Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК: 578.832.1:638.1

На правах рукописи

БУРАШЕВ ЕРБОЛ ДОСАНОВИЧ

Изучение биологических свойств актуальных штаммов вируса гриппа лошадей, выделенных на территории РК в 2012 году

6D060700 – Биология

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант:
Савицкая И.С.
доктор биологических наук,
доцент
Зарубежный научный консультант:
Daniel L Rock
PhD, Департамент Патологической биологии, Университет Урбана-Шампейн, Иллинойс, США

Республика Казахстан
Алматы, 2020 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ		4
ВВЕДЕНИЕ		5
1	**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**	9
1.1	Коневодство в Казахстане	9
1.2	Грипп лошадей и его возбудители	10
1.3	Морфология, геном и основные белки вируса гриппа лошадей	13
1.4	Эпизоотологическая ситуация по гриппу лошадей	14
2	**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**	20
2.1	Объекты, материалы и оборудование	20
2.2	Сбор биологического материала от животных	21
2.3	Оптимизация параметров культивирования вируса гриппа лошадей (ВГЛ) в культуре клеток и РКЭ	21
2.3.1	Культивирование вируса в культуре клеток	21
2.3.2	Культивирование вируса в РКЭ	22
2.3.3	Постановка реакции гемагглютинации	23
2.3.4	Постановка реакции торможения гемагглютинации	23
2.4	Очистка и концентрирование вируса гриппа лошадей	23
2.4.1	Очистка и концентрирование вируса гриппа лошадей методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы	23
2.4.2	Очистка и концентрирование ВГЛ методом ионообменной хроматографии	24
2.4.3	Определение антигенной активности очищенных препаратов вируса гриппа	24
2.5	Морфометрия и определение основных физико-химических свойств штаммов вируса гриппа лошадей	24
2.5.1	Изучение морфометрических характеристик вируса гриппа лошадей	24
2.5.2	Определение константы седиментации и плавучей плотности РНК вируса гриппа лошадей	24
2.6	Воздействие физических факторов на очищенный вирус гриппа лошадей	25
2.7	Электрофоретический анализ белков	26
2.8	Диагностика и идентификация вируса гриппа лошадей	26
2.8.1	Проведение ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения вируса гриппа типа А	26
2.8.2	Проведение ОТ-ПЦР для идентификации подтипов A/H3 и A/H7 вируса гриппа лошадей	27
2.8.3	Проведение ОТ-ПЦР для идентификации подтипа A/N8 вируса гриппа лошадей	27
2.8.4	Использование микрочипа при диагностике гриппа лошадей	27

2.9 Определение нуклеотидной последовательности штаммов вируса гриппа лошадей и проведение филогенетического анализа 28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 30
3.1 Эпизоотологический мониторинг 30
3.1.1 Анализ распространенности гриппа в РК 30
3.1.2 ПЦР диагностика вируса гриппа лошадей 35
3.1.3 Выделение изолятов вируса лошадей 44
3.2 Подбор культур клеток и определение оптимальных параметров культивирования штаммов вируса гриппа лошадей 46
3.3 Определение оптимальных параметров культивирования штаммов вируса гриппа лошадей в развивающихся куриных эмбрионах 50
3.4 Морфометрические и основные физико-химические свойства вируса гриппа лошадей 55
3.4.1 Получение очищенных и концентрированных препаратов вируса гриппа лошадей для электронно-микроскопических исследований 55
3.4.2 Определение плавучей плотности и константы седиментации вируса гриппа лошадей 63
3.4.3 Влияние физико-химических факторов на морфологию вирусов и их ферментативную активность 66
3.5 Секвенирование нуклеотидной последовательности штаммов вируса гриппа лошадей и проведение филогенетического анализа 73
3.6 Диагностика и идентификация ВГЛ с помощью ПЦР и олигонуклеотидного микрочипа 80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 88
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 91
ПРИЛОЖЕНИЯ 104

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АЖ – аллантоисная жидкость;
АП – аллантоисная полость;
ВАЖ – вируссодержащая аллантоисная жидкость;
ВГЛ – вирус гриппа лошадей;
ВОЗ – Всемирная Организация Здравохранения;
ВСМ – вируссодержащий материал;
ГАЕ – гемагглютинирущие единицы;
ГЛ – грипп лощадей;
ДЕАЕ – диэтиламиноэтил;
ЖМ – желточный мешок;
ИФА – иммуноферментный анализ;
КРС – крупный рогатый скот;
МДВК – почка нормального молодого бычка;
ММ – молекулярная масса;
МПА – мясопептонный агар;
МПБ – мясопептонный бульон;
МЭБ – Международное эпизоотическое бюро;
НИИПББ – Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности;
НИР – научно-исследовательская работа;
ОТ-ПЦР – обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция;
ПЦР – полимеразная цепная реакция;
РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени;
РК – Республика Казахстан;
РНК – рибонуклеиновая кислота;
РКЭ – развивающиеся куриные эмбрионы;
РГА – реакция гемагглютинации;
РТГА – реакция торможения гемагглютинации;
СПЭВ – свиные почки эмбриональные, версинизированные;
$ТЦД_{50}$– 50%-ная тканевая цитопатическая доза;
ФБР – фосфотно-буферный раствор;
ФВК – фосфорно-вольфрамовый кислый;
ХАО – хорионаллантоисная полость;
$ЭИД_{50}$ – 50%-ная эмбриональная инфекционная доза;
ВНК-21 – сублиния клеток почки новорожденного сирийского хомячка;
lg – десятичный логарифм;
НА – гемагглютинин;
MDCK – перевиваемая линия клеток (почка собаки);
M – матриксный белок;
NA – нейраминидаза;
NP – нуклеопротеид;
NS – неструктурный белок;
Vero – сублиния клеток почки африканской зеленой мартышки;

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика диссертационной работы

Работа посвящена изучению биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов вируса гриппа лошадей (ВГЛ) A/H3N8, выделенных на территории Республики Казахстан путём определения их филогенетической принадлежности и антигенной активности для последующей разработки актуальных средств специфической профилактики.

Актуальность темы исследования

В настоящее время ситуация по опасным инфекциям среди животных является актуальной проблемой для многих стран мира, в том числе и для Казахстана. Расширение экономических, торговых и туристических связей между странами существенно увеличивают риск заноса и распространения особо опасных заболеваний животных и птиц. В связи с этим, обеспечение эпизоотологической безопасности является очень важной задачей для улучшения социально-экономической ситуации в Республике Казахстан (РК).

Одной из проблем обеспечения эпизоотологической безопасности является широкое распространение инфекционных заболеваний лошадей. Это обусловлено рядом причин, основной из которых является возможность межвидового переноса вируса и распространение инфекции у поголовья вакцинированных животных [1-4].

Грипп лошадей (*grippus equorum*) – остро протекающая, высококонтагиозная, инфекционная болезнь лошадей, характеризующаяся кратковременной общим угнетением, конъюнктивитом, лихорадкой, катаральным воспалением верхних дыхательных путей, сухим, отрывистым, глубоким и болезненным кашлем, где в тяжелых случаях развивается пневмония.

Изменчивость ВГЛ требует от специалистов проведения постоянного мониторинга в различных регионах, выявления новых случаев заболевания, выделение и изучение происхождения возбудителя. Своевременное установление подтипов вируса гриппа циркулирующих в стране и регионе позволит более эффективно бороться с данным заболеванием. Изменчивость гемагглютинина и нейраминидазы со способностью менять антигенные свойства, приводят к возникновению новых штаммов вирусов гриппа, и являются причиной периодически возникающих эпидемий и пандемий. По этим причинам гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) являются одними из главных объектов молекулярных, иммунобиологических и биохимических исследований, направленных, в конечном счете, на изыскание эффективных методов борьбы с гриппом [5, 6].

В связи с широким распространением заболевания Международным сообществом приняты рекомендации по основным направлениям борьбы с гриппом лошадей: подготовка законодательства и просветительская работа, эпидемиология и эпизоотология, методы диагностики, обеспечение биологической безопасности и вакцинация [7-10].

Выполнение этих рекомендаций напрямую зависит от изучения штаммов вирусов, циркулирующих в регионе, т.к. их характеристика является основой для

создания эффективных диагностических тест-систем, а также являются неотъемлемой частью разработки технологии изготовления противовирусных вакцин [11, 12]. Поэтому работа по изучению биологических и молекулярно-генетических свойств вирусов гриппа лошадей, выделенных на территории РК, представляется актуальной и своевременной.

Цель работы: изучить биологические и молекулярно-генетические свойства штаммов вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан.

Задачи исследования:

1. Провести эпизоотологический мониторинг гриппа лошадей на территории РК с последующим выделением и идентификацией изолятов ВГЛ.
2. Определить оптимальные параметры культивирования штаммов ВГЛ в культуре клеток и развивающихся куриных эмбрионах.
3. Исследовать морфометрические характеристики ВГЛ.
4. Наработать полноразмерные сегменты и провести полногеномное секвенирование штаммов ВГЛ.
5. Провести филогенетический анализ поверхностных генов (HA, NA), для определения их родства с другими штаммами.
6. Разработать систему диагностики и субтипирования новых выделенных штаммов ВГЛ с использованием биологического микрочипа и метода цепной полимеразной реакции в реальном времени.

Объекты исследования: штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* ВГЛ, выделенные в 2012 году на территории Казахстана, и их нуклеотидные последовательности, депонированные в базе данных GenBank.

Предмет исследования: определение антигенной активности и филогенетической принадлежности штаммов ВГЛ A/H3N8, выделенных на территории Республики Казахстан, для последующей разработки актуальных средств специфической профилактики.

Научная новизна исследования

Впервые определенна и опубликованна в базе *GenBank* нуклеотидная последовательность полного генома штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и генов (HA, NA, M, NP, NS) штаммов *A/equine/Matybulak/10/2012, A/equine/LKZ/09/2012*.

Впервые установлена филогенетическая принадлежность эпизоотических штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* к клайду American, субклайду *Florila 2*, с антигенной формулой H3N8.

Впервые выявлены консервативные участки в матриксном (M) гене у штаммов ВГЛ, с использованием биоинформатических методов MEGA 7.0. Определенные консервативные нуклеотидные последовательности M гена были использованы при разработке и дизайне олигонуклеотидных микрочипов для диагностики и субтипирования вируса гриппа A/H3N8.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в изоляции штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012*, относящихся клайду American, субклайду *Florila 2*, что позволяет установить филогенетическую изменчивость изолятов относительно предыдущих эпизоотий и рекомендовать их при разработке актуальных вакцинных препаратов.

Установлены оптимальные параметры культивирования этих штаммов на РКЭ и культуре клеток MDCK, позволяющие получать вируссодержащие материалы с инфекционной активностью 7,8 – 8,3 lg ЭИД50/см^3, и гемагглютинирующим титром 1:1024 – 2048 ГАЕ, которые обеспечат напряженный иммунитет в случае использования как вакцинных кандидатов.

Отработаные методы ранней диагностики и субтипирования штаммов ВГЛ методом ОТ-ПЦР на подтип вируса гриппа A/H3N8. Изготовленные экспериментальные серии олигонуклеотидных микрочипов могут быть использованы при диагностике вируса гриппа A/H3N8.

Опубликованные в *GenBank* нуклеотидные последовательности полного генома штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и генов (HA, NA, M, NP, NS) штаммов *A/equine/Matybulak/10/2012, A/equine/LKZ/09/2012*, находятся в свободном доступе и могут быть применены при проведении сравнительного и филогенетического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

Изоляты ВГЛ из различных регионов Республики Казахстан принадлежат к подтипу ВГЛ A/H3N8.

Подбор параметров культивирования позволил получить вируссодержащие материалы с инфекционной активностью 7,8–8,3 lg ЭИД50/см^3, и гемагглютинирующим титром 1:1024–2048 ГАЕ, что соответствует требованиям вакцинных штаммов, для разработки средств специфической профилактики.

По данным филогенетического анализа нуклеотидной постедовательности генов гемагглютинина HA и нейраминидазы NA, штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012 и A/equine/LKZ/09/2012* относятся к клайду American, субклайду *Florila 2*.

Разработанная диагностическая система, вкючающая ПЦР и олигонуклеотидный микрочип позволяет идентифицировать и субтипировать вирусы гриппа A/H3N8.

Связь с планом основных научных работ

Диссертационная работа была выполнена в рамках Республиканской научно-технической программы «О.0534 Грипп лошадей: эпизоотологический мониторинг, разработка средств специфической профилактики и диагностики на 2010-2012 годы».

Апробация работы

Материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях:

- на 7-ой Международной научной конференции «Европейская наука и технологии», Германия, Мюнхен (1), 2014;

- Symposium on Eurasian Biodiversity, 23-27 May 2016, Antalya, TURKIYE;

- на Международной научной конференции “Научный форум: Медицина, биология и химия” Москва, РФ, 2018 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано всего 9 работ, из которых 2 статьи в зарубежных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus с ненулевым импакт-фактором; 3 статьи в республиканских журналах из перечня Комитета по контролю в сфере образования и науки РК; 1 статья в журнале, входящем в перечень РИНЦ; 3 тезиса в материалах международных конференций и 4 патента Республики Казахстан.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 115 страницах компьютерного текста и состоит из следующих разделов: обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение и список использованных источников из 180 наименований. Работа включает 29 таблицы, 34 рисунков и 8 приложений.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Коневодство в Казахстане

С незапамятных времен лошадь была традиционно неотъемлемой частью жизни степняка, предметом его гордости. Кроме того, лошадь давала возможность охотится и сражаться. Лошадь была источником не только пищи, одежды, домашней утвари, но и развлечения. Основными направлениями казахского коневодства всегда были: племенное; мясомолочное (продуктивное); рабочее – пользовательное; спортивное. В советский период в Казахстане было создано 19 племенных конных заводов и десятки племенных коневодческих ферм, многие из которых функционируют до сих пор [13-15]. В настоящее время министерством сельского хозяйства рекомендовано к разведению 13 пород и типов лошадей. Из верховых – арабская, ахалтекинская, чистокровная верховая; верхово-упряжных – донская, костанайская, русская тяжеловозная и русская рысистая; мясомолочных – казахская типа жабе, мугалжарская, кушумская, адаевская и кабинский мясной тип (рисунок 1).

Наиболее развитое коневодство отмечается в Алматинской, Восточно-Казахстанской, Южно-Казахстанской и Карагандинской областях. Наименьшее в Кызылординской, Мангистауской и Атырауской областях.



Жабе



Кушумская



Адаевская



Мугалжарская

Рисунок 1- Мясомолочные породы лошадей Казахстана

В стране отмечается заметное увеличение поголовья лошадей. Начиная с 2000 г. и по настоящее время, количество животных увеличилось на 86,6 % [16].

При этом среди племенных лошадей продуктивные породы занимают 76%, верховые и верхово-упряжные 22%, рысистые — около 2%.

Довольно быстрое развитие спортивного коневодства требует импорта животных, что накладывает определенные требования к санитарно-ветеринарному состоянию лошадей.

Одно из заболеваний лошадей относится к эпизоотически значимым и связано с вирусом гриппа, относящегося к семейству *Orthomyxoviridae*.

1.2 Грипп лошадей и его возбудители

Грипп лошадей (*Equine Influenza*) — инфекционная, контагиозная болезнь семейства лошадиных (лошадей, мулов, зебр и ослов), характеризующаяся общим угнетением, катаральным воспалением верхних дыхательных путей, кратковременной лихорадкой и сухим болезненным кашлем, в тяжелых случаях развивается пневмония [17, 18].

Инкубационный период длится 1-7 дней. Болезнь протекает, как правило, остро. На степень проявления признаков заболевания большое влияние оказывают индивидуальная резистентность животных, условия содержания и эксплуатации. Первые симптомы гриппа у лошадей часто не диагностируются, так как заболевание протекает легко, с признаками кашля и ринита, что связывают с раздражением слизистых оболочек дыхательных путей пылью корма и воздуха. У больных животных снижается аппетит, они быстро утомляются, появляются слизистые истечения из носовой полости и глаз, светобоязнь, отек век. Подчелюстные лимфоузлы увеличены, нередко болезненны при пальпации. Слизистая оболочка глаз, носовых ходов покрасневшая, набухшая, покрыта незначительным количеством прозрачной слизи. У животных учащается пульс, дыхание. Грипп у лошадей часто протекает доброкачественно и заканчивается клиническим выздоровлением через 2-5 дня. В отдельных случаях может наступить внезапная гибель животного в течение первых дней болезни [19-21].

Кроме перечисленных выше признаков, у инфицированных лошадей возможно поражение желудочно-кишечного тракта, катаральное воспаление слизистых оболочек влагалища у кобыл, образование отеков в области груди, задних конечностей и брюшной стенки. В случаях, когда гриппозная инфекция осложняется бактериальной или другой микрофлорой, у лошадей развиваются плевропневмония, энтериты. В таких случаях прогноз неблагоприятный, где летальность в среднем составляет 2-2,5 % [22-24].

В естественных условиях к гриппу восприимчивы лошади, независимо от пола, породы и возраста. Наиболее тяжело болеют жеребята. Заражение лошадей происходит воздушно-капельным путем при совместном содержании больных животных со здоровыми. Источником возбудителя ВГЛ являются больные и переболевшие животные [25].

Заболеваемость лошадей гриппом колеблется от 10 до 90 %, которая во многом зависит от напряженности иммунитета к данному типу возбудителя у

лошадей, условий содержания, эксплуатации их. Летальность при гриппе зависит от характера и тяжести осложнений, которые могут наблюдаться у 0,5-20 % заболевших животных [26, 27]. Также известны случаи заболевания вакцинированных лошадей [28-32].

Возбудителем гриппа лошадей является РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Orthomyxoviridae*, 80-120 нм в диаметре. ВГЛ обладает очень высоким продуктивным механизмом рекомбинаций, обеспечивающим быструю антигенную изменчивость [33, 34].

В настоящее время определены два подтипа вируса гриппа лошадей с антигенными формулами A/H7N7 и A/H3N8. Первый штамм вируса гриппа лошадей *«A/equine/Prague/56»* был изолирован в Чехословакии в 1956 году с антигенной формулой H7N7 [35]. Считается, что подтип A/H3N8 появился из-за мутации вируса птичьего гриппа [36, 37]. Эталонным штаммом второго подтипа A/H3N8 является *«A/equine/Miami/63»*, который впервые был выделен в Майами в 1963 году [38-41]. Начиная с 1980 года, подтип A/H3N8 вируса гриппа связан со всеми подтвержденными случаями заболевания [42-47]. В связи с этим, в конце 60-х годов прошлого века вакцины против гриппа лошадей содержали одновременно 2 прототипных штамма – *A/equine/Prague/56* и *A/equine/Miami/63*. Это обеспечивало защиту животных от штаммов возбудителя гриппа лошадей, которые в то время были широко распространены.

Многие клинические признаки, вызванные гриппом лошадей, наблюдаются при заражении другими респираторными патогенами, такими как лошадиный герпесвирус 1 и 4 (EHV-1 и EHV-4), вирус артериита, вирусы ринита А и В и лошадиный аденовирус. В связи с этим, предварительный диагноз на грипп лошадей необходимо подтверждать лабораторными исследованиями [48-50].

Вариабельность антигенных свойств является фундаментальной особенностью вирусов гриппа типов А и В. Изменения в основном происходят в поверхностных антигенах ВГЛ гемагглютинине и нейраминидазе [51].

В отличие от своих предшественников новые штаммы вирусов, не связываются со специфическими антителами, которые накапливаются в популяции. Эволюционный механизм приспособляемости вируса является важным свойством, обеспечивающим выживаемость инфекционного агента. Учитывая данные экологической гипотезы, сохранению и дальнейшему распространению возбудителя гриппа способствует переход вируса или его генов в популяцию животных [52-55].

Имеется предположение, что появление новых пандемических штаммов происходит в результате «реассортации» генов вируса гриппа животных и человека. После каждой крупной эпидемии гриппа соответствующие вирусы обнаруживают в популяциях животных. Данный процесс легко воспроизводится в лаборатории и наблюдается в природе [56].

Таким образом, как даже непатогенный вирус попадает в неиммунное поголовье лошадей, происходят мутационные процессы. Изменения генома могут привести к тому, что через некоторое время штамм может стать более патогенным и поразить животных.

Начиная с 1989 г. начались эпидемии гриппа лошадей в Европе и США. Несмотря на тот факт, что во время этих вспышек удавалось изолировать исключительно штаммы подтипа A/H3N8, заболевали как привитые, так и не привитые животные [57]. Сравнение выделенных в период этих вспышек изолятов вируса гриппа лошадей с существовавшими в то время вакцинными штаммами позволило выявить между ними значительные различия, вызванные антигенным дрифтом. Первая вспышка заболевания, вызванная измененным вирусом A/H3N8 (названного *«A/eq/Jilin/89/H3N8»*) была зарегистрирована в 1989 году в Китае. При этом наблюдался высокий уровень заболеваемости (80 %) и смертности (20 %) среди животных. Изоляты, выделенные во время этой вспышки, проявили слабую перекрестную реактивность с антисыворотками к известным штаммам A/H3N8 американского и европейского типов. Анализ нуклеотидной последовательности изолятов, выделенных от больных лошадей во время этой вспышки, показал, что наиболее вероятным источником инфекции стали птицы, от которых агент перешел на лошадей.

В 1993 году в Китае произошла вторая вспышка гриппа лошадей. Ее вызвал штамм *A/equine/Hong Kong/1/92*, относившийся к обычному подтипу A/H3N8 и проявлявