

ГЛАВА 3.5.7.

ГРИПП ЛОШАДЕЙ (ИНФЕКЦИЯ ВИРУСОМ ГРИППА ЛОШАДЕЙ)

РЕЗЮМЕ

Описание болезни: Грипп – острое респираторная инфекция, поражающая лошадей, ослов, мулов и зебр, вызываемая двумя разными подтипами вируса гриппа А (H7N7, ранее «вирус лошади 1» и H3N8, ранее «вирус лошади 2»), принадлежащего к роду Вирус гриппа А семейства Orthomyxoviridae. Вирусы, принадлежащие к подтипу H7N7, в последний раз выделяли в конце 1970-х гг. Считается, что вирусы гриппа лошадей обоих подтипов произошли от вирусов птичьего гриппа, и высокопатогенный подтип птичьего гриппа H5N1 вызвал вспышку респираторного заболевания ослов в Египте. У полностью чувствительных представителей семейства лошадиных клинические признаки заболевания включают пирексию и грубый сухой кашель с последующими слизистогнойными выделениями из носа. У частично иммунных вакцинированных животных могут отсутствовать один или несколько из этих признаков. Вакцинированные инфицированные лошади могут быть распространителями вируса и являться источником вируса в своих когортах. Для гриппа характерно быстрое распространение в чувствительной популяции. Это заболевание является эндемичным во многих странах с достаточно крупными популяциями лошадей. В последние годы инфекция была занесена в Австралию и повторно занесена в Южную Африку и Японию; в настоящее время в Новой Зеландии и Исландии вирус гриппа лошадей отсутствует.

Хотя обычно инфекции вирусом гриппа лошадей ограничены представителями семейства лошадиных, подтип вируса гриппа H3N8 проник через видовой барьер и вызвал инфекцию у собак. Описана вызванная этим подтипом экстенсивная инфекция у собак Северной Америки, где обычно при этом заболевании наблюдается легкая лихорадка и кашель, но возможна пневмония с летальным исходом. Хотя вирус гриппа лошадей не вызывает заболевания у людей, описаны серологические признаки инфекции, главным образом, у лиц, подвергающихся воздействию вируса в связи с трудовой деятельностью. В период с 2004 по 2006 г. в рамках проведенного в центральном Китае фармаконадзорного исследования два вируса гриппа лошадей H3N8 были выделены у свиней.

Идентификация возбудителя: Для выделения вируса из мазки из носоглотки или смывов из носа и трахеи могут быть использованы куриные яйца с развивающимся эмбрионом (куриные эмбрионы) и/или культуры клеток. Изоляты следует незамедлительно направлять в Справочную лабораторию МЭБ. Продемонстрировать инфекцию можно также посредством обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты или антигена в выделениях из дыхательных путей, используя метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) или твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с антигенной ловушкой, соответственно.

Серологические исследования: Диагностику инфекции вирусом гриппа лошадей обычно выполняют только исследуя парные сыворотки; первый образец следует получить как можно раньше после появления клинических признаков, и второй образец – приблизительно через 2 недели после первого. Для определения содержания антител используют реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) или метод одномерного радиального гемолиза (ОРГ).

Требования к вакцинам: Использование сильнодействующих инактивированных вакцин против гриппа лошадей, содержащих эпидемиологически актуальные вирусные штаммы,

может привести к уменьшению распространения инфекции и тяжести заболевания. В состав инактивированных вакцин против гриппа лошадей входят цельные вирусные частицы либо субъединицы вируса. Вакцинные вирусы размножают в куриных эмбрионах или культуре ткани, концентрируют и перед инактивацией очищают, используя формалин или бета-пропиолактон. Инактивированные вакцины вызывают образование сывороточных антител к белку гемагглютиниру, тем самым обеспечивая защиту. Как правило, ответ оказывается непродолжительным, и для поддержания защитных уровней антител требуются многочисленные дозы. Обычно для стимуляции продолжительного сохранения защитного уровня антител необходим адъювант. В некоторых странах одобрены живые ослабленные вирусные вакцины и вакцины на основе вирусных векторов. Случаи неэффективности вакцины были обусловлены недостаточной активностью вакцины, неправильными схемами вакцинации и использованием устаревших вакцинных вирусов, эффективность которых снизилась из-за изменчивости антигенов. Для внутрипроизводственного контроля содержания антигенов в инактивированных препаратах используется испытание иммуногенности *in vitro* (методом одномерной радиальной диффузии), которое проводят перед добавлением адъюванта. Внутрипроизводственный контроль живых и векторных вакцин основан на титровании инфекционного вируса. Международные фармаконадзорные программы осуществляют мониторинг изменчивости антигенов вируса гриппа лошадей, и ежегодно Экспертная наблюдательная группа (ЭНГ) по инфекции вирусом гриппа лошадей готовит рекомендации по составу вакцинных штаммов. Для обеспечения оптимальной защиты после того, как в рекомендации внесены изменения, состав вакцины следует как можно быстрее обновить. Это требование в особенности важно для высоко мобильной популяции лошадей и для любых лошадей, которых перемещают из одной страны в другую.

А. ВВЕДЕНИЕ

Грипп лошадей вызывают два подтипа: H7N7 (ранее подтип 1) и H3N8 (ранее подтип 2) вирусов гриппа А (рода *Influenzavirus A* семейства *Orthomyxoviridae*); однако появившиеся в последние 30 лет сообщения об инфекциях, вызванных подтипом вируса H7N7 крайне неменогочисленны (Webster, 1993).

У полностью чувствительных представителей семейства лошадиных клинические признаки заболевания включают пирексию, выделения из носа и грубый сухой кашель; описаны редкие случаи пневмонии у молодых жеребят и ослов и энцефалит у лошадей (Daly *et al.*, 2006; Gerber, 1970). Клинические признаки инфекции у собак тоже включают лихорадку и кашель; в некоторых случаях инфекция приводит к гнойной бронхопневмонии и молниеносной смерти животного (Crawford *et al.*, 2005). Для гриппа характерно быстрое распространение в чувствительной популяции. Вирус распространяется через органы дыхания и опосредованно: через зараженный персонал, транспортные средства и предметы, находившиеся в контакте с патогенными микроорганизмами. У чувствительных лошадей инкубационный период может составлять менее 24 часов. У частично иммунных вакцинированных животных инкубационный период может быть более длительным, у них может отсутствовать один или несколько клинических признаков, и распространение заболевания может быть ограниченным. В связи с этими клиническая диагностика инфекции вирусом гриппа лошадей является более сложной задачей, поскольку другие вирусные заболевания, например, респираторная инфекция, ассоциированная с герпесвирусом, может по своим клиническим проявлениям быть сходной с легкой формой гриппа. Инфицированные вирусом гриппа лошади становятся чувствительными к вторичной бактериальной

инфекции, и у них могут возникнуть слизисто-гнойные выделения из носа, в результате чего будет диагностировано бактериальное заболевание, а основная причина останется незамеченной.

Полагают, что вирусы гриппа лошадей произошли от вирусов птичьего гриппа, и недавно были зафиксированы случаи передачи птичьих вирусов лошадям и ослам. Анализ геномной последовательности вируса H3N8, выделенного в 1989 г. у лошадей во время непродолжительной эпидемии гриппа в Северо-Восточном Китае, показал, что этот вирус имеет больше сходство с вирусами птичьего гриппа, чем с вирусами гриппа лошадей (Guo *et al.*, 1992). В Египте подтип птичьего гриппа H5N1 был ассоциирован с респираторным заболеванием ослов (Abdel-Moneim *et al.*, 2010).

Вирусы гриппа лошадей потенциально способны проникать через видовые барьеры и были ассоциированы с респираторным заболеванием собак, главным образом, в Северной Америке (Crawford *et al.*, 2005). В Соединенном Королевстве отдельные вспышки гриппа лошадей были зарегистрированы также у собак, но стабилизации вируса в популяции семейства собачьих не произошло. Полагают, что каждая вспышка в Соединенном Королевстве была связана с тесным контактом с инфицированными лошадьми. Вирусы гриппа лошадей были выделены также у свиней в центральном Китае (Tu *et al.*, 2009). Несмотря на периодически выявляемую серопозитивность лиц, подвергавшихся воздействию вируса в связи с профессиональной деятельностью, в настоящее время имеются лишь немногочисленные данные, указывающие на способность вируса гриппа лошадей вызывать зоонозные инфекции у человека (Alexander & Brown, 2000).

В эндемичных странах с помощью вакцинации можно минимизировать экономические потери, вызванные гриппом лошадей, и во многих конно-спортивных организациях существует обязательная вакцинация. Вакцинация не вызывает стерильный иммунитет; вакцинированные лошади могут распространять вирус и безмолвно способствовать распространению заболевания. Для того чтобы устранить такие ситуации, необходимо разрабатывать надлежащие стратегии управления рисками.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Методы исследования, применяемые для диагностики инфекции вирусом гриппа лошадей, и их назначение, кратко перечислены в Таблице 1. Лабораторная диагностика острых инфекций, вызванных вирусом гриппа лошадей, основана на детекции вируса в назальных мазках, полученных у лошадей с острым респираторным заболеванием. Альтернативно, для демонстрации серологического ответа на инфекцию может быть предпринят анализ парных образцов сыворотки. В идеале используют оба метода. Вирус гриппа лошадей может быть выделен из куриных эмбрионов или культуры клеток. Наличие инфекции можно продемонстрировать также посредством детекции вирусного антигена в секрете органов дыхания методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с антигенной ловушкой или вирусного генома методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Вирусы гриппа являются острозаразными для чувствительных организмов-хозяев, поэтому следует с осторожностью обращаться с инфицированными куриными яйцами или культурами, чтобы не допустить непреднамеренной перекрестной контаминации. В диагностических лабораториях не следует размножать стандартные штаммы, во всяком случае, это никогда не следует делать одновременно или в том же помещении, где происходит обработка диагностических образцов. До и после работ с вирусом, которые предпочтительно

проводить в ламинарных боксах II класса при 2-м уровне мер предосторожности, все рабочие поверхности следует надлежащим образом продезинфицировать.

