *et al.*, 2007).

Метод диагностики с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени, принятый в большинстве лабораторий, основан на первоначальном определении рода вируса гриппа птиц в клинических пробах, в основном, путем первоначального определения матричного гена (М), который является высоко консервативным для всех типов гриппа А, с последующим тестированием с использованием специфичного метода ОТ-ПЦР в реальном времени на вирусы подтипа H5 и H7. Для определения подтипа праймеры, используемые в TaqMan ОТ-ПЦР в реальном времени, нацеливают на область HA2, так как эта область является достаточно консервативной в генах гемагглютинаина подтипов H5 и H7 (Spackman *et al.*, 2008; Spackman & Suarez, 2008). Следовательно, она может служить целевой областью для данных подтипов. Spackman *et al.* (2002) продемонстрировали специфичное определение этих подтипов, но предупредили, что последовательности их праймера/зонда для H5 и H7 сконструированы для обнаружения североамериканских изолятов H5 и H7 и могут не подходить для всех изолятов H5 и H7. Так и оказалось. Slomka *et al.* (Slomka *et al.*, 2007) описали модификацию последовательностей олигонуклеотидов H5, используемых Spackman *et al.* (2002), позволяющую обнаруживать азиатскую линию вируса ВППП подтипа H5N1 и другие евразийские вирусы гриппа птиц типа H5, которые выделяли в течение последних десяти лет как у домашней, так и у дикой птицы. Валидированные протоколы ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения евразийских вирусов типа H5 подтвердил свою эффективность при изучении многих

клинических образцов ВПГП H5N1 и других подтипов, поступивших в Международные референтные лаборатории из Европы, Африки и Азии с осени 2005 года (Monne *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2007). Каждый набор праймеров и зондов нужно валдировать против другого набора вирусов, чтобы тест можно было применять для разных видов птиц и вирусов, распространенных на различных географических территориях и в разные периоды времени.

Одна из проблем с новыми тестами – метод или протокол может быть разработан и описан в литературе без проведения его надлежащей валидации. Это произошло с несколькими протоколами ОТ-ПЦР в реальном времени (Slomka *et al.*, 2007b; Suarez *et al.*, 2007). В рамках сотрудничества между Национальными референтными лабораториями Европейского Союза проводилось выявление и валидация протоколов, которые можно было бы рекомендовать для применения в Европейском Союзе (Monne *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2007b).

Описаны протоколы ОТ-ПЦР в реальном времени, в которых амплифицируются области через сайт расщепления гена HA0. В результате могут быть получены тесты, пригодные для специфичных вирусов. Например, Hoffman *et al.* (2007) описали метод ОТ-ПЦР в реальном времени, специфичный для азиатских вирусов Кукунор-подобной клады ВПГП подтипа H5N1, который позволяет быстро определить патотип данной подгруппы вирусов ВПГП H5N1 без секвенирования. Fereidouni *et al.* (2008) разработали анализ, основанный на определении полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, с помощью которой можно определить патотип гриппа А подтипа H5 без проведения секвенирования или опытов на животных после ОТ-ПЦР и рестрикционного анализа амплифицированных фрагментов.

Разработаны различные модификации прямого метода ОТ-ПЦР для обнаружения вирусной РНК для уменьшения эффекта ингибирующих веществ в отобранной пробе, возможности контаминирования нуклеиновых кислот и времени, необходимого для получения результата. Например, амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот, с электрохемилюминесцентным обнаружением (NASBA/ECL) – это непрерывная изотермическая реакция, для которой не требуется оборудования для термоциклирования. Метод амплификации, основанной на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), разработан для обнаружения вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 в клинических пробах в течение 6 часов (Ko *et al.*, 2004). Система изотермической амплификации с формированием петель для обнаружения H5 обладает, по-видимому, высокой чувствительностью и надежной специфичностью (Imai *et al.*, 2006), но может иметь ограниченное применение ввиду чувствительности к вирусным мутациям, влияющим на области-мишени, что снижает способность обнаруживать вирус (Postel *et al.*, 2010).

Вероятнее всего, в очень скором будущем будут разработаны молекулярные методы, а также усовершенствованы технологии на основе антигена, позволяющие проводить быстрые тесты, выполняемые сразу после отбора проб, для обнаружения присутствия специфичных подтипов вируса гриппа А и маркеров вирулентности. Степень, до которой будут применяться эти тесты, будет в большой степени зависеть от согласования и принятия определения того, что является законодательной инфекцией для целей контроля и торговли. В настоящий момент ОТ-ПЦР в реальном времени является наиболее предпочтительным методом для надзора за вирусом, т.к. данный

анализ обеспечивает быструю, чувствительную диагностику гриппа А. Н5 и Н7, и его можно изменять для получения высокой пропускной способности.

2. Серологические тесты

2.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

В продаже имеются коммерческие ИФА наборы, позволяющие обнаруживать антитела к нуклеокапсидному белку. Разработаны наборы для непрямого и конкурентного/блокирующего ИФА, которые используются для обнаружения антител, специфичных для вируса гриппа А. Созданы и валидированы несколько конкурентных ИФА для выявления вируса гриппа птиц (ВГП К-ИФА) и блокирующих ИФА (ВГП Б-ИФА) в качестве более чувствительной альтернативы иммунодиффузии в агаровом геле для выявления реагирующих антител к группе вирусов гриппа А в сыворотках кур и других видов птиц (SCANLS, 2009). Данная платформа ВГП ИФА, как в конкурентном, так и в блокирующем формате, выявляет антитела к вирусу гриппа А, позволяя этим антителам конкурировать за участки связывания антигена с моноклональным антителом против эпитопа в нуклеопротеине, который является консервативным у всех вирусов гриппа А.

Наборы нужно валидировать для определенных видов и для определенных целей, для которых они будут применяться. Используются несколько разных тестов и методов подготовки антигена. Оценка и валидация таких тестов обычно проводится производителем, поэтому очень важно точно следовать инструкциям по их применению. См. Реестр МЭБ по наборам, сертифицированным МЭБ (<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/backgroundinformation/>) Цена ИФА-наборов умеренная, и их можно применять для высокопроизводительного скрининга наличие инфекций гриппа А, но все положительные результаты следует исследовать в РТГА для субтипирования до Н5 и Н7. Появляются некоторые подтип-специфичные ИФА-наборы, например, для выявления антител к Н5, Н7 и N1.

2.2. Иммунодиффузия в агаровом геле

Все вирусы гриппа типа А имеют схожие по антигену нуклеокапсидные и матриксные антигены. Этот факт позволяет при использовании реакции иммунодиффузии в агаровом геле обнаружить присутствие или отсутствие антител к любому вирусу гриппа типа А. Концентрированные вирусные препараты, как было описано выше, содержат и матриксные, и нуклеокапсидные антигены; матриксный антиген диффундирует быстрее, чем нуклеокапсидный антиген. Реакции иммунодиффузии в агаровом геле широко использовали для обнаружения специфичных антител в стадах кур и индеек, как индикаторов инфекции, однако, эти тесты менее надежны для обнаружения антител после заражения вирусами гриппа А других видов птиц. В реакции обычно использовали обогащенные нуклеокапсидами препараты, изготовленные из хориоаллантоисных оболочек развивающихся куриных эмбрионов (Beard, 1970), зараженных в 10-дневном возрасте, которые затем гомогенизировали, подвергали 3 циклам замораживания-оттаивания с последующим центрифугированием при 1000 g. Супернатантную жидкость инактивировали посредством добавления 0,1% формалина или 1% бетапропиолактона, повторно центрифугировали и использовали в качестве антигена. Не все виды птиц могут вырабатывать преципитирующие антитела после заражения вирусами гриппа, например, утки. Реакция иммунодиффузии в агаровом геле – недорогой серологический скрининг-

тест для выявления типичных инфекций гриппа А, но за ним должна следовать РТГА для субтипирования положительных по гриппу А результатов по Н5 и Н7.

Тесты обычно проводятся с использованием гелей 1% (в/об) агарозы или очищенного агара типа II и 8% (в/об) NaCl в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,2, разлитых в чашки Петри или на предметные стекла микроскопа слоем, толщиной 2-3 мм и инкубированных во влажной камере. Используя шаблон и режущий инструмент, в агаре нарезают лунки диаметром 5 мм. Лунки с подозрительными сыворотками должны располагаться рядом с известной положительной сывороткой и антигеном. В каждую лунку должен быть добавлен реактив в таком количестве, чтобы заполнить лунку до верха мениска на одном уровне с верхом геля, но не переливая. В каждую лунку вносят примерно по 50 мкл каждого реагента, но данное количество зависит от густоты геля, т.к. более густой гель требует дополнительного объема реактивов.

Лунки следует исследовать на предмет линий преципитина спустя 24 часа, слабо положительные образцы или образцы, у которых специфичные линии не образовались, следует инкубировать дольше и исследовать заново через 48 часов. Срок образования видимой линии преципитина зависит от концентраций антитела и антигена. Линии преципитина лучше всего видны на темном фоне, который подсвечивается с обратной стороны. Положительный специфический результат регистрируется, когда линия преципитина между известными лунками положительного контроля продолжается линией между лункой с антигеном и исследуемой лункой. Наличие перекрестных линий объясняют отсутствием соответствия исследуемой сыворотки антителам в лунке с положительным контролем.

2.3. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации

В различных лабораториях РГА и РТГА проводят по-разному. В следующих рекомендованных примерах используют пластиковые микропланшеты с V-образной формой дна, в которых конечный объем для обоих типов тестов составляет 0,075 мл. Реагенты, необходимые для проведения этих тестов, включают изотонический ФБР (0,01 М), рН 7,0-7,2, и эритроциты, полученные, как минимум, от трех СПФ или SAN кур, объединенные в пулы и помещенные в равные объемы раствора Олсвера. Клетки необходимо промыть три раза в ФБР перед использованием в виде 1% (клеточного осадка об/об) суспензии. Положительные и отрицательные контрольные антигены и антисыворотки необходимо соответствующим образом использовать в каждом тесте.

2.3.1. Реакция гемагглютинации

- i) В каждую лунку пластикового титрационного микропланшета с V-образным дном вносят по 0,025 мл ФБР.
- ii) В первую лунку вносят 0,025 мл вирусной суспензии (т.е. инфекционной аллантоисной жидкости). Для точного определения содержания ГА, необходимо применять суспензию из диапазона начальных серий разведений, т.е. 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, и т.д.
- iii) Делают двукратные разведения 0,025 мл объемов вирусной суспензии по всему планшету.
- iv) В каждую лунку вносят еще по 0,025 мл ФБР.
- v) В каждую лунку вносят по 0,025 мл 1% (об/об) куриных эритроцитов.

- vi) Легким постукиванием по планшету перемешивают содержимое, затем оставляют эритроциты для осаждения на 40 минут при комнатной температуре, т.е. около 20°C, или 60 минут при температуре 4°C, если температура окружающей среды высокая, к этому времени контрольные эритроциты должны осесть, образуя четко различимую бляшку.
- vii) ГА определяют, наклоня планшет и наблюдая присутствие или отсутствие слезообразного потока эритроцитов. Титром вируса считают наивысшее разведение, дающее полную гемагглютинацию (отсутствие потока); она представляет 1 гемагглютинирующую единицу и может быть точно подсчитана на основе начального диапазона разбавлений.

2.3.2. Реакция торможения гемагглютинации (альтернативный тест для международной торговли)

- i) В каждую лунку пластикового титрационного микропланшета с V-образным дном вносят по 0,025 мл ФБР.
- ii) В первую лунку планшета вносят 0,025 мл сыворотки.
- iii) Делают двукратные разведения 0,025 мл объемов сыворотки на планшете.
- iv) Добавляют 4 ГАЕ вируса/антигена в 0,025 мл в каждую лунку и оставляют, минимум, на 30 минут при комнатной температуре (т.е. около 20°C) или на 60 минут при 4°C.
- v) В каждую лунку вносят по 0,025 мл 1% (об/об) куриных эритроцитов и после осторожного перемешивания оставляют эритроциты для осаждения на 40 минут при комнатной температуре, т.е. около 20°C, или на 60 минут при 4°C, если температура окружающей среды высокая, к этому времени контрольные эритроциты должны осесть, образуя четко очерченную бляшку.
- vi) Титр торможения гемагглютинации – это самое высокое разведение сыворотки, вызывающий полное ингибирование 4 ГАЕ антигена. Агглютинацию оценивают при встряхивании планшетов. Ингибирование засчитывается только в тех лунках, в которых поток эритроцитов движется с той же скоростью, что и в контрольных лунках (содержащих только 0,025 мл эритроцитов и 0,5 мл ФБР).
- vii) Действительность результатов оценивают против отрицательной контрольной сыворотки, которая не должна давать титр $> 1/4$ ($>2^2$ или $>\log_2$ при выражении в виде обратного титра), и положительной контрольной сыворотки, для которой титр должен быть в пределах одного разведения известного титра.

РТГА в основном применяется для определения, субтипированы ли антитела, указывающие на инфицирование вирусом гриппа А, как H5 и H7. Титры торможения гемагглютинации могут рассматриваться как положительные, если наблюдается торможение при разведении сыворотки 1/16 (2^4 или $\log_2 4$ при выражении в виде обратного титра) или больше против 4 ГАЕ антигена. Некоторые лаборатории предпочитают использовать в РТГА 8 ГАЕ. Хотя это и допускается, это влияет на интерпретацию результатов, так, что положительный титр составляет 1/8 (2^3 или $\log_2 3$) или более. Значение минимального положительного титра нужно правильно интерпретировать; это не подразумевает, например, что привитые птицы с этим титром будут защищены от

контрольного заражения или что птицы с более низкими титрами будут восприимчивы к контрольному заражению. В каждую партию РТГА также необходимо включать соответствующие контроли вируса/антигена, положительную контрольную сыворотку и контроль эритроцитов.

Куриные сыворотки редко дают неспецифические положительные реакции агглютинации в этой реакции, поэтому предварительная обработка сывороток необязательна. Сыворотки, полученные от других видов кроме кур, могут иногда вызывать агглютинацию куриных эритроцитов, что приводит к неспецифической агглютинации. Следовательно, это свойство должно быть определено в первую очередь, и в случае положительного результата исключено путем абсорбирования сыворотки куриными эритроцитами. Это осуществляют следующим образом: к порциям антисыворотки объемом 0,5 мл добавляют по 0,025 мл осадка куриных эритроцитов, осторожно встряхивают и оставляют минимум на 30 минут; затем осаждают эритроциты путем центрифугирования при 800 *g* в течение 2-5 минут, а адсорбированную сыворотку сцеживают. Также можно использовать эритроциты исследуемых видов птиц. Неспецифическое торможение агглютинации может быть вызвано стерическим торможением, когда антиген гемагглютинина и сыворотка в РТГА имеют один и тот же подтип нейраминидазы. В результате стерического торможения на дне планшета образуются бляшки эритроцитов или эритроциты струятся с той же скоростью, что и в контрольных лунках. Для предотвращения стерического неспецифического торможения антиген ГА, используемый для тестирования неизвестной сыворотки, должен быть другого подтипа нейраминидазы, чем у неизвестных сывороток, или антиген ГА должен быть рекомбинантным или очищенным белком ГА без белка нейраминидазы. РТГА основана на антигеном связывании между антигеном ГА и антисывороткой, и, таким образом, на неспецифическое связывание антигена ГА и сыворотки могут влиять другие факторы, приводя к неспецифической реакции торможения. Пока нет документально подтвержденных свидетельств перекрестных реакций или реакций с неспецифическим торможением между разными подтипами гемагглютинина вируса гриппа А.

Реакцию торможения нейраминидазы используют для идентификации типов изолятов вируса гриппа А по нейраминидазе и для того, чтобы охарактеризовать антитела у инфицированных птиц. Для проведения этой процедуры необходимы знания и опыт и специальные реагенты; поэтому это исследование обычно проводят в Референтной лаборатории МЭБ. Стратегия DIVA (дифференциация инфицированных животных от вакцинированных), используемая в Италии, также полагается на использование серологического теста для обнаружения специфических антител к нейраминидазе; процедура тестирования была описана (Carua *et al.*, 2003).

С. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ВАКЦИНАМ

1. История вопроса

Важно понимать, что одна вакцинация не может стать решением проблемы контроля ВПП или НПП подтипов H5/N7, если желаемым результатом является искоренение. Без применения систем мониторинга, строгих мер биозащиты и депопуляции в случае инфекции существует вероятность того, что эти вирусы ВПП или H5/N7 НПП станут эндемичными в популяциях вакцинированной домашней птицы. Длительная циркуляция вируса в вакцинированной популяции может привести к антигенным и генетическим

изменениям вируса, что произошло в Мексике, Китае (Китайская Народная Республика), Египте, Индонезии и других странах (Grund *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Swayne & Karpczynski, 2008b). Проведен анализ вакцин и вакцинации, используемых в настоящее время (Carua & Alexander, 2008; Swayne, 2003, 2004; Swayne & Karpczynski, 2008a, 2008b).

В этой главе традиционные вакцины ограничены инактивированными вакцинами против вируса гриппа А. Эти вакцины, используемые против вирусов ВПГП, H5/H7 НППП или не H5/H7 гриппа А производят из инфекционной аллантоисной жидкости, инактивированной бета-пропиолактоном или формалином и эмульгированной минеральным маслом. Применение живых традиционных вакцин против вируса гриппа не рекомендовано.

Существование большого количества подтипов вирусов вместе с известной вариацией различных штаммов внутри подтипа представляет серьезную проблему при отборе штаммов для производства инактивированных вакцин против гриппа А. Кроме того, некоторые изоляты не вырастают до достаточно высоких титров для производства вакцин необходимой иммуногенности без дорогого предварительного концентрирования. В то время как некоторые стратегии вакцинации предусматривают использование аутогенных вакцин, то есть вакцин, произведенных на основе изолятов, связанных с эпизоотией, другие полагаются на вакцины, изготовленные на основе вирусов, обладающих тем же подтипом гемагглютинаина, и способных выдавать высокие концентрации антигена.

Начиная с 1970-х годов, в США инактивированные вакцины против гриппа А использовали, преимущественно, у индеек против вирусов H5/H7 НППП и вирусов гриппа А, не относящихся к подтипу H5/H7. Эти вирусы могут вызывать тяжелые клинические признаки, особенно приотягчающих обстоятельствах. Применялось большое количество таких вакцин (Swayne *et al.*, 2013). В последние годы в США большая часть инактивированных вакцин против гриппа А применялась у племенных индеек с целью защиты их от вирусов гриппа свиней H1 и H3. Вакцинация против вируса гриппа А H9N2 также обширно применялась в Азии и на Среднем Востоке (Swayne & Karpczynski, 2008a). Вакцинацию против подтипа H5N2 ВПГП использовали в Мексике после вспышек в 1994-1995 гг. (Villareal, 2007), а против подтипа H7N3 – в Пакистане (Naeem, 1998) после вспышек 1995 года. В Мексике вирус ВПГП искоренили, однако, вирус H5N2 НППП продолжал циркулировать, в то время как в Пакистане вирусы ВПГП, родственные оригинальному вирусу ВПГП, все еще выделяли в 2004 году. После вспышек ВПГП в Гонконге в 2002 году, вызванных вирусом H5N1 (Sims, 2003), приняли стратегию иммунизации с использованием вакцины на основе H5N2 с последующей заменой на вакцину на основе вируса H5N1. Начиная с 2004 года широкое распространение вспышек H5N1 ВПГП в нескольких странах Юго-Восточной Азии и Африке привели к чрезвычайной ситуации, в результате чего в Китае (Китайская Народная Республика), Индонезии, Вьетнаме и Египте теперь применяется профилактическая вакцинация. Инактивированную вакцину против гриппа А на основе вируса H7N7 использовали в Корее (Корейская Народно-Демократическая Республика) в 2005 году для контроля вспышки ВПГП. Таким же образом, в последний год профилактическую вакцинацию против H5N1 ВПГП разрешили для домашней птицы выгульного содержания и зоопарковых птиц в некоторых странах Евросоюза. Италия широко использует серологический подход (гетерологичная нейраминидаза) DIVA с вакцинацией для контроля рецидивирующих эпизоотий НППП, вызванного вирусами подтипа H7. Также

разработана программа профилактической вакцинации против двух подтипов H5/H7 в связи с развивающейся эпизоотологической ситуацией (Carua & Maragon, 2008).

Зарегистрированы живые рекомбинантные векторные вакцины с вставками гена гемагглютинаина вируса подтипа H5 гриппа А, которые зарегистрированы и используются в некоторых странах с 1997 года, в основном, для кур. К таким вакцинам относятся препараты на основе рекомбинантного вируса оспы птиц, рекомбинантного вируса болезни Ньюкасла и рекомбинантного герпесвируса индеек. Рекомбинантный вирус энтерита уток исследуется для возможной регистрации и использования в Китае (Китайская Народная Республика) (Liu *et al.*, 2011).

1.1. Обоснование и предусмотренное применение препарата

Экспериментальная работа с ВППП и НППП H5/H7 показала, что правильно введенные вакцины против гриппа птиц защищают от клинических признаков и смертности, снижают выделение вируса в среду и повышает резистентность к инфекции, защищают от различных полевых вирусов внутри одного и того же подтипа гемагглютинаина, защищает от контрольного заражения низкой и высокой дозой вируса и снижает выделение и, следовательно, контактную передачу инфицирующего вируса (Carua *et al.*, 2004; Swayne, 2003; Swayne & Suarez, 2000). Однако вирус все еще способен инфицировать и реплицироваться в клинически здоровых вакцинированных СПФ птицах после контрольного заражения им в высоких дозах. Большая часть работы по оценке вакцин проводилась на курах и индейках, поэтому при экстраполяции результатов на другие виды птиц следует быть внимательным. Например, в экспериментальной системе с использованием вируса ВППП H7N7 качестве материала для контрольного заражения было показано, что у кур и кольчатых чирков *Callonetta leucophrys* однократная вакцинация существенно снижала выделение вируса и повышала необходимую инфицирующую дозу, а передача между птицами значительно сокращалась. Однако у золотых фазанов *Chrysolophus pictus*, у которых даже однократная вакцинация обеспечивала клиническую защиту, не наблюдалось влияния ни на количество выделяемого инфицирующего вируса, ни на передачу вируса между птицами (Van der Goot *et al.*, 2007). В некоторых странах государственные службы запрещают или настоятельно не рекомендуют к применению вакцины, созданные для контроля или профилактики ВППП и H5/H7 НППП, поскольку считается, что использование таких вакцин может помешать проведению стратегии полного санитарного убоя. Однако большинство регламентов по контролю ВППП и H5/H7 НППП предусматривают возможность использования вакцин в чрезвычайных ситуациях.

2. Краткое описание производства и минимальных требований к традиционным вакцинам

Информация, приведенная ниже, основана, преимущественно, на опыте США и руководствах и стратегии регистрации вакцин против гриппа А в данной стране (Министерство сельского хозяйства США, 1995 г. (последняя версия 2006 г.)). Основные принципы производства вакцин, особенно, инактивированных, общие для нескольких вирусов, например, болезни Ньюкасла (Глава 2.3.14).

Руководства по производству ветеринарных вакцин приведены в Главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Руководства, представленные здесь и в Главе 1.1.8,

являются общими по характеру и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

Предприятие по производству вакцин должно работать в соответствии с надлежащими процедурами и практиками биозащиты. Если для исследований с контрольным заражением используется вирус ВППП, предприятие, проводящее такие исследования, должно соответствовать требованиям для работы с патогенами 4 группы биобезопасности, как указано в главе 1.1.4.

2.1. Характеристика посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Для любого подтипа можно использовать только хорошо охарактеризованный вирус гриппа А подтвержденной низкой патогенности, предпочтительно, из международного или национального депозитария для получения исходного вирусного материала для инактивированных вакцин. Вирусы ВППП нельзя использовать в качестве посевного вируса для вакцины. В случае ВППП предпочтительны штаммы посевного вируса, полученные с использованием методов обратной генетики и основанные на гене гемагглютинаина вируса ВППП, но их последовательность сайта разрезания должна быть изменена на последовательность вируса H5/H7 НППП.

Из исходного посевного вируса получают рабочий посевной вирус. Исходный посевной вирус и рабочий посевной вирус получают в СПФ или SAN эмбрионах кур. Получение исходного посевного вируса может включать только производство большого количества инфекционной аллантоисной жидкости (минимум 100 мл), которая может храниться в виде лиофилизированных аликвот (0,5 мл).

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, отсутствие посторонних веществ)

Проводится контроль/изучение полученного исходного посевного вируса на стерильность, безопасность, иммуногенность и отсутствие определенных посторонних возбудителей.

2.2. Способ производства

2.2.1. Процедура

Для производства вакцины сначала получают рабочий посевной вирус, из которого будут производить партии вакцин, в СПФ или SAN эмбрионах кур путем увеличения аликвоты исходного посевного вируса до достаточного объема, необходимого для производства вакцины в течение 12-18 месяцев. Рабочий посевной вирус лучше хранить в аликвотах при температуре от -60°C, поскольку лиофилизированный вирус не всегда размножается до высокого титра при последующем первом пассаже.

Стандартная процедура включает следующие этапы: разведение рабочего посевного вируса в стерильном изотоническом буфере (например, ФБР, pH 7,2), введение около 10^3 - 10^4 ЭИД₅₀ в объеме 0,1 мл в аллантоисную полость каждого из 9-11-дневных СПФ или SAN эмбрионов кур, которые затем инкубируют при 37°C. Эмбрионы, погибшие в течение 24 часов, отбраковывают. Время инкубирования будет зависеть от используемого штамма вируса и будет предварительно определено для обеспечения максимального выхода при минимальном количестве павших эмбрионов.

Перед сбором вируса зараженные яйца охлаждают при 4°C. Срезают верхнюю часть скорлупы и отсасывают аллантоисную жидкость. Следует избегать попадания желточного материала и альбумина. Все жидкости нужно немедленно поместить при температуре 4°C и исследовать на бактериальную контаминацию.

При производстве инактивированных вакцин собранную аллантоисную жидкость обрабатывали либо формальдегидом (обычная конечная концентрация – 1/1000, то есть 0,1% формалина), либо бетапропиолактоном (обычная конечная концентрация – 1/1000-1/4000, то есть 0,1-0,025% 99% чистого бетапропиолактона). Необходимое время должно быть достаточным для обеспечения отсутствия живого вируса. Большинство инактивированных вакцин производят на основе неконцентрированной инактивированной аллантоисной жидкости (активный ингредиент). Однако активные ингредиенты могут концентрировать для облегчения хранения антигена. Активный ингредиент обычно эмульгируют с минеральным или растительным маслом. Точный состав вакцины обычно является коммерческой тайной.

2.2.2. Требования для субстратов и сред

Инактивированные вакцины против гриппа А из традиционного вируса производят в 9-11-дневных СПФ или SAN эмбрионах кур. Способ производства практически не отличается от такового, используемого для размножения вируса в асептических условиях; все процедуры выполняются в стерильных условиях.

2.2.3. Контроль в процессе производства

Для инактивированных вакцин полноту инактивации нужно тестировать на эмбрионах следующим образом: отбирают минимум 10 аликвот по 0,2 мл от каждой партии и пассируют каждую аликвоту минимум дважды в СПФ или SAN эмбрионах. Вирусная инфективность должна отсутствовать.

2.2.4. Контроль серии готового продукта

Большинство стран имеют опубликованные спецификации для контроля производства и тестирования вакцин, которые включают определение обязательных тестов вакцин во время и после производства.

i) Стерильность и чистота

Тесты биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации можно найти в Главе 1.1.9.

ii) Безопасность

Для инактивированных вакцин: двойную дозу вводят рекомендованным способом десяти 3-недельным птицам, которых затем наблюдают в течение 2 недель на предмет отсутствия клинических признаков болезни или местных реакций.

iii) Иммуногенность серии

Иммуногенность вакцин против гриппа птиц обычно оценивают путем определения способности вакцины индуцировать значительный титр РТГА у СПФ или SAN птиц в реакции торможения гемагглютинации. Традиционный контроль иммуногенности с использованием трех разведенных доз с контрольным заражением вирулентным вирусом (например, Глава 2.3.14) также может использоваться в отношении вакцин, производимых для защиты от подтипов

ВПГП или H5/H7 НППП. Для инактивированных вакцин против других подтипов, когда недоступны вирулентные вирусы, контроль иммуногенности может основываться на измерении иммунного ответа или на контрольном заражении с оценкой заболеваемости и количественного снижения репликации вируса контрольного заражения в дыхательных путях (ротоглоточные или трахеальные смывы) или кишечнике (клоакальные смывы). Оценка содержания антигена гемагглютинаина (Wood *et al.*, 1985) позволяет *in vitro* экстраполяцию иммуногенности на последующие серии вакцин.

iv) Консерванты

Консервирующие вещества можно использовать для вакцин, содержащихся в контейнерах с несколькими дозами.

2.3. Требования для регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

i) Безопасность для целевых и нецелевых видов животных

Большинство инактивированных вакцин против гриппа птиц зарегистрированы для применения у кур и индеек. Необходимо проведение полевых испытаний на целевых видах птиц для определения переносимости и безопасности вакцины при введении полной дозы. В последнее время инактивированные вакцины против гриппа А стали применять для уток, гусей, другой домашней птицы и зоопарковых птиц. Применять вакцину по незарегистрированным показаниям следует с осторожностью и под наблюдением ветеринара, имеющего опыт борьбы с болезнью путем вакцинации исследуемых видов птиц. Следует избегать случайного введения масляно-эмульсионной вакцины самому себе.

ii) Возврат к вирулентности у аттенуированных/живых вакцин

Рекомендуются только инактивированные вакцины против вируса гриппа А. Не рекомендуется применять живые традиционные вакцины против гриппа любого подтипа ввиду риска реассортации сегментов гена вакцинного вируса с полевым вирусом, в результате чего могут возникнуть более вирулентные полевые вирусы.

iii) Соображения по поводу окружающей среды

Отсутствуют.

2.3.2. Требования к эффективности

i) Для животноводства

Для целей регистрации вакцины против гриппа А должны проходить контроль эффективности с контрольным заражением статистически значимого количества СПФ или SAN цыплят на группу. Контрольное заражение нужно проводить минимум через 3 недели после вакцинации с использованием дозы вируса ВПГП, которая вызывает 90% или выше смертность в невакцинированной популяции. Чаще всего используют стандартную дозу для контрольного заражения, то есть 10^6 средних инфицирующих доз для эмбриона. Минимум 80% кур в вакцинированной группе должны быть защищены. Что касается H5/H7 НППП, смертность не является характерной чертой испытания с контрольным заражением, поэтому между невакцинированными и вакцинированными группами

должно наблюдаться статически значимое снижение титра выделения вируса и/или количества птиц, выделяющих вирус из ротоглотки или клоаки.

При определении минимальных требований к антигену была предложена концентрация 50 PD₅₀ или 3 мкг гемагглютинина на дозу (Swayne & Karczynski, 2008a). Минимальный титр в РТГА у птиц в полевых условиях должен составлять 1:32 для защиты от смертности, или выше 1:128 для снижения репликации и выделения вируса контрольного заражения в среду.

ii) Для контроля и искоренения

Эффективность должна быть такой же, как и для животноводства.

2.3.3. Стабильность

При соблюдении рекомендованных условий хранения, готовая вакцина должна сохранять свою иммуногенность, как минимум, 1 год. Инактивированные вакцины нельзя замораживать.

3. Вакцины, основанные на биотехнологиях

3.1. Существующие вакцины и их преимущества

Рекомбинантные вакцины против вирусов гриппа птиц производятся путем вставки гена, кодирующего гемагглютинин вируса гриппа А, в вектор живого вируса, не принадлежащего к вирусам гриппа, с последующим использованием этого рекомбинантного вируса для иммунизации домашней птицы против гриппа А (Swayne, 2004). Рекомбинантные вакцины с живым вирусом в виде вектора обладают следующими преимуществами: 1) это живые вакцины, способные вызывать слизисто-опосредованный, гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет; 2) их можно вводить молодняку и индуцировать раннюю защиту, например, вирус оспы птиц можно вводить в суточном возрасте, он совместим с вакциной против болезни Марека и обеспечивает необходимый уровень защиты уже через неделю; 3) они позволяют дифференцировать инфицированных и вакцинированных птиц, так как они, например, не стимулируют выработку антител к нуклеопротеину или матриксным антигенам, общим для всех вирусов гриппа А. Следовательно, только у птиц, инфицированных полевым вирусом, будут вырабатываться антитела в реакции иммунодиффузии в агаровом геле или ИФА для обнаружения антител к вирусу гриппа А (к нуклеопротеину и/или матриксному антигену). Однако эти вакцины имеют ограничения ввиду того, что они плохо реплицируются и индуцируют только частичный защитный иммунитет у птиц, подвергшихся полемому заражению или вакцинации векторным вирусом, то есть вирусом оспы птиц или вирусом болезни Ньюкасла, для существующих в настоящее время рекомбинантных вакцин (Swayne & Karczynski, 2008a, b). При иммунизации суточных цыплят или молодняка действие материнских антител к векторному вирусу на эффективность вакцины может варьировать в зависимости от типа вектора. В случае с рекомбинантной вакциной с вирусом оспы птиц в качестве вектора сообщалось, что эффективности вакцинации удавалось достичь при вакцинации суточных цыплят с различными уровнями материнского иммунитета (Argiola *et al.*, 1999). Однако если ожидаются очень высокие уровни антител из-за предшествующей инфекции или вакцинации, эффективность векторной вакцины у таких суточных цыплят нужно подтверждать, для чего может

потребоваться прайм-буст вакцинация рекомбинантной вакциной с последующей бустерной вакцинацией инактивированной вакциной против гриппа А через 2-3 недели. Кроме того, учитывая, что векторы – это живые вирусы, которые имеют ограниченный диапазон хозяев (например, вирус инфекционного ларинготрахеита не реплицируется в индейках), применение таких вакцин следует ограничить видами, для которых они будут эффективными.

Использование рекомбинантных вакцин ограничивается странами, в которых они зарегистрированы и имеются в продаже на законных основаниях. Рекомбинантная вакцина против гриппа А Н5 с вирусом оспы птиц в качестве вектора зарегистрирована в Сальвадоре, Гватемале, Мексике, Китае (Китайская Народная Республика) и США (Swayne & Kapczynski, 2008a). Рекомбинантная вакцина с вирусом оспы птиц в качестве вектора, содержащая гемагглютинин Н5, произведена и проходила оценку в полевых испытаниях, но в полевых условиях эта вакцина применялась только в Мексике, Сальвадоре, Гватемале и Китае (Китайская Народная Республика), где ее использовали в кампании по вакцинации против вирусов НППП Н5N2 и ВППП Н5N1.

Вирус болезни Ньюкасла также может использоваться в качестве вектора для экспрессии генов гемагглютинина гриппа. Доказано, что рекомбинантный вакцинный вирус болезни Ньюкасла, экспрессирующий ген гемагглютинина Н5, защищает кур от контрольного заражения и вирулентным вирусом болезни Ньюкасла, и вирусом ВППП Н5N2 (Veits *et al.*, 2006). Похожий рекомбинантный вирус на основе вакцинного штамма вируса болезни Ньюкасла ЛаСота и экспрессирующий азиатскую линию гена гемагглютинина Н5 производили в Китае (Китайская Народная Республика) (Ge *et al.*, 2007). Сообщалось о его эффективности в исследованиях с использованием каждого из вирусов. Вышеуказанный вирус зарегистрирован и широко применяется в Китае (Китайская Народная Республика). Рекомбинантные вакцины на основе вируса болезни Ньюкасла эффективны для домашней птицы, у которой нет иммунитета к вектору болезни Ньюкасла, используемому в качестве вектора, однако, они обычно не оказывают эффекта при введении их в однократной дозе в качестве первичной иммунизации домашней птице с материнским иммунитетом или вакцинированной против болезни Ньюкасла. Рекомбинантные вакцины на основе вируса болезни Ньюкасла эффективны, если их использовать в качестве примиряющей вакцины с последующей бустерной вакцинацией инактивированной вакциной против гриппа А.

В последнее время разработаны две вирус-векторные вакцины со ставками гена Н5 гриппа А: 1) рекомбинантная вакцина на основе герпесвируса индеек и 2) рекомбинантная вакцина на основе вируса энтерита уток (Swayne & Spackman, 2014). Первая зарегистрирована в Египте и США, а вторая находится в процессе регистрации в Китае (Китайская Народная Республика). Обе вакцины продемонстрировали свою эффективность в лабораторных условиях, обеспечивая защиту от контрольного заражения ВППП Н5N1 кур и домашних уток, соответственно (Liu *et al.*, 2011; Rauw *et al.*, 2011). Однако полевые данные о защите в результате вакцинации векторной и традиционной вакцинами против гриппа А свидетельствуют о том, что защита при введении одной дозы векторных вакцин невозможна, т.к. защита в полевых условиях требует примиряющей векторной вакциной с последующей бустерной вакцинацией инактивированной вакциной против гриппа А или векторной вакциной (Swayne, 2012a).

Кроме этих зарегистрированных вакцин описывали различные экспериментальные вакцины против гриппа А на основе гемагглютинина H5 и H7 с использованием систем экспрессирования *in vivo* или *in vitro*, включая рекомбинантные аденовирусы, сальмонеллы, бакуловир, вирус коровьей оспы, вирус лейкоза птиц, альфавирус и вирус инфекционного ларинготрахеита (Swayne & Kapczynski 2008a). Также проводилась оценка ДНК, кодирующих гемагглютинин H5, как возможных вакцин для домашней птицы.

3.2. Специальные требования для биотехнологических вакцин, если есть

Для живых рекомбинантных векторных вакцин с вставками из генов H5 и H7 гриппа А необходимо проводить оценку их влияния на окружающую среду для определения риска вирулентности вакцины для нецелевых видов птиц и повышения вирулентности у целевых видов птиц.

4. Методы надзора для обнаружения инфекции в вакцинированных стадах и у вакцинированных птиц

Возможным решением для искоренения ВПП и H5/H7 НПП без массового убоя птицы и ущерба для экономики, особенно, в развивающихся странах является стратегия, позволяющая дифференцировать инфицированных от вакцинированных животных (DIVA) (ФАО, 2004 г.). Эта стратегия обладает преимуществами вакцинации (меньше вируса в среде), однако ее способность выявлять инфицированные стада все еще позволяет применять дополнительные меры контроля, включая полный санитарный убой. Стратегии DIVA предполагают использование одной из двух схем широкого обнаружения внутри вакцинированной популяции: 1) обнаружение вируса гриппа А («вирусная DIVA») или 2) обнаружение антител к вирусу гриппа А («серологическая DIVA»). На уровне стада простой метод состоит в регулярном мониторинге индикаторных птиц, оставленных невакцинированными в каждом вакцинированном стаде, но при этом подходе возникают некоторые проблемы, особенно, с нахождением индикаторных птиц в крупном стаде. В качестве альтернативы или вспомогательной системы можно проводить тестирование на полевой вирус у вакцинированных птиц либо путем обнаружения полевого вируса, либо антител к этому вирусу. Для обнаружения полевого вируса можно исследовать ротоглоточные или клоакальные смывы (отдельно или в пулах) от птиц, павших в результате обычного ежедневного отхода, или от больных птиц с использованием молекулярных методов, таких как ОТ-ПЦР в реальном времени или ИФА с захватом антигена, в вакцинированных популяциях (Swayne & Kapczynski 2008a).

Применение серологических схем DIVA предусматривает использование систем вакцинации, позволяющих обнаруживать заражение полевым вирусом в вакцинированных популяциях. В последние годы разработано несколько таких систем. Они включают использование вакцины, содержащей вирус с тем же подтипом гемагглютинина, но с другим подтипом нейраминидазы, чем у полевого вируса. Антитела к нейраминидазе полевого вируса являются естественными маркерами инфекции. Эта система использовалась в Италии после повторного возникновения вируса НПП H7N1 в 2000 г. Чтобы дополнить меры прямого контроля, стратегия DIVA применялась с использованием вакцины, содержащей H7N3 для борьбы с полевой инфекцией H7N1. Вакцинированных и зараженных полевым вирусом птиц дифференцировали с использованием серологического теста для обнаружения специфичных антител к нейраминидазе (Carua *et*

al., 2003). Та же стратегия применялась для контроля НППП, вызванного H7N3, в Италии в 2002-2003 гг. (Carua & Alexander, 2004), на этот раз с использованием вакцины против H7N1. В обоих случаях вакцинацию комбинировали с полным санитарным убоем с использованием описанной стратегии DIVA, что привело к искоренению полевого вируса. При использовании такой системы могут возникать проблемы в случае возникновения полевого вируса, имеющего антиген нейраминидазы, отличный от такового у существующего полевого вируса, или если подтипы вируса с другими антигенами нейраминидазы уже циркулируют в поле.

В качестве альтернативы возможно применение вакцин, содержащих только гемагглютинин, например, рекомбинантных вакцин, при использовании которых обнаруживать инфекцию в вакцинированных стадах можно с помощью классической реакции иммунодиффузии в агаровом геле и ИФА на основе нуклеокапсидного белка или матриксного белка. Для инактивированных вакцин описан тест для обнаружения антител к неструктурному вирусному белку (Tumpey *et al.*, 2005). Эта система еще не валидирована в поле.

5. Продолжение оценки и обновления посевных вакцинных штаммов для защиты против новых вариантов полевых штаммов вируса

Исторически, посевные вакцинные штаммы H5 НППП и рекомбинантные вирусы оспы птиц с вставками гена H5 обеспечивали широкую перекрестную защиту у кур против контрольного заражения различными вирусами H5 ВППП из Евразии и Северной Америки (Swayne & Karczynski, 2008a). Однако вакцины против гриппа А имели ограниченное применение в полевых условиях до 1995 года, когда в Мексике произошла вспышка ВППП H5N2, и вакцину стали использовать в рамках программы борьбы со вспышкой (Villareal 2007). Штаммы ВППП искоренили к июню 1995 года, но, поскольку вирусы НППП H5N2 продолжали циркулировать, вакцинацию продолжили проводить в качестве одной из мер контроля штаммов НППП H5N2. В течение нескольких лет появилось множество линий полевых вирусов НППП H5N2, которые ускользнули от иммунитета, вызываемого исходным вакцинным штаммом посевного вируса 1994 г., используемого в составе традиционной инактивированной вакцины (Lee *et al.*, 2004). Таким же образом, с 2005 года эмерджентные полевые вирусы ВППП H5N1 появлялись в Китае (Китайская Народная Республика), Индонезии и Египте, которые ускользали от иммунитета, вызываемого классическими инактивированными вакцинными штаммами H5, используемыми в коммерческих вакцинах (Chen & Bu, 2009; Grund *et al.*, 2011; Swayne & Karczynski, 2008b). Пока неясно, связано ли возникновение антигенных вариантов с использованием вакцин или некорректным их применением.

Все программы вакцинации против гриппа А должны включать обоснованную с эпизоотологической точки зрения программу надзора для проверки на эмерджентные варианты, а полученные репрезентативные изоляты нужно исследовать на генетические и антигенные вариации. Возможно проведение скрининга в РТГА с использованием генетически вариантных полевых вирусов и посевных вакцинных штаммов в качестве антигена, а изоляты, которые могут являться антигенными вариантами, следует анализировать с помощью методов, позволяющих количественно оценить антигенные изменения, например, с помощью антигенной картографии (Fouchier & Smith, 2010). Посевные вакцинные штаммы ВППП и H5/H7НППП, используемые в инактивированных вакцинах, и рекомбинантные вакцинные вирусы с вставками гена гемагглютинина H5 или H7 должны проходить повторную оценку, и использование посевных штаммов, не

обеспечивающих защиту, следует прекратить в случае: а) признаков возникновения антигенных вариантов или неэффективности вакцины (клиническая болезнь в вакцинированных стадах с хорошим иммунным ответом на вакцинный антиген); или б) каждые 2-3 года на эффективность против циркулирующих полевых вирусов, и использование посевных штаммов, которые более неэффективны, должно быть прекращено. Оценка посевных вакцинных штаммов должна включать полевые вирусы из всех значимых географических регионов и производственных секторов, а также анализ последовательности таких вирусов для идентификации генетических вариантов, которые в дальнейшем можно оценить на антигенные изменения, снижающие эффективность используемых вакцин. Штаммы, характерные для основных циркулирующих антигенных линий, плюс отдельные антигенные варианты должны использоваться для экспериментов с контрольным заражением против посевных штаммов существующих зарегистрированных вакцин, а также в качестве будущих посевных штаммов. На основании этой научной информации компетентный ветеринарный орган внутри страны должен определить – совместно с ведущими ветеринарными специалистами и международными организациями – выделенные в естественной среде или полученные с помощью методов «обратной генетики» посевные вакцинные штаммы НППИ для традиционных инактивированных вакцин и кассеты вставок гена гемагглютинина H5 и H7 для рекомбинантных вакцин. В некоторых ситуациях может потребоваться более одного посевного штамма для охвата всех производственных секторов в стране. Регистрации и использованию в программах контроля гриппа птиц подлежат только высококачественные и иммуногенные вакцины. Правильное введение высококачественных иммуногенных вакцин – залог выработки защитного иммунитета в популяциях домашней птицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- AGÜERO M., SAN MIGUEL E., SÁNCHEZ A., GÓMEZ-TEJEDOR C. & JIMÉNEZ-CLAVERO M.A. (2007). A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 51, 235–241.
- ALTMULLER A., KUNERL M., MULLER K., HINSHAW V.S., FITCH W.M. & SCHOLTISSEK C. (1991). Genetic relatedness of the nucleoprotein (NP) of recent swine, turkey and human influenza A virus (H1N1) isolates. *Virus Res.*, 22, 79–87.
- ARRIOLA J.M., FARR W., URIBE G. & ZURITA J. (1999). Experiencias de campo en el uso de vacunos contra influenza aviar. In; *Proceedings Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves*, Asociacion Nacional de Especialistas en Cienvias Avicelase, 3–13.
- BEARD C.W. (1970). Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull. WHO*, 42, 779–785.
- CAPUA I. & ALEXANDER D.J. (2004). Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.*, 33, 393–404.
- CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G., MUTINELLI F. & RODRIGUEZ J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, 32, 47–55.

- CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G. & TOFFAN A. (2004). Increased resistance of vaccinated turkeys to experimental infection with an H7N3 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.*, 33, 47–55.
- CAPUA I. & ALEXANDER D.J. (2008). Avian influenza vaccines and vaccination in birds. *Vaccine*, 26S, D70–D73.
- CHEN H. & BU Z. (2009). Development and application of avian influenza vaccines in China. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 333, 153–162.
- CHUA T-H., ELLIS T.M., WONG C.W., GUAN Y., GE S.X., PENG G., LAMICHHANE C., MALIADIS C., TAN S.-W., SELLECK P. & PARKINSON J. (2007). Performance evaluation of five detection tests for avian influenza antigen with various avian samples. *Avian Dis.*, 51, 96–105.
- DAS A., SPACKMAN E., SENNE D., PEDERSEN J. & SUAREZ D.L. (2006). Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *J. Clin. Microbiol.*, 44 (9), 3065–3073.
- ELVINGER F., AKEY B.L., SENNE D.A., PIERSON F.W., PORTER-SPALDING B.A., SPACKMAN E. & SUAREZ D.L. (2007). Characteristics of diagnostic tests used in the 2002 low-pathogenicity avian influenza H7N2 outbreak in Virginia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 19, 341–348.
- FEREIDOUNI S.R., HARDER T.C. & STARICK E. (2008). Rapid pathotyping of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and of H5 viruses with low pathogenicity by RT-PCR and restriction enzyme cleavage pattern (RECP). *J. Virol. Methods*, 154, 14–19.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED (FAO) (2004). FAO, OIE & WHO Technical consultation on the Control of Avian Influenza. Animal health special report.
- FOUCHIER R.A.M. & SMITH D.J. (2010). Use of antigenic cartography in vaccine seed strain selection. *Avian Dis.*, 54, 220–223.
- GALL A., HOFFMANN B., HARDER T.C., GRUND C. & BEER M. (2008). Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 2561–2567.
- GALL A., HOFFMANN B., HARDER T.C., GRUND C., EHRLICH R. & BEER M. (2009). Rapid and highly sensitive neuraminidase subtyping of avian influenza viruses by use of a diagnostic DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.*, 47, 2985–2988.
- GE J., DENG G., WEN Z., TIAN G., WANG Y., SHI J., WANG X., LI Y., HU S., JIANG Y., YANG C., YU K., BU Z. & CHEN H. (2007). Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.*, 81, 150–158.
- GRUND C., ABDELWHAB E.S., ARAFA A.S., ZILLER M., HASSAN M.K., ALY M.M., HAFEZ H.M., HARDER T.C. & BEER M. (2011). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate. *Vaccine*. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21244859.

- HOFFMANN B., HARDER T., STARICK E., DEPNER K., WERNER O. & BEER M. (2007). Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 600–603.
- IMAI M., NINOMIYA A., MINEKAWA H., NOTOMI T., ISHIZAKI T., TASHIRO M. & ODAGIRI T. (2006). Development of H5-RTLAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, 24, 6679–6682.
- KO L.S., LAU L.T., BANKS J., AHERNE R., BROWN I.H., COLLINS R.A., CHAN K.Y., XING J. & YU A.C.H. (2004). Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 336–342.
- LEE C.W., SENNE D.A. & SUAREZ D.L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.*, 78 (15), 8372–8381.
- LIU J., CHEN P., JIANG Y., WU L., ZENG X., TIAN G., GE J., KAWAOKA Y., BU Z. & CHEN H. (2011). A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks. *J. Virol.*, 85 (21), 10989–10998.
- LONDT B.Z., BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2007). Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in in vivo tests. *Avian Pathol.*, 36, 347–350.
- MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D.E. (2010). Evidence for a new avian paramyxovirus serotype-10 detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, 84, 11496–11504.
- MONNE I., ORMELLI S., SALVIATO A., DE BATTISTI C., BETTINI F., SALOMONI A., DRAGO A., ZECCHIN B., CAPUA I. & CATTOLI G. (2008). Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 46, 1769–1773.
- NAEEM K. (1998). The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemmons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 31–35.
- PASICK J., HANDEL K., ROBINSON J., COPPS J., RIDD D., HILLS K., KEHLER H., COTTAM-BIRT C., NEUFELD J., BERHANE Y. & CZUB S. (2005). Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J. Gen. Virol.*, 86, 727–731.
- POSTEL A., LETZEL T., FRISCHMANN S., GRUND C., BEER M. & HARDER T. (2010). Evaluation of two commercial loopmediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 22, 61–66.
- RAUW F., PALYA V., VAN B.S., WELBY S., TATAR-KIS T., GARDIN Y., DORSEY K.M., ALY M.M., HASSAN M.K., SOLIMAN M.A., LAMBRECHT B. & VAN DEN BERG T. (2011). Further evidence of antigenic drift and protective efficacy afforded by a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains. *Vaccine*, 29 (14), 2590–2600.
- RAO S., KONG W.P., WEI C.J., YANG Z.Y., NASON M., STYLES D., DETOLLA L.J., PANDA A., SORRELL E.M., SONG H., WAN H., RAMIREZ-NIETO G.C., PEREZ D. &

- NABEL G.J. (2008). Multivalent HA DNA vaccination protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza infection in chickens and mice. *PLoS One*, 3 (6).
- SCAHLs (SUB-COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH LABORATORY STANDARDS [AUSTRALIA/NEW ZEALAND]) (2009) SCAHLs Approved Tests. Avian Influenza b-ELISA. http://www.scahls.org.au/new_tests/scahls_approved_tests
- SIMS L.D. (2003) Avian influenza in Hong Kong. Proceeding of the Fifth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA, 14–17 April 2002. *Avian Dis.*, 47, 832–838.
- SLEMONS R.D. & D.E. SWAYNE (1990). Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.*, 34, 277–284.
- SLOMKA M.J., PAVLIDIS T., BANKS J., SHELL W., MCNALLY A., ESSEN S. & BROWN I.H. (2007b). Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis.*, 51, 373–377.
- SMITH G.J., FAN X.H., WANG J., LI K.S., QIN K., ZHANG J.X., VIJAYKRISHNA D., CHEUNG C.L., HUANG K., RAYNER J.M., PEIRIS J.S., CHEN H., WEBSTER R.G. & GUAN Y. (2006). Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 16936–16941.
- SPACKMAN E., IP HS, SUAREZ D.L., SLEMONS R.D. & STALLKNECHT D.E. (2008). Analytical validation of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction test for Pan-American lineage H7 subtype Avian influenza viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20, 612–616.
- SPACKMAN E., PEDERSEN J.C., MCKINLEY E.T. & GELB J. (2013). Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. *BMC Vet. Res.*, 9, 35.
- SPACKMAN E., SENNE D.A., MYERS T.J., BULAGA L.L., GARBER L.P., PERDUE M.L., LOHMAN K., DAUM L.T. & SUAREZ D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3256–3260.
- SPACKMAN E. & SUAREZ D.L. (2008). Detection and identification of the H5 hemagglutinin subtype by real-time RTPCR. *Methods Mol. Biol.*, 436, 27–33.
- SUAREZ D.L., DAS A., ELLIS E. (2007). Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis.*, 51, 201–208.
- SUAREZ D.L., SENNE D.A., BANKS J., BROWN I.H., ESSEN S.C., LEE C.W., MANVELL R.J., MATHIEU-BENSON C., MARENO V., PEDERSEN J., PANIGRAHY B., ROJAS H., SPACKMAN E. & ALEXANDER D.J. (2004). Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 693–699.
- SWAYNE D.E. (2003). Vaccines for list A poultry diseases; emphasis on avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)*, 114, 201–212.
- SWAYNE D.E. (2004). Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. *Dev. Biol. (Basel)*, 119, 219–228.
- SWAYNE D.E. (2012a). Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza. *Avian Dis.*, 56 (4), 818–828. SWAYNE D.E. (2012b). The role of vaccines and

vaccination in high pathogenicity avian influenza control and eradication. *Exp. Rev. Vaccines*, 11 (8), 877–880.

SWAYNE D.E. & KAPCZYNSKI D. (2008a). Vaccines, vaccination, and immunology for avian influenza viruses in poultry. In: *Avian Influenza*. Swayne D.E. ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 407–451.

SWAYNE D.E. & KAPCZYNSKI D. (2008b). Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immuno. Rev.*, 225, 314–331.

SWAYNE D.E., PAVADE G., HAMILTON K., VALLAT B. & MIYAGISHIMA K. (2011). Assessment of national strategies for control of high pathogenicity avian influenza and low pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 30 (3), 839–870.

SWAYNE D.E. & SPACKMAN E. (2013). Current status and future needs in diagnostics and vaccines for high pathogenicity avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)*, 135, 79–94.

SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 19, 463–482.

SWAYNE D.E., SUAREZ D.L. & SIMS L.D. (2013). Influenza. In: *Diseases of Poultry*, Thirteenth Edition. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nair, V., Nolan L.K. & Suarez D.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 181– 218.

TUMPEY T.M., ALVAREZ R., SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2005). A diagnostic aid for differentiating infected from vaccinated poultry based on antibodies to the nonstructural (NS1) protein of influenza A virus. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 676–683.

TONG S., LI Y., RIVAILLER P., CONRARDY C., CASTILLO D.A., CHEN L.M., RECUENCO S., ELLISON J.A., DAVIS C.T., YORK I.A., TURMELLE A.S., MORAN D., ROGERS S., SHI M., TAO Y., WEIL M.R., TANG K., ROWE L.A., SAMMONS S., XU X., FRACE M., LINDBLADE K.A., COX N.J., ANDERSON L.J., RUPPRECHT C.E. & DONIS R.O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, 4269–4274.

TONG S., ZHU X., LI Y., SHI M., ZHANG J., BOURGEOIS M., YANG H., CHEN X., RECUENCO S., GOMEZ J., CHEN L.M., JOHNSON A., TAO Y., DREYFUS C., YU W., MCBRIDE R., CARNEY P.J., GILBERT A.T., CHANG J., GUO Z., DAVIS C.T., PAULSON J.C., STEVENS J., RUPPRECHT C.E., HOLMES E.C., WILSON I.A. & DONIS R.O. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.*, 9, e1003657.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995, updated 2006). Memorandum No. 800.85. Avian influenza vaccines. USDA, Veterinary Biologics, Animal and Plant Health Inspection Services.

VAN DER GOOT, J.A., VAN BOVEN, M., KOCH, G. & DE JONG M.C.M. (2007). Variable effect of vaccination against highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus on disease and transmission in pheasants and teals. *Vaccine*, 25, 8318–8325.

VEITS J., WIESNER D., FUCHS W., HOFFMANN B., GRNZOW H., STARICK E., MUNDT E., SCHIRRMEIER H., MEBATSION, T., METTENLEITER T.C. & ROMER-OBERDORFER A. (2006). Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 8197–8202.

VILLARREAL-CHAVEZ C. (2007). Experiences in control of avian influenza in the Americas. *Dev. Biol.*, 130, 53–60.

WOOD G.W., BANKS J., STRONG I., PARSONS G. & ALEXANDER D.J. (1996). An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol.*, 25, 799–806.

WOOD J.M., KAWAOKA Y., NEWBERRY L.A., BORDWELL E. & WEBSTER R.G. (1985). Standardisation of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis.*, 29, 867–872.

WOOLCOCK P.R. & CARDONA C.J. (2005) Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis.*, 49, 477–481.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bull. WHO*, 58, 585–591.

*

* *

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по гриппу птиц (см. Таблицу в Части 4 данного *Руководства по наземным животным* или обратитесь на сайт МЭБ для получения наиболее актуального списка: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Дополнительную информацию о диагностических тестах, реактивах и вакцинах против гриппа птиц можно получить в Референтных лабораториях МЭБ

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.3.4.1.

РУКОВОДСТВО ПО БИОБЕЗОПАСНОСТИ ДЛЯ РАБОТЫ С ВИРУСАМИ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ГРИППА ПТИЦ В ВЕТЕРИНАРНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ

ВВЕДЕНИЕ

Распространение высокопатогенного гриппа птиц H5N1 по всей Азии, Африке и Европе привело к увеличению количества лабораторий, которые проводят диагностику этого патогена. Вирусы высокопатогенного гриппа птиц (ВПГП), в общем, представляют серьезную угрозу для птиц, и в восприимчивом поголовье кур смертность часто достигает 100%. Кроме того, возбудители могут представлять серьезную угрозу зоонозного распространения, при этом у людей, зараженных вирусом ВПГП H5N1, наблюдалась 50% смертность. Признавая необходимость в руководстве по тому, как осуществлять безопасную работу с вирусами ВПГП, МЭБ создал следующие руководство по уровню биозащиты для работы с образцами, которые могут содержать высокопатогенный вирус гриппа А. Оно основано на руководстве по биобезопасности, опубликованном в *Руководстве МЭБ по наземным животным* (2012) и Всемирной организацией здравоохранения (2005).

УРОВНИ БИОЗАЩИТЫ

Пробы для диагностического тестирования на высокопатогенные вирусы гриппа А с использованием следующих методов можно обрабатывать с использованием уровня биозащиты для патогенов группы 2:

- Обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) и обратная транскрипция с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР в реальном времени)
- Анализ с захватом антигена
- Серология

Процедуры выделения и идентификации вируса для работы с пробами, которые могут содержать способный к репликации вирус ВПГП в высоких титрах, должны проводиться в лаборатории с уровнем биозащиты для патогенов группы 3 или 4 согласно классификации МЭБ, включая следующее:

- Следует использовать средства индивидуальной защиты, включая лабораторную одежду с плотной передней частью, перчатки, защитные очки и респираторы с эффективностью 95% или выше.
- Образцы от возможно инфицированных птиц или животных нужно обрабатывать только в ламинарных боксах микробиологической безопасности типа II или типа III.
- Вскрытие птиц должно проводиться в боксе микробиологической безопасности типа II с обязательным использованием средств защиты дыхательных путей, таких как респиратор N95, или в боксе микробиологической безопасности типа III или в других

соответствующих боксах для первичной биозащиты с фильтрацией воздуха с 95% эффективностью.

- Центрифугирование следует проводить в запечатанных центрифужных пробирках.
- Роторы для центрифугирования нужно загружать и выгружать в боксах микробиологической защиты.
- Рабочие поверхности и оборудование подлежит обязательной деконтаминации после обработки проб.
- Контаминированные материалы нужно деконтаминировать автоклавированием или с помощью дезинфицирующей обработки перед уничтожением или их следует сжигать.

Если кур или других птиц или млекопитающих заражают вирусами ВППП, заражение следует проводить в боксе с уровнем биозащиты для работы с 4 группой патогенов, что включает:

- Зараженные куры должны содержаться в изолированных клетках или в боксах первичной биозащиты или в неизолированных клетках/напольных загонах в предназначенных для этого помещениях, таких как виварии с 3 уровнем биобезопасности, как указано Департаментом сельского хозяйства США.
- Клетки должны находиться в отдельном помещении, оборудованном для обеспечения уровня биозащиты для работы с патогенами 3 группы.
- В помещении должно поддерживаться отрицательное давление по отношению к внешней среде, а в клетках должно поддерживаться отрицательное давление по отношению к помещению.
- Клетки должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией с НЕРА фильтрами.
- В виварии должен находиться бокс с микробиологической защитой или другой бокс с первичной биозащитой для проведения патологоанатомических обследований и отбора проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ (МЭБ) (2014) *Руководство по диагностическим тестам и вакцинам по наземным животным*. <http://www.oie.int>.
2. ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ (ВОЗ) (2005 г.). *Руководство ВОЗ по биобезопасности в лаборатории для работы с образцами, которые могут содержать вирус гриппа А*, 12 января 2005 г.