Важно получить образцы как можно раньше после возникновения клинических признаков, предпочтительно, в первые 3-5 дней. Такими образцами являются мазки из носоглотки и смывы из носа и трахеи, для получения последних используются эндоскопические методы. Мазки могут быть получены с помощью тампонов из гигроскопической ваты/марли, закрепленных на проволоке; эти тампоны должны быть достаточно длинными, для того чтобы их можно было ввести в носоглотку через вентральный носовой ход. Сразу после использования тампоны с мазками следует поместить в пробирку с транспортной средой. Эта среда представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), содержащий 40% глицерола или 2% триптозо-фосфатного бульона с добавлением 2% раствора антибиотиков (пенициллина [10 000 единиц], стрептомицина [10 000 единиц] в стерильной дистиллированной воде [100 мл]), и 2% фунгизона (используют исходный раствор с концентрацией 250 мг/мл). Если образцы предстоит использовать для инокуляции в течение 1-2 суток, их следует хранить при температуре 4°C, но если предстоит более длительное хранение, то температура хранения должна составлять -70°C или ниже. Во время транспортировки в лабораторию следует обеспечить охлаждение образцов.

При обработке образцов следует соблюдать процедуры обеспечения качества, описанные в главе 1.1.5 *Управление качеством в ветеринарных испытательных лабораториях*, и принимать меры для предотвращения перекрестной контаминации. Для того чтобы удалить жидкость из тампона, тампон сжимают пинцетом, и затем надлежащим образом утилизируют. При высоком содержании бактерий в образцах могут быть добавлены дополнительные антибиотики. Оставшуюся жидкость хранят при -70°C. Обработанные антибиотиками образцы допустимо оставить на льду в течение 30-60 минут и затем отцентрифугировать в течение 15 минут при 1500 g для удаления бактерий и дебриса; надсадочную жидкость используют для инокуляции. Оставшуюся жидкость хранят при -70°C. Не рекомендуется фильтровать образцы, поскольку возможна адсорбция вируса гриппа на фильтре, приводящая к потерям из образца.

Таблица 1. Методы исследований, применяемые для диагностики инфекции вирусом гриппа лошадей

| Метод | Цель | | | | | |
|---|---------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| | Отсутствие инфекции в популяции | Отсутствие инфекции у отдельных животных перед перемещением | Вклад в политику искоренения | Подтверждение клинических случаев | Надзор за распространением инфекции | Иммунный статус отдельных животных или популяций после вакцинации |
| Идентификация возбудителя¹ | | | | | | |
| Выделение вируса | - | + | - | ++ | - | - |
| ОТ-ПЦР в реальном времени | - | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| БЛА | - | + | - | ++ | + | - |
| Твердофазный ИФА с антигенной ловушкой | - | ++ | ++ | +++ | ++ | - |

¹ Для анализа клинического образца рекомендуется использовать сочетание методов идентификации возбудителя.

| Детекция иммунного ответа | | | | | | |
|---------------------------|----|-----------------|----------------|------------------|-----|-----|
| РТГА | ++ | ++ ^a | - | +++ ^a | +++ | ++ |
| ОРГ | ++ | + ^a | - | +++ ^a | +++ | +++ |
| Твердофазный ИФА | + | - | + ^b | + ^a | + | + |

Пояснение: +++ = рекомендованный метод; ++ = приемлемый метод; + = может быть использован в некоторых ситуациях, но применение существенно ограничено стоимостью, достоверностью или другими факторами;

- = не подходит для данной цели.

Хотя не все тесты, относящиеся к категории +++ или ++ формально валидированы, они признаны приемлемыми по причине применения их в установившейся практике и широкого использования без неоднозначных результатов.

ОТ-ПЦР = полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; БДА = быстрая детекция антигена; РТГА = реакция торможения гемагглютинации; ОРГ = одномерный радиальный гемолиз; твердофазный ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

^a Требуется тестирование парных образцов;

^b При применении с надлежащими вакцинами может быть полезным для выявления инфекции у вакцинированных животных (ВИВЖ)

1. Идентификация возбудителя

Для выделения инфекционного вируса могут быть использованы куриные яйца с развивающимся эмбрионом или культуры клеток. Традиционно для выделения вируса гриппа лошадей предпочитали использовать куриные эмбрионы, потому что многие клинические изоляты плохо растут в клетках при отсутствии серийных пассажей. Сравнение вирусов подтипа H3N8, выделенных на куриных эмбрионах или культуре Мадин-Дарби клеток почки собаки (MDCK), показывает, что на клетках MDCK возможен отбор вариантов вируса, не являющихся репрезентативными для вируса, преобладающего в клинических образцах (Pobi *et al.*, 1994). Однако некоторые вирусы успешно выделяли на клетках MDCK, но не на куриных эмбрионах, и в результате выращивания в куриных эмбрионах тоже происходил отбор вариантов (Oxburgh & Klingborn, 1999). В идеале следует предпринять попытки выделения при использовании обоих субстратов.

В качестве более чувствительной альтернативы выделению вируса в диагностических лабораториях широко применяют ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в реальном времени (Quinlivan *et al.*, 2005). В случае подтипа H3N8 возможна также прямая детекция находящегося в назальном секрете антигена вируса гриппа методом твердофазного ИФА с антигенной ловушкой с использованием моноклонального антитела (MAb) к нуклеопротеину вируса гриппа лошадей (Livesay *et al.*, 1993). Этот анализ присутствует на рынке только в форме диагностической услуги, но могут быть приобретены не требующие дополнительных компонентов наборы для обнаружения вируса человека, и показано, что с помощью этих наборов возможна детекция антигена вируса гриппа лошадей (Chambers *et al.*, 1994; Yamanaka *et al.*, 2008). Такой подход менее чувствителен, чем ОТ-ПЦР, но позволяет быстро получить результат, на основании которого принимают решение о дальнейших действиях. Не следует использовать этот подход для того, чтобы исключить выделение вируса. Для того чтобы осуществлять мониторинг антигенной изменчивости и возникновения новых вирусов и получать изоляты для включения их в обновленные вакцины, принципиально важно, чтобы в рамках фармаконадзорной программы выделяли новые вирусы и направляли их в справочные лаборатории с целью определения характеристик этих вирусов. Положительные результаты ОТ-ПЦР и твердофазного ИФА полезны для отбора образцов с последующими попытками выделения из них вируса в случае ограниченных ресурсов, или для отбора образцов, которые будут направлены в справочную лабораторию для выделения вируса и описания его характеристик.

1.1. Выделение вируса в куриных яйцах с развивающимся эмбрионом

Оплодотворенные яйца помещают во влажную камеру, в которой поддерживается температура 37-38°C, и два раза в сутки переворачивают; через 11-12 дней яйца овоскопируют и отбирают яйца с развивающимся эмбрионом для использования. Поверхность над воздушной камерой очищают спиртом и в скорлупе проделывают небольшое отверстие. Инокулят можно вносить в амниотическую или аллантоисную полость. Несколько яиц из выборки инокулируют (0,1 мл) в амниотическую полость без разведения образца (можно также выполнить разведения образца 1/10 и 1/100 раствором PBS, содержащим антибиотики). Шприц выводят приблизительно на 1 см и вводят дополнительные 0,1 мл инокулята в аллантоисную полость. Альтернативно в некоторых лабораториях предпочитают вносить инокулят только в аллантоисную полость через второе отверстие, которое просверливают непосредственно под линией воздушной камеры. Отверстия запечатывают воском или лентой Sellotape, и яйца инкубируют в течение 3 суток при 34-35°C. Эмбрионы, погибшие в течение 24 часов после инокуляции, следует выбросить. Яйца с эмбрионами, погибшими более чем через 24 часа после инокуляции или содержащие живые эмбрионы после 3-дневной инкубации, исследуют на присутствие вируса гриппа лошадей.

Яйца переносят в камеру с температурой 4°C на 4 часа или на ночь, для того чтобы убить эмбрионы и сократить кровотечение при сборе материала. Скорлупу дезинфицируют, амниотическую и/или аллантоисную жидкость собирают пипеткой и каждую порцию помещают в отдельную емкость. Образцы тестируют на наличие гемагглютинирующей (ГА) активности, смешивая двукратные разведения собранной жидкости в равных объемах (0,025 мл) с эритроцитами цыпленка (0,5% [отношение объемов] эритроцитарной массы в растворе PBS) в титрационных микропланшетах с V- или U-образным дном, либо эритроцитами морской свинки (0,4% [отношение объемов] эритроцитарной массы в растворе PBS) в титрационных планшетах с V- или U-образным дном. Планшеты инкубируют в течение приблизительно 30 минут предпочтительно при 4°C для предотвращения нейраминидазной активности. Если используются эритроциты цыпленка, планшеты могут быть прочитаны при наклоне под углом 70°, для того чтобы неагглютинировавшие клетки стекли на дно лунки. Неагглютинировавшие клетки морской свинки выглядят как кнопка на дне лунки, и для их осаждения может потребоваться больше времени. В случае отсутствия ГА активности аликвоты, полученные при каждом сборе клеток, объединяют и пассируют в следующую серию яиц. Все ГА-положительные образцы делят на аликвоты и хранят при -70°C; одну аликвоту титруют для определения ГА сразу же. Титр ГА рассчитывают, как значение, обратное наибольшему разведению, для которого наблюдали агглютинацию. Если титр ГА составляет 1/16 или выше, характеристики изолята определяют сразу же. При низких титрах следует пассировать положительные образцы. Следует проявить осторожность, для того чтобы не допустить образования дефектных частиц; с этой целью выполняют предварительные разведения инокулята 1/10, 1/100, 1/1000. Положительные образцы, полученные из самого высокого разведения, следует отобрать и хранить в качестве исходного материала. Для выделения вируса, особенно из образцов вакцинированных лошадей, может потребоваться до пяти пассажей. Если к пятому пассажу выхода вируса не произошло, следующие пассажи, вероятно, не будут успешными.

1.2. Выделение вируса в культурах клеток

Для выделения вирусов гриппа лошадей можно использовать линию клеток MDCK (MDCK, ATCC CCL34). Клетки выращивают до сплошного слоя в пробирках, после чего их инокулируют в трех повторностях, внося по 0,25-0,5 мл каждого образца, обработанного, как описано выше. Перед инокуляцией клеточный монослой промывают

не менее одного раза тканевой культуральной средой, содержащей трипсин (2 мкг/мл) без сыворотки. Культуры поддерживают бессывороточной средой, содержащей 0,5-2 мкг/мл трипсина (обработанный ТРСК [L-1-тосиламин-2-фенилэтилхлорметилкетон] для удаления химотрипсина; можно приобрести предварительно обработанный, например, фирмы Sigma), и ежедневно осматривают для выявления признаков цитопатических эффектов (ЦПЭ). При наличии ЦПЭ или в любом случае через 7 дней после инокуляции надосадочную жидкость тестируют на ГА. Характеристики жидкости с титром ГА $\geq 1/16$ определяют сразу же. Отрицательные жидкости и жидкости с титром $<1/16$ пассируют, выполняя до пяти пассажей.

Альтернативно, может быть выполнен скрининг клеток на наличие признаков гемадсорбции (ГАД). Эта методика позволяет обнаружить экспрессию вирусных антигенов на поверхности клетки. С клеток сливают среду, и пробирки промывают раствором PBS. Добавляют одну или две капли 50%-й суспензии эритроцитов цыпленка или морской свинки, пробирки осторожно вращают и выдерживают при комнатной температуры ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) в течение 30 минут. Несвязавшиеся эритроциты отмывают раствором PBS, и культуры изучают под микроскопом для выявления признаков ГАД.

1.3. Определение подтипов гемагглютинина

Подтип ГА в новых изолятах вирусов гриппа лошадей может быть определен с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА; раздел В.2.1) и использования антисывороток, специфичных к H7N7- и H3N8. Вначале изоляты можно обработать смесью Твина 80 с эфиром, уничтожающей инфекционность вируса и снижающей риск перекрестной контаминации. В частности, в случае вирусов подтипа H3N8 такая обработка приводит к повышению ГА активности (John & Fulginiti, 1966). Однако обработка смесью Твина 80 с эфиром также снижает специфичность и может повысить изменчивость полученных результатов. Для того чтобы идентифицировать вирусы, параллельно с исследуемыми следует титровать стандартные антигены, которые должны включать антигены штамма H7N7 (т.е. A/eq/Prague/56, A/eq/Newmarket/77) и штамма H3N8 (т.е. A/eq/Newmarket/2/93, and A/eq/South Africa/4/03 и A/eq/Richmond/1/07). Штаммы вируса можно приобрести в Справочных лабораториях МЭБ (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по наземным животным*). Дополнительно следует включить последние изоляты из того же географического региона. Стандартные антигены следует обработать смесью Твина 80 с эфиром, для того чтобы не допустить перекрестной контаминации. Препараты исследуемых антигенов и стандартных антигенов всегда подвергают обратному титрованию, для того чтобы определить содержание в них антигенов.

После 1980-х гг. из образцов лошадей выделяли вирусы только подтипа H3N8. Быстрое определение последовательности гемагглютинина в H3 изолятах вируса гриппа лошадей возможно с использованием методов ОТ-ПЦР и секвенирования, в соответствии с описанием Rash *et al.* (2014), и является целесообразным в целях фармаконадзора.

Для того чтобы дополнительно охарактеризовать новые изоляты вирусов гриппа лошадей может быть использована реакция торможения гемагглютирования и штаммо-специфичные антисыворотки. Вид животных, у которого получали антитела, будет влиять на перекрестную реактивность антисыворотки, при этом наиболее штаммо-специфичные антитела получают у хорьков (Mumford, 1992). На специфичность и перекрестную реактивность сывороток влияет также схема иммунизации. Наиболее дискриминирующей считается сыворотка, полученная 3 недели назад после применения одного антигена.

Все изоляты следует немедленно направлять в Международную справочную лабораторию, определенную МЭБ или Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), для включения изолята в программу фармаконадзора над штаммами с целью мониторинга антигенной изменчивости и возникновения новых вирусов.

1.4. Определение подтипов нейраминидазы

Для определения подтипов нейраминидазы требуется специальная антисыворотка; установившаяся методика отсутствует. Субтипирование может быть также выполнено с использованием специфичных праймеров для ПЦР. После 1980-х гг. из образцов лошадей выделяли вирусы только подтипа H3N8. Быстрое определение последовательности нейраминидазы в H3 изолятах вируса гриппа лошадей возможно с использованием методов ОТ-ПЦР и секвенирования, в соответствии с описанием Rash *et al.* (2014), и является целесообразным в целях фармаконадзора.

1.5. Полимеразная цепная реакция

Методы ОТ-ПЦР в традиционном варианте и в реальном времени все шире применяются для детекции генома вируса гриппа лошадей в назальном секрете, поскольку эти методы более чувствительны, чем выращивание вируса в куриных эмбрионах или детекция нуклеопротеина с помощью наборов для быстрой детекции антигенов (БДА) вируса гриппа человека. Во время программы по ликвидации вируса в Австралии в 2007 анализ ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием зондов, основанный на использовании гена матрицы и разработанный для детекции широкого спектра штаммов вируса гриппа А, включая птичий грипп H5N1 (Heine *et al.*, 2007), объединяли с системой автоматизированной экстракции ДНК, для того чтобы создать высокопроизводительный метод анализа для массового скрининга лошадей (Foord *et al.*, 2009). Такой тип анализа, направленный на выявление всех разновидностей вируса гриппа, эффективно применяется для диагностики и наблюдения за вирусом гриппа лошадей в Референтных лабораториях МЭБ (Gildea *et al.*, 2013a). Описаны методы ОТ-ПЦР в реальном времени с зондом TaqMan®, специфичные в отношении вирусов, принадлежащих к подтипам «лошадь 2» (H3N8) и «лошадь 1» (H7N7), и на рынке появился набор для ОТ-ПЦР для детекции «гриппа лошадей» (Lu *et al.*, 2009). До настоящего времени ни один из анализов ОТ-ПЦР не валидирован в соответствии со разработанной МЭБ схемой валидации, но некоторые из анализов аккредитованы на соответствие ISO17025.

Хотя метод ПЦР тоже позволяет определить генетическую последовательность изолятов, выделение инфекционного вируса сохраняет свое принципиальное значение для исследования антигенных свойств новых изолятов и оценки антигенной изменчивости в полевых условиях.

2. Серологические исследования

Инфекции гриппа можно обнаружить, выполняя серологические исследования парных сывороток, показывающие повышение уровня специфических антител. Эти исследования следует проводить независимо от того, предпринимались попытки выделения вируса или нет. Это устойчивые методы, и могут подтвердить положительный результат без выделения вируса. Существуют два простых метода, реакция торможения гемагглютинации и и одномерный радиальный гемолиз (ОРГ), в равной степени эффективные и широко применяемые. Выпускаются наборы для твердофазного ИФА, предназначенные для определения антител к нуклеопротеину вируса гриппа, но этот метод применяется реже (Galvin *et al.*, 2013). Может быть также использована реакция связывания комплемента (РСК), но не для повсеместного использования. Парные образцы сыворотки, т.е. образец, полученный в острый период заболевания, образец, полученный в период выздоровления, следует тестировать вместе, чтобы минимизировать

влияние изменчивости в серии опытов. Стандартные антигены были описаны выше (раздел В.1.3). Следует включить изоляты, полученные у недавно переболевших животных, при наличии. Лиофилизированные постинфекционные лошадиные антисыворотки к вирусам гриппа А/лош./Ньюмаркет/77 (H7N7), А/лош./Ньюмаркет/1/93 (американская линия H3N8), А/ лош./Ньюмаркет/2/93 (европейская линия H3N8), А/лош./Южная Африка /4/03 (Клад Флорида 1, сублиния американской линии) и негативную по гриппу лошадиную сыворотку можно приобрести в Европейском директорате по качеству лекарственных средств для здравоохранения (EDQM)². Этим сывороткам по результатам международного совместного исследования были присвоены значения ОРГ, и их можно использовать при проведении анализа в качестве первичного эталона (Daly *et al.*, 2007; Mumford, 2000).

2.1. Реакция торможения гемагглютинации вируса

Вначале антиген обрабатывают смесью Твина 80/эфира, чтобы повысить чувствительность теста, особенно, в случае вирусов подтипа H3N8. Может быть также проведена реакция ТГА со сниженной чувствительностью без предварительной обработкой эфиром. Лучше всего проводить этот тест в титрационных микропланшетах с использованием надлежащего оборудования для приготовления разведений. Возможно проведение макротеста, при котором антиген разводят до конечного титра ГА 1/8 в каждой лунке, а объемы раствора PBS, сыворотки и антигена составляют 0,5 мл. Сыворотку предварительно нагревают для удаления неспецифических гемагглютининов, затем инактивируют при 56°C в течение 30 минут. Предварительная обработка включает использование одного из следующих вариантов: (а) каолин и абсорбция на эритроцитах, не рекомендована для РТГА подтипа H7N7, (b) периодат калия или (с) разрушающий рецепторы фермент *Vibrio cholerae*. Наиболее предпочтительны периодат калия или разрушающий рецепторы фермент *V. cholerae*. Обработанную сыворотку разбавляют раствором PBS, добавляют стандартную дозу антигена (при анализе методом микротитрования титр ГА составляет 1/4 на лунку) и планшет оставляют при комнатной температуре (23°C ± 2°C) на 30 минут. После осторожного перемешивания добавляют эритроциты, и через 30 минут регистрируют результаты теста. Титром РТГА является самое высокое разведение сыворотки, которое обеспечивает полное торможение агглютинации. Используют эритроциты цыпленка (1% [отношение объемов] эритроцитарную массу) в титрационных микропланшетах с V- образным дном или эритроциты морской свинки (0,5% [отношение объемов] эритроцитарную массу) в титрационных микропланшетах с V- или U-образным дном. Если используются эритроциты цыпленка, планшеты могут быть прочитаны при наклоне под углом 70°, для того чтобы неагглютинировавшие клетки стекла на дно лунки. Неагглютинировавшие клетки морской свинки выглядят как кнопка на дне лунки, и для их осаждения может потребоваться больше времени. Титром РТГА является значение, обратное наибольшему разведению, обеспечивающему полное торможение агглютинации. В настоящее время для РТГА не определено пороговое значение для положительных образцов, поэтому низкие титры следует исследовать далее. Четырехкратное или большее повышение титра при анализе парных сывороток указывает на недавно перенесенную инфекцию.

2.1.1. Обработка вируса смесью Твина 80/эфира

i) К 39,5 мл инфекционной аллантоисной жидкости добавляют 0,5 мл 10% (отношение объемов) суспензии Твина 80 в растворе PBS, чтобы концентрация Твина 80 составила 0,125% (отношение объемов).

² Штаб-квартира EDQM при Совете Европы находится по адресу Аллея Кастнер 7, Страсбург, Франция CS 30026, F-67081.

ii) После осторожного перемешивания при комнатной температуре в течение 5 минут добавляют 20 мл диэтилового эфира до конечной концентрации 33,3 объемных % и тщательно перемешивают суспензию в течение 15 минут при 4°C.

iii) После выдерживания до разделения слоев водный слой, содержащий разрушенные вирусные частицы, сливают в стеклянную бутылку со свободной крышкой и оставляют для испарения эфира в течение ночи (John & Fulginiti, 1966). При обращении с эфиром следует строго соблюдать правила безопасности и проводить работы в вытяжном шкафу.

iv) Обработанный вирус, разделенный на аликвоты, хранят при температуре -70°C.

2.1.2. Титрование гемагглютинации

i) Во все лунки ряда титрационного микропланшета вносят по 25 мкл раствора PBS.

ii) В первую лунку вносят 25 мкл вируса, затем выполняют двукратные разведения в поперечном направлении, оставляя последнюю лунку в качестве отрицательного контроля.

iii) Добавляют во все лунки дополнительно по 25 мкл раствора PBS.

iv) Добавляют во все лунки по 50 мкл эритроцитов. Оставляют на 30 минут при комнатной температуре или при 4°C (в особенности при высокой температуре окружающей среды). Определяют титр ГА, которому соответствует последнее разведение вируса, при котором наблюдается частичная ГА.

2.1.3. Предварительная обработка сывороток периодатом калия

i) Смешивают один объем (150 мкл) сыворотки с двумя объемами (300 мкл) свежеприготовленного 0,016 М периодата калия (0,38 г в 100 мл раствора PBS) и оставляют на 15 минут при 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

ii) Добавляют дополнительно один объем 3% глицерола в растворе PBS, для того чтобы нейтрализовать избыток раствора периодата, перемешивают и оставляют на 15 минут при комнатной температуре (23°C $\pm 2^\circ\text{C}$).

iii) В течение 30 минут инактивируют в водяной бане при температуре 56°C.

2.1.4. Методика анализа

i) Во все лунки титрационного микропланшета вносят по 25 мкл раствора PBS.

ii) В первую лунку 12-луночного ряда вносят сыворотку (12 мкл), затем выполняют двукратные серийные разведения (от 1/8 до не менее чем 1/512, обеспечивая возможность разведения 1/4 от обработки сыворотки), оставляя последнюю лунку в качестве контроля.

iii) Разбавляют антиген, чтобы получить дозу 4 ГА единицы (4 * минимальные агглютинирующие дозы, т.е. титр/4).

iv) В каждую лунку вносят по 25 мкл и инкубируют при комнатной температуре (22°C $\pm 2^\circ\text{C}$) в течении 30 минут.

v) В каждую лунку вносят по 50 мкл эритроцитов. Оставляют на 30 минут при комнатной температуре или при 4°C (в особенности при высокой температуре окружающей среды).

vi) Планшеты могут быть прочитаны при наклоне под углом 70°, для того чтобы неагглютинировавшие клетки стекли на дно лунки. Отсутствие агглютинации является положительным результатом.

2.2. Одномерный радиальный гемолиз

При проведении этого анализа вирусные антигены связываются с фиксированными эритроцитами, которые находятся во взвешенном состоянии в агарозе, содержащей комплемент морской свинки (С'). В агарозе пробивают отверстия и заполняют их исследуемой сывороткой. Антитела к вирусу гриппа и комплемент лизируют покрытые антигеном эритроциты, в результате чего вокруг лунки образуется прозрачная гемолитическая зона; размер этой зоны прямо пропорционален уровню штаммо-специфических антител в образце сыворотки (Morley *et al.*, 1995).

Для этого анализа можно использовать специальные планшеты для реакции иммунодиффузии (MP Biomedical), но подходят также и простые чашки Петри. Эритроциты овцы, собранные в раствор Олсвера, трижды промывают. Можно приобрести коммерческий комплемент либо использовать нормальную сыворотку морской свинки. Вирусные антигены представляют собой исходный материал, выращенный в куриных эмбрионах, либо очищенные препараты; используют такие же штаммы, как для РТГА. Вирусы связываются с эритроцитами при обработке периодатом калия или хлоридом хрома (III). Препараты антигена, связанного с эритроцитами, перемешивают с комплементом и 1% раствором (легкоплавкой) агарозы в растворе PBS. Следует внимательно следить за тем, чтобы температура ни на одном из этапов не превышала 42°C. Смесь выливают в планшеты и оставляют до застывания. В застывшей агарозе пробивают лунки диаметром 3 мм, расположенные на расстоянии 12 мм друг от друга и не менее 6 мм от края планшета. Такие планшеты могут храниться при температуре 4°C в течение 12 недель. Готовят планшеты для каждого антигена.

Сыворотку инактивируют при 56°C в течение 30 минут, необходимость в дальнейшей обработке отсутствует. Анализ парных сывороток следует проводить на одном планшете. В качестве контрольной сыворотки следует включить, как минимум, одну специфическую для подтипа антисыворотку в одну лунку на каждом планшете. Для проверки на неспецифический лизис все сыворотки тестируют на контрольном планшете, содержащем все компоненты кроме вируса. Альтернативно, на контрольном планшете можно использовать неродственный вирус, например A/PR/8/34 (H1N1). Сыворотку, демонстрирующую гемолитическую активность в отношении эритроцитов овцы, следует предварительно абсорбировать эритроцитами овцы. Зоны лизиса должны быть прозрачными, не мутными и не матовыми. Следует измерить все прозрачные зоны и рассчитать площадь гемолиза.

2.2.1. Приготовление реактивов

i) *Физиологический раствор/буферный раствор HEPES*: 0,85% NaCl (4,25 г/500 мл); 0,05 М HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин, N-2-этансульфоновой кислоты; 5,95 г/500 мл); и 0,02% азида натрия. Для коррекции до pH 6,5 используют NaOH.

ii) *Физиологический раствор/HEPES/БСА*: соответствует *Физиологическому раствору/буферному раствору HEPES* с добавлением 0,2% (масса/объем) бычьего сывороточного альбумина (БСА).

iii) *Концентрированный раствор CrCl₃ (2,25 М) 6 г/10 мл*: для каждого анализа готовят свежее разведение 1/400 в 0,85% NaCl.

iv) *Раствор PBS (Лондон)/PBS 'A'*: NaCl (10,00 г); KCl (0,25 г); Na₂PO₄ (1,45 г); KH₂PO₄ (0,25 г); и азид натрия (0,20 г). Разбавляют до 1 л дистиллированной водой.

v) *Агароза в растворе PBS*: Колбу с раствором PBS 'A' помещают на мешалку. Медленно, при перемешивании добавляют 10 г агарозы. Для растворения агарозы помещают в скороварку или автоклав. Разливают по стеклянным бутылкам для хранения при 22°C (±2°C).

vi) *Вирусный антиген*: Собирают аллантаоисную жидкость, содержащую инфекционный вирус и хранят при -70°C. Короткая кривая титрования определяет оптимальное отношение вирусный антиген/эритроциты, которое следует использовать для получения сенсibilизированных овечьих эритроцитов. Штаммы подтипа H7N7 всегда образуют прозрачные зоны, штаммы H3N8 иногда образуют мутные зоны, в этом случае необходимо центрифугировать вирус, чтобы сконцентрировать его.

vii) *Кровь овцы*: Кровь собирают в равный объем раствор Олсвера и хранят при 4°C. Может потребоваться проверить несколько овец, поскольку характеристики эритроцитов от разных овец варьируют. Кровь следует выдержать в течение 2 суток перед использованием, после этого кровь можно использовать в течение 3 недель при условии сохранения стерильности.

viii) *Комплемент*: Используют присутствующий на рынке комплемент морской свинки или получают сыворотку молодой морской свинки с массой тела 300-350 г и хранят небольшие объемы сыворотки при -70°C. Перед использованием размораживают в холодной воде и выдерживают при температуре 4°C перед добавлением в смесь.

ix) *Обработка сыворотки*: Используют неразбавленную сыворотку, термоинактивированную при 56°C в течение 30 минут. Не следует допускать повторного замораживания и оттаивания.

2.2.2. Методика анализа

i) Эритроциты овцы промывают не менее 3 раз смесью физиологического раствора/буферного раствора HEPES.

ii) Готовят требуемый объем 8% эритроцитов (отношение объемов эритроцитарной массы) в смеси физиологического раствора/HEPES, вначале рассчитав количество требуемых планшетов и исходя из 1 мл на планшет для иммунодиффузии 6 * 11 см и избыток 1-2 мл.

iii) К 8%-му раствору эритроцитов добавляют заданный объем вирусного антигена³. Выдерживают смесь в течение 10 минут при 4°C. Может наблюдаться гемагглютинация.

iv) МЕДЛЕННО добавляют CrCl₃ (1/400 в 0,85% NaCl) при половине от общего объем суспензии вируса/эритроцитов. Выдерживают при 22°C (±2°C) в течение 5 минут при периодическом перемешивании.

v) Сенсibilизированные эритроциты осаждают центрифугированием при 1500 g в течение 5 минут.

³ Готовят 3 планшета, добавляя 0,6, 1,2 или 1,8 мл вирусного антигена к 2 мл эритроцитов. Добавляют 1,3, 1,6 и 1,9 мл CrCl₃, соответственно, и ресуспендируют до объема 2 мл раствором PBS 'A'. Оптимальным является объем вирусного антигена, при использовании которого образуется самая прозрачная зона наибольшей площади соответствующей референтной сывороткой.

vi) Осторожно ресуспендируют в физиологическом растворе/HEPES/BCA и центрифугируют при 1500 g в течение 5 минут.

vii) Эритроциты ресуспендируют до получения 8% суспензии в растворе PBS 'A'.

Во время процесса сенсibilизации растворяют агарозу. Вскоре после использования пипеткой вносят объемы 7,8 мл в конические склянки с завинчивающейся крышкой и выдерживают при 42°C. Перед использованием проверяют температуру агарозы, которая не должна превышать 42°C.

2.2.3. Подготовка планшетов

i) К 7,8 мл агарозы (при 42°C) добавляют 0,9 мл сенсibilизированных вирусом эритроцитов овцы Бстро, но тщательно перемешивают.

ii) Добавляют 0,3 мл неразбавленной сыворотки морской свинки. Вновь перемешивают и разливают по планшетам для иммунодиффузии, находящимся на заливочном столике. Оставляют до застывания и высушивают на воздухе без крышки в течение 5 минут.

iii) Накрывают крышками и до использования хранят при 4°C во влажной камере.

iv) Готовят контрольные планшеты с несенсibilизированными клетками или клетками, сенсibilизированными неродственным вирусом. Партии подготовленных планшетов могут храниться в течение нескольких недель.

v) В застывшем геле пробивают отверстия диаметром 3 мм в соответствии с подготовленным трафаретом, позволяющим внести 16 исследуемых сывороток и положительную контрольную сыворотку. На планшетах с контрольным антигеном готовят пять рядов по 8 лунок.

vi) В соответствующие лунки пипеткой вносят по 10 мкл термоинактивированной (при 56°C в течение 30 минут) исследуемой сыворотки и положительную контрольную сыворотку. Инкубируют в течение 20 часов при 34°C во влажной камере.

vii) Измеряют диаметры зон и рассчитывают площади гемолиза за вычетом площади лунки.

2.2.4. Интерпретация результатов

Результаты анализа считают достоверными, если для положительной и отрицательной контрольных сывороток получены результаты, определенные международным совместным исследованием (Daly *et al.*, 2007; Mumford, 2000), либо, если эти международные стандарты не используются, результаты, согласующиеся с ожидаемыми на основании приобретенного ранее опыта. Площади гемолиза, полученные при использовании контрольных сывороток, должны быть прозрачными, и внутрилабораторная изменчивость результатов для контрольной сыворотки не должна превышать 5%. Результаты могут быть выражены в мм² или в процентах от значения, полученного для контрольной сыворотки. Сыворотки, для которых получен положительный результат на контрольном планшете, следует адсорбировать на эритроцитах овцы. В диагностических целях сыворотки, полученные в остром и конвалесцентном периодах заболевания следует тестировать в двух повторностях на одном и том же планшете. Признаком инфекции является увеличение площади зон, образованных конвалесцентными сыворотками, по сравнению с зонами, образованными

сыворотками, полученными в остром периоде. Увеличение площади на 25 мм² или 50%, в зависимости от того, как значение меньше, как правило, считается значимым, но это зависит от воспроизводимости теста в лаборатории, и должно быть эквивалентным двукратному или большему увеличению концентрации антител. Такая площадь может быть рассчитана по стандартной кривой, построенной при использовании серии разведений стандартной антисыворотки.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

1.1. Обоснование и предполагаемое использование препарата

Инфекция вирусом гриппа лошадей является самоизлечивающимся заболеванием, экономическое значение которого обусловлено, главным образом, контагиозной природой вируса и нарушением связанной с коневодством деятельности. Основными методами борьбы с этим заболеванием являются быстрая диагностика, ограничение перемещения животных и вакцинация. Вакцинация уменьшает интенсивность клинических признаков и распространение вируса. Вакцины против гриппа широко доступны и используются в плановом порядке в Европе, Америке и Азии для защиты участвующих в соревнованиях лошадей. В некоторых странах вакцинация обязательна для спортивных и скаковых лошадей, участвующих в соревнованиях, которые проводятся по правилам коневодческих организаций. После первичного курса вакцинации, включающего 3 дозы, интервалы между которыми составляют около 0, 1 и 6 месяцев, обычным минимальным требованием является ежегодная бустер-иммунизация. Молодых лошадей рекомендуется вакцинировать чаще, и некоторые коневодческие организации требуют выполнять бустер-иммунизацию два раза в год.

Типичная вакцина против инфекции вирусом гриппа лошадей состоит из инактивированных цельных вирусных частиц или гликопротеиновых субъединиц вируса, с добавлением адьюванта или без адьюванта. В рынках нескольких стран присутствуют живые ослабленные вирусные вакцины и векторные вакцины на основе поксвируса канареек. Развитие иммунитета после внутримышечного назначения инактивированных вакцин определяется стимуляцией образования циркулирующего антитела к гемагглютину, который нейтрализует вирус; показано, что некоторые вакцины стимулируют антитела в секрете органов дыхания. Критическое значение имеет поддержание целостности и конформации ГА во время процедур инактивации, для того чтобы обеспечить стимуляцию вакциной образования надлежащих нейтрализующих антител. Это можно проверить использованием иммуноанализа, например, методом простой радиальной диффузии (ПРД), которым измеряют иммунологически активный ГА, способный взаимодействовать со специфическими антителами к ГА. Для подтверждения иммуногенности вакцины можно измерить содержание антител к ГА, образование которых было стимулировано у небольших животных или целевых видов. Несколько вакцин против гриппа лошадей, включая инактивируемые цельновирионные вакцины, субъединичные вакцины и векторные вакцины на основе поксвируса канареек, способны также примировать клеточно-опосредованный иммунитет (КОИ) (Gildea *et al.*, 2013b).

Методом ПРД нельзя измерить активность живых вирусных векторных вакцин, которые содержат не антиген, а ген вируса гриппа, кодирующий ГА. Вместо этого в качестве *in-vitro* показателя активности и иммуногенности оценивают инфекционный титр рекомбинантного вируса посредством измерения содержания антител, образование которых вакцина стимулирует у целевых видов животных.

Измеренное методом ОРГ содержание антител к ГА, образование которых стимулируют инактивируемые цельновирионные вакцины, субъединичные вакцины и векторные вакцины на основе поксвируса канареек, хорошо коррелирует с защитой от инфекцией, наблюдаемой в моделях экспериментального заражения (Edlund Toulemonde *et al.*, 2005; Mumford, 1983; 1994). В отличие от вышеупомянутых вакцин, адаптированный к низким температурам, термолабильный мутант, используемый в качестве живой ослабленной вакцины, реплицируется в верхних отделах дыхательных путей и не стимулирует высокого уровня образования циркулирующих антител к ГА, но, тем не менее, обеспечивает защиту от искусственного инфицирования. Предположительно, иммунитет опосредован ответами на уровне клеток или слизистой оболочки, а не циркулирующими антителами. Как и в случае векторных вакцин, тестирование в рамках внутрипроизводственного контроля основано на измерении титра инфекционного вируса. Руководство по производству ветеринарных вакцин представлено в главе 1.1.8 *Принципы производства ветеринарных вакцин*. Представленные в данном разделе и в главе 1.1.8 рекомендации носят общий характер, поскольку производители обязаны соответствовать требованиям Европейской фармакопеи, Министерства сельского хозяйства США и другим национальным и региональным требованиям.

Все вакцины против гриппа лошадей должны содержать эпидемиологически актуальные штаммы

Начиная с 1995 г. проводится осуществляется официальная программа надзора над инфекцией вирусом гриппа лошадей. Справочные лаборатории МЭБ и другие сотрудничающие с ней лаборатории собирают данные по вспышкам инфекции вирусом гриппа лошадей и изменчивости штаммов, которые ежегодно рассматривает Экспертная наблюдательная группа (ЭНГ), включающая представителей МЖБ и ВОЗ. Эта группа готовит рекомендации о необходимости обновления состава вакцин, которые ежегодно публикуются в Бюллетене МЭБ и на сайте МЭБ. Критерии обновления вакцин против гриппа лошадей аналогичны критериям для вакцин против гриппа человека и основаны на анализе изменений антигенов, генетических изменений и, когда возможно, вспомогательных данных экспериментального заражения.

H7N7: В состав многих вакцин по-прежнему входит штамм *H7N7*. Однако Экспертная наблюдательная группа рекомендовала исключить компонент *H7N7*, поскольку сообщения об инфекциях, вызванных этим подтипом, в течение последних 30 лет не подтверждались.

H3N8: Циркулируют различные антигенные варианты вируса *H3N8* (Bryant *et al.*, 2009), и важно включить в вакцину штамм или штаммы, являющиеся эпидемиологически актуальными, в соответствии с рекомендациями Экспертной наблюдательной группы МЭБ, и опубликованными в Бюллетене МЭБ и на сайте МЭБ. Справочные лаборатории МЭБ могут оказать помощь в выборе подходящих вакцинных штаммов.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристика посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Для каждого вакцинного штамма следует приготовить прототипную партию, чтобы установить его пригодность в качестве вакцинного штамма, т.е. подтвердить чистоту и безопасность стандартными методами. Следует подтвердить способность вирусов «от посевного материала до серии продукта», расти до достижения высокого титра и создавать достаточную массу антигена для стимуляции достаточного гуморального ответа у целевых видов животных. Кроме того, вакцинный вирус, полученный в культуре клеток

MDCK должен быть полностью охарактеризован, чтобы убедиться в том, что в процессе культивирования не возникли антигенные варианты, из-за которых вакцинный вирус более не является репрезентативным для первоначального изолята.

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

Штаммы вируса можно приобрести в Справочных лабораториях МЭБ (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по наземным животным*). Необходимо описать вирусы, выбранные в качестве вакцинных штаммов, т.е. указать их происхождение и историю пассирования. Штаммы размножают в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов или в культурах клеток, например, MDCK. Все манипуляции должны проводиться отдельно для каждого штамма. Для мониторинга роста вирусов используют реакцию гемагглютинации. Для идентификации пассируемого вируса проводятся серологические тесты, например, РТГА или ОРГ, либо ПЦР с использованием специфических праймеров. Если вакцинный вирус выращен в культуре клеток, следует провести исследования антигена с сывороткой хорька и моноклональными антителами, чтобы убедиться в том, что во время пассажей при приготовлении главного посевного вируса и рабочего посевного вируса не произошел отбор вариантов вируса. Главный и рабочий посевные вирусы делят на аликвоты и после тестирования на посторонние агенты хранят в лиофилизированном состоянии при -20°C или -70° . Следует вести записи, отражающие условия хранения.

Серия главного посевного вируса каждого из выбранных вакцинных штаммов должна быть произведена в одно время, для того чтобы обеспечить однородный состав, проверена на присутствие посторонних агентов и полностью охарактеризована. Антисыворотки или моноклональные антитела, используемые в РТГА для определения характеристик вакцинных штаммов, могут быть приобретены в Справочных лабораториях МЭБ и ВОЗ. Серии рабочего посевного вируса получают из серии главного посевного вируса и должны иметь однородный состав, не содержать посторонних агентов и быть полностью охарактеризованы. Аликвоты рабочего посевного вируса используются для производства вакцины.

Серии главного и рабочего посевного вируса должны быть получены в беспатогенных куриных эмбрионах или, как минимум, в куриных эмбрионах из здорового стада.

Если для размножения вакцинного вируса используют культуру клеток MDCK, главные клеточные линии должны быть устойчивыми и храниться в жидком азоте, и не должны содержать посторонних агентов, в соответствии с предписаниями Национального контрольного органа.

Исследование посевных вирусов на содержание посторонних агентов, включая микоплазму и другие вирусы лошадей, должно быть проведено с использованием надлежащих методов, включая инокуляцию чувствительных культур ткани и изучение цитопатогического эффекта или применение флуоресцентных антител для детекции антигена.

Следует отдельно исключить присутствие других распространенных респираторных патогенов лошадей, например, герпесвирусов лошадей 1, 2, 4, пикорнавирусов лошадей, вируса артериита лошадей и аденовирусов лошадей.

Для подтверждения отсутствия бактерий используют стандартные пробы на стерильность и испытания токсичности, которые проводятся на мелких животных.

2.2. Способ изготовления вакцины

2.2.1. Методика

Производство основано на системе сохранения характеристик «от посевного материала до серии продукта», с валидированными характеристиками вакцинных штаммов. В случае использования куриных эмбрионов каждым штаммом вируса отдельно инокулируют аллантоисную полость 9-11-дневных куриных яиц с развивающимися эмбрионами, полученными из здорового стада. Яйца инкубируют при подходящей температуре в течение 2-3 дней, и собирают аллантоисную жидкость. В качестве альтернативы каждым штаммом отдельно инокулируют культуру клеток MDCK. Вирусную суспензию каждого штамма собирают отдельно и инактивируют. При необходимости вирусная суспензия может быть очищена. Могут быть добавлены подходящие адьюванты и противомикробные консерванты.

Одновалентные вирусные пулы следует как можно раньше после приготовления инактивировать методом, одобренным Национальным контрольным органом. Если используется формалин (37% формальдегид) или бета-пропиолактон (2-оксетанон), то концентрация по объему не должна превышать 0,2%. В идеале пулы следует поддерживать при температуре 4°C и инактивировать в течение 5 дней после сбора материала. Необходимо продемонстрировать инактивацию вакцины. Подходящий метод заключается в инокуляции 0,2 миллилитрами неразбавленного одновалентного пула и разведениями 1/10 и 1/100 одновалентного пула аллантоисной полости групп оплодотворенных яиц (по 10 яиц в каждой группе) с последующей инкубацией яиц при 33-37°C в течение 3 суток. При каждом уровне дозы должны выжить не менее 8 из 10 яиц. Из каждого выжившего яйца получают по 0,5 мл аллантоисной жидкости. Жидкость, отобранную из каждой группы, объединяют, и 0,2 миллилитрами каждого из 3 пулов инокулируют без разбавления следующую группу из 10 оплодотворенных яиц. В этих новых группах яиц не должна быть обнаружена активность гемагглютинаина. В некоторых странах может оказаться невозможным удовлетворить требование выживаемости 80% яиц во время инкубации; в этом случае Национальный контрольный орган должен установить модифицированное требование, которому должны соответствовать яйца. Перед инактивацией следует получить образцы для пробы на стерильность, т.е. отсутствие бактерий и грибов.

Одновалентный материал можно концентрировать и очищать до или после процедуры инактивации, используя высокоскоростное центрифугирование или другие подходящие методы, одобренные Национальным контрольным органом. Важно сконцентрировать и очистить вирус в оптимальных условиях, т.е. температурах, при которых сохраняются антигенные свойства.

Необходимо показать, что пул одновалентного вируса не содержит жизнеспособного вируса гриппа при тестировании посредством инокуляции куриных яиц с развивающимся эмбрионом, используя для этого метод, одобренный Национальным контрольным органом. Альтернативно, для демонстрации удовлетворительной инактивации можно инокулировать монослой клеток MDCK.

2.2.2 Требования к субстратам и средам

Вакцины должны быть получены в куриных эмбрионах или клеточной линии, удовлетворяющей требованиям Национального контрольного органа. Всегда, когда это осуществимо, использование вещества животного происхождения, например, сыворотки и трипсина следует свести к минимуму. К веществам животного происхождения, используемым во время производства, должна применяться надлежащая валидированная

процедура стерилизации или инактивации, либо тестирование на отсутствие посторонних микроорганизмов.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Релевантный внутрипроизводственный контроль должен применяться до и после инактивации и до и после концентрирования и очистки.

Внутрипроизводственный контроль включает следующие параметры: (a) подлинность вирусных штаммов (проверяют методом РТГА); (b) стерильность; (c) титр вируса; (d) содержание гемагглютинина (проверяют по агглютинирующим единицам в отношении эритроцитов цыпленка, ССА [агглютинация клеток цыпленка]); and (e) иммунологически активный ГА (проверяют методом ПРД или другим подходящим иммунохимическим методом).

2.2.4. Простая радиальная диффузия

ПРД – надежный метод измерения иммунологически активного ГА в пикограммах ГА, который традиционно используется для тестирования активности вакцин против гриппа человека (Wood *et al.*, 1983b).

Активность инактивированной вакцины против гриппа лошадей зависит от концентрации иммунологически активного гемагглютинина (Wood *et al.*, 1983a).

Оценка содержания антигена в вакцине лишь по агглютинации клеток цыпленка может дезориентировать, поскольку чувствительность данного метода анализа отражает способность вирусных штаммов агглютинировать эритроциты. Разрушение вируса может привести к кажущемуся увеличению содержания ГА при измерении методом ССА. Анализ методом ССА не позволяет измерить антигенные свойства ГА (ГА может сохранять свою способность связываться с эритроцитами и при утрате способности стимулировать образование антител).

В состав большинства вакцин против гриппа лошадей входит более одного варианта подтипа H3N8. В этой ситуации невозможно судить об активности отдельных компонентов H3N8 на основании результатов серологических реакций, в которых используют сыворотки, полученные у лошадей или мелких животных, вакцинированных готовым препаратом, из-за перекрестной реактивности двух изолятов одного и того же подтипа. Таким образом, важно использовать достоверный метод для измерения активности отдельных компонентов до и после инактивации и до смешивания и соединения с адьювантом.

При проведении ПРД вирусные препараты сравнивают с откалиброванным референтным препаратом с известным содержанием ГА. Антигены имеют возможность диффундировать сквозь гель, содержащий антисыворотку, специфичную к конкретному ГА. Расстояние, на которое диффундирует антиген до преципитации включенным в гель антителом, прямо пропорционально концентрации гемагглютинина в препаратах антигена.

Стандартные реактивы для тестирования методом ПРД можно приобрести в Международной лаборатории биологических стандартов ВОЗ⁴. В настоящее время можно приобрести следующие реактивы для штаммов подтипа H3N8: А/лош./Майами/63,

⁴ Национальный институт биологических стандартов и контроля, Бланш Лейн, Южный Миммс, Поттерс Бар, Хертфордшир EN6 3QG, Соединенное Королевство.

А/лош./Кентукки/81, А/ лош./Ньюмаркет /1/93 (американская линия) and А/ лош./Ньюмаркет /2/93 (европейская линия).

2.2.5. Испытания партий готового продукта

i) Стерильность и чистота

Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации описаны в главе 1.1.9.

ii) Безопасность

а) Для демонстрации отсутствия вирусной инфективности в инактивированных или субъединичных вакцинах следует выполнить два пассажа в 10 куриных яйцах с развивающимся эмбрионом. Аллантаиновая жидкость не должна обладать геммагглютинирующей активностью.

б) Используют не менее трех лошадей, каждую лошадь инокулируют внутримышечно (в двух разных местах) дозой вакцины, указанной производителем; инокуляцию повторяют через 2-4 недели. За животными наблюдают в течение 10 дней после второй серии инъекции. Должны отсутствовать аномальные местные и системные реакции.

с) Если вакцину предполагается вводить кобылам, для демонстрации безопасности следует ввести две дозы вакцины не менее чем двум жеребым кобылам в предписанном интервале триместра, для которого рекомендована вакцина. После демонстрации безопасности прототипной партии проверку безопасности на жеребых кобылах можно исключить из планового тестирования следующих партий готового продукта.

iii) Активность партии

После смешивания вирусных антигенов и адъювантов следует выполнить *in vivo* тестирование активности аликвот вакцины на лошадях и морских свинках либо используя надлежащий альтернативный иммунохимический анализ. Адъюванты становятся причиной интерференции при выполнении количественных *in vitro* тестов, например, агглютинации клеток цыпленка и ПРД, хотя ПРД можно использовать для качественного анализа готового продукта, демонстрирующего присутствие антигена каждого вакцинного штамма. Для повторного тестирования партии используют только морских свинок или подходящий альтернативный иммунохимический метод анализа, по согласованию с Национальным контрольным органом.

а) Серологические реакции лошадей

Чтобы получить достоверные результаты *in-vivo* проверки активности следует отобрать для вакцинации ранее не подвергавшихся контакту с вирусом серонегативных лошадей. Молодым лошадям или пони (не моложе 6 месяцев) следует провести скрининг на присутствие антител, используя вирусы H7N7 и H3N8, включая недавно выделенные вирусы, релевантные для района, в котором лошади были выращены. Если для скрининга используется РТГА, вирусы H3N8 следует обработать смесью Твина 80/эфира, чтобы максимизировать чувствительность анализа. Альтернативно, для того чтобы установить серонегативный статус животных, может быть использован ОРГ.

Для тестирования эффективности вакцины для лошадей, вводят рекомендуемым способом объем, соответствующий одной дозе вакцины, каждой из пяти чувствительных серонегативных лошадей. После указанного на этикетке рекомендованного интервала между первой и второй дозами каждой лошади вводят объем вакцины, соответствующий второй дозе вакцины.

У каждого животного получают по три образца крови: первый образец о время первой вакцинации, второй образец через 1 неделю после первой вакцинации для проверки анамнестической реакции на антиген, и третий образец через 2 недели после второй вакцинации.

Для того чтобы получить достоверные результаты *in vivo* проверки активности, серологический анализ, используемый для измерения гуморального иммунного ответа на содержащиеся в вакцине вирусы, должен быть стандартизированным. Предпочтительным является метод анализа ОРГ (см. раздел В.2.2), поскольку в Европейской Фармакопее можно приобрести стандартные референтные сыворотки для контроля качества препарата⁵. Чтобы убедиться в достоверности результатов проверки чувствительности метода, эти сыворотки следует тестировать параллельно с исследуемыми сыворотками; полученные значения не должны отличаться более чем на 20% от значений ОРГ, установленных в международном совместном исследовании (Daly *et al.*, 2007; Mumford, 2000). Из-за плохой повторяемости и воспроизводимости РТГА, выполненной в разных лабораториях, установить титр ГА для этих сывороток было невозможно.

После вакцинации значение антител, измеренное посредством ОРГ, должно составлять не менее 150 мм². Это значение выше требуемого в монографии Европейской фармакопеи для инактивированных вакцин против гриппа лошадей (85 мм²), поскольку данное значение не признано иммунным. Если значение, полученное для любой лошади после первой вакцинации, указывает на анамнестическую реакцию, то результат не учитывают. Выполняют дополнительное тестирование, в соответствии с приведенным выше описанием, заменив лошадей с анамнестической реакцией на равное количество новых лошадей.

Если используется метод РТГА, титр антител в каждой сыворотке, полученной после второй вакцинации в каждом тесте должен составлять не менее 1/64 (рассчитывают для первоначальной сыворотки с учетом предварительного разведения 1/8). Альтернативно, следует показать, что содержание антител, индуцированных исследуемой вакциной, по крайней мере, равно содержанию антител, индуцированных тестируемой параллельно стандартной вакциной, способностью которой защищать лошадей от экспериментальной инфекции была продемонстрирована ранее.

б) Провокационные пробы на лошадях

Провокационные пробы могут быть выполнены посредством воздействия вирулентного вируса гриппа в форме аэрозоля на вакцинированных лошадей/пони не ранее чем через 2 недели и предпочтительно более чем через 3 месяца после введения второй дозы вакцины. Эту группу сравнивают с группой невакцинированных контрольных животных, одновременно участвовавших в провокационной пробе, оценивая клинические признаки, экскрецию вируса и серологические реакции. Сроки провокационной процедуры будут отражать заявленную в спецификации продолжительность иммунитета. Наличие защиты через 2 недели после вакцинации, при максимальном уровне антител, не обязательно указывает на хорошую продолжительность иммунитета в полевых условиях.

Если при испытании на лошадях активности репрезентативной партии вакцины получены удовлетворительные результаты, то, по согласованию с Национальным контрольным органом, эти испытания можно не включать в плановый контроль других партий вакцины, приготовленных при использовании такой же системы «посевной материал-серия».

⁵ Сыворотка к вирусу А/ лош./Ньюмаркет/1/77 (Номер по каталогу E0850010), А/ лош./Ньюмаркет/1/93 (E0850021) и А/ лош./Ньюмаркет/2/93 (E0850022).

с) Серологические реакции морских свинок

Каждой из морских свинок (не менее 5), у которых отсутствуют специфические антитела, выполняют инъекцию одной дозы вакцины. Через 21 день получают образцы крови и тестируют сыворотку методом ОРГ или РТГА (см. разделы В.2.1 и В.2.2). При тестировании каждой сыворотки используют, соответственно, антиген(ы), приготовленные из штамма(ов), включенных в вакцину. При проведении каждого теста титр антител в каждой сыворотке должен быть не меньше титра, индуцированного стандартной вакциной, способностью которой обеспечивать защитные уровни антител у лошадей была продемонстрирована ранее

2.3. Требования к регистрации вакцин

2.3.1. Требования к безопасности

Требования к безопасности Национальных органов разных стран могут различаться, но обычно включают оценку назначения избыточной дозы и повторного назначения одной дозы молодым лошадям и жеребым кобылам, если вакцина предназначена для жеребых кобыл. Применительно к живым вакцинам необходимо исследовать распространение вакцинированной лошадей и передачу от вакцинированных к невакцинированным лошадям вакцинного штамма, наряду с возможными последствиями. Следует провести исследования потенциальной реверсии вирулентности при серийном пассировании живой вакцины.

2.3.2. Требования к эффективности

Требования к безопасности Национальных органов разных стран могут различаться, но обычно включают оценку серологических реакций у лошадей и исследования провокационного заражения вирусом чувствительных лошадей (см. раздел С.2.2.5.iii.b).

В тех случаях, когда в спецификации заявлена продолжительность иммунитета, эти утверждения следует подтвердить данными о продолжительности сохранения защитных уровней антител у лошадей, вакцинированных в соответствии с рекомендованной схемой. Указанные уровни антител следует валидировать в провокационных исследованиях или посредством сравнения с опубликованными сообщениями.

2.3.3. Стабильность

Вакцины следует хранить при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ в защищенном от света месте. Для демонстрации указанного в спецификации срока годности, следует периодически проверять активность аликвот, используя тест для оценки эффективности вакцины на морских свинках (см. раздел С.2.2.5. iii.c).

2.4. Требования к регистрации обновленного состава штаммов вакцины

Для того чтобы производители вакцин имели возможность быстро реагировать на рекомендации Экспертной наблюдательной группы, существующие вакцины, обновленные в соответствии с рекомендациями МЭБ, следует зарегистрировать, при условии соответствия требованиям к испытаниям партии готового продукта (см. раздел С.2.2.5).

Комитет по лекарственным средствам для ветеринарного применения (CVMP) Европейского агентства по оценке лекарственных средств (ЕМЕА) разработал руководство по соответствию зарегистрированных вакцин против гриппа лошадей рекомендациям МЭБ. В США изменения вирусных штаммов в составе вакцин против гриппа лошадей рассмотрены в Меморандуме Ветеринарных служб/Министерства сельского хозяйства США/Центра ветеринарных биопрепаратов № 800.111, в котором учтены рекомендации МЭБ.

3. Вакцины, основанные на использовании биотехнологических методов

3.1. Имеющиеся вакцины и их преимущества

Рекомбинантная вакцина на основе поксвируса канарейки представлена на рынках нескольких стран и была использована в 2007 г при осуществлении программы контроля и ликвидации инфекции вирусом гриппа лошадей в Австралии. Для различения лошадей, вакцинированных рекомбинантной вакциной, от лошадей, подвергшихся воздействию вируса в результате заражения в естественных условиях, использовали твердофазный ИФА нуклеопротеина. Такое различие было возможным благодаря тому, что в рекомбинантном поксвирусе канарейки экспрессируется только ген гемагглютинина из генома вируса гриппа лошадей. Некоторые данные указывают на возможность использования этой вакцины для примирования иммунной системы при наличии материнских антител (Minke *et al.*, 2008).

3.2. Специальные требования

Национальные органы часто требуют оценки риска для окружающей среды, которая может включать оценку прямого и опосредованного, немедленного и отдаленного нежелательного воздействия генетически модифицированных вакцин на здоровье человека и животных и окружающую среду. Может потребоваться оценка фенотипической и генетической стабильности вакцины и потенциальных взаимодействий вакцины с другими организмами.

ЛИТЕРАТУРА

ABDEL-MONEIM A.S., ABDEL-GHANY A.E. & SHANY A.S.S. (2010). Isolation and characterisation of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 from donkeys. *J. Biomed. Sci.*, doi. 10.1186/1423-0127-17-25.

ALEXANDER D.J. & BROWN I.H. (2000). Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 197–225.

BRYANT N.A., RASH A.S., RUSSELL C.A., ROSS J., COOKE A., BOWMAN S., MACRAE S., LEWIS N.S., PAILLOT R., ZANONI R., MEIER H., GRIFFITHS L.A., DALY J.M., TIWARI A., CHAMBERS T.M., NEWTON J.R. & ELTON D.M. (2009). Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet. Microbiol.*, **138**, 41–52.

CHAMBERS T.M., SHORTRIDGE K.F., LI P.H., POWELL D.G. & WATKINS K.L. (1994). Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. *Vet. Rec.*, **135**, 275–279.

CRAWFORD P.C., DUBOVI E.J., CASTLEMAN W.L., STEPHENSON I., GIBBS E.P., CHEN L., SMITH C., HILL R.C., FERRO P., POMPEY J., BRIGHT R.A., MEDINA M.J., JOHNSON C.M., OLSEN C.W., COX N.J., KLIMOV A.I., KATZ J.M. & DONIS R.O. (2005). Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, **310**, 482–485.

DALY J., DAAS A. & BEHR-GROSS M.E. (2007). Collaborative study for the establishment of a candidate equine influenza subtype 2 American-like strain A/EQ/South Africa/4/03 – horse antiserum biological reference preparation. *Pharmeuropa Bio*, **1**, 7–14.

DALY J.M., WHITWELL K.E., MILLER J., DOWD G., CARDWELL J.M. & SMITH K.C. (2006). Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association? *J. Comp. Pathol.*, **134** (2–3), 231–135. [PMID: 16527298]

EDLUND TOULEMONDE C., DALY J., SINDLE T., GUIGAL P.M., AUDONNET J.C. & MINKE J.M. (2005). Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 20003 outbreak in the United Kingdom. (2005). *Vet. Rec.*, **156**, 367–3771.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA), COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (CVMP) (1998). Note for Guidance: Harmonisation of Requirements for Equine Influenza Vaccines Specific Requirements for Substitution or Addition of a Strain or Strains. Document EMA/CVMP/112/98-FINAL, EMA, London, UK.

FOORD A.J., SELLECK P., COLLING A., KLIPPEL J., MIDDLETON D. & HEINE H.G. (2009). Real-time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with A/equine/Sydney/2007 (H3N8). *Vet. Microbiol.*, **137**, 1–9.

GALVIN P., ARKINS S., GILDEA S. & CULLINANE A. (2013). The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7 Suppl. **4**, 73–80.

GERBER H. (1970). Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. *In: Equine Infectious Diseases II*, Bryans J.T. & Gerber H., eds. S. Karger, Basel, Switzerland, 63–80.

GILDEA S., FITZPATRICK D.A. & CULLINANE A. (2013a) Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010 – 2012). *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7 Suppl 4:61-72.

GILDEA S., QUINLIVAN M., MURPHY B. & CULLINANE A. (2013b) Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings – a blinded comparison of commercially available vaccines. *Vaccine*, **31** (45), 5216–5222.

GUO Y., WANG M., KAWAOKA Y., GORMAN O., ITO T., SAITO T. & WEBSTER R.G. (1992). Characterisation of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology*, **188**, 245–255.

HEINE H.G., TRINIDAD L., SELLECK P. & LOWTHER S. (2007). Rapid detection of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by TaqMan reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **51** (Suppl. 1), 370–372.

ILOBI C.P., HENFREY R., ROBERTSON J.S., MUMFORD J.A., ERASMUS B.J. & WOOD J.M. (1994). Antigenic and molecular characterisation of host-cell mediated variants of equine H3N8 influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **75**, 669–673.

JOHN T.J. & FULGINITI V.A. (1966). Parainfluenza 2 virus: increase in haemagglutinin titre on treatment with Tween-80 and ether. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 109–111.

LIVESAY G.J., O'NEILL T., HANNANT D., YADAV M.P. & MUMFORD J.A. (1993). The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989; diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet. Rec.*, **133**, 515–519.

LU Z., CHAMBERS T.M., BOLIAR S., BRANSCUM A.J., STURGILL T.L., TIMONEY P.J., REEDY S.E., TUDOR L.R., DUBOVI E.J., VICKERS M.L., SELLS S. & BALASURIYA U.B. (2009). Development and evaluation of one-step Taqman real-time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix and hemagglutinin genes of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 3907–3913.

MINKE J.M., TOULEMONDE C.E., DINIC S., COZETTE V, CULLINANE A., AUDONNET J.C. (2007). Effective priming of foals born to immune dams against influenza by a canarypox-vectored recombinant influenza H3N8 vaccine. *J. Comp. Pathol.*, **137**, S76–S80.

MORLEY P.S., BOGDAN J.R., TOWNSEND H.G.G. & HAINES D.M. (1995). The effect of changing single radial haemolysis assay method when quantifying influenza A antibodies in serum. *Vet. Microbiol.*, **44**, 101–110.

MUMFORD J.A. (1992). Progress in the control of equine influenza. *In: Equine Infectious Disease VI: Proceedings of the Sixth International Conference*, Plowright W., Rosedale P.D. & Wade J.F., eds. Newmarket, R & W Publications, UK, 207–217.

MUMFORD J. (2000). Collaborative study for the establishment of three European Pharmacopoeia biological reference preparations for equine influenza horse antiserum. *PHARMEUROPA Special Issue, Bio 2000-1*, 5–21.

MUMFORD J.A., JESSETT D., DUNLEAVY U., WOOD J., HANNANT D., SUNDQUIST B. & COOK R.F. (1994). Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine*, **12**, 857–863.

MUMFORD J., WOOD J.M., SCOTT A.M., FOLKERS C. & SCHILD G.C. (1983). Studies with inactivated equine influenza vaccine 2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8). *J. Hyg. (Camb.)*, **90**, 385–395.

OXBURGH L. & KLINGBORN B. (1999). Cocirculation of two distinct lineages of equine influenza virus subtype H3N8. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3005–3009.

QUINLIVAN M., DEMPSEY E., RYAN F., ARKINS S. & CULLINANE A. (2005). Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5055–5057.

RASH A., WOODWARD A., BRYANT N., MCCAULEY J. & ELTON D. (2014). An efficient genome sequencing method for equine influenza (H3N8) virus reveals a new polymorphism in the PA-X protein. *Virol. J.*, **11**, 159.

TU J., ZHOU H., JIANG T., LI C., ZHANG A., GUO X., ZOU W., CHEN H. & JIN M. (2009). Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza virus from pigs in China. *Arch. Virol.*, **154**, 887–890.

WEBSTER R.G. (1993). Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet. J.*, **25**, 537–538.

WOOD J.M., MUMFORD J., FOLKERS C., SCOTT A.M. & SCHILD G.C. (1983b). Studies with inactivated equine influenza vaccine 1. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine. *J. Hyg. (Camb.)*, **90**, 371–384.

WOOD J.M., SCHILD G.C., FOLKERS C., MUMFORD J. & NEWMAN R.W. (1983a). The standardisation of inactivated equine influenza vaccines by single-radial immunodiffusion. *J. Biol. Stand.*, **11**, 133–136.

YAMANAKA T., TSUJIMURA K., KONDO T. & MATSUMURA T. (2008). Evaluation of antigen detection kits for diagnosis of equine influenza. *J. Vet. Med. Sci.*, **70**, 189–192.

*
* *

ВНИМАНИЕ: Существуют Справочные лаборатории МЭБ по диагностике гриппа лошадей (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего *Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных* или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики гриппа лошадей, просим Вас обращаться в Справочные лаборатории МЭБ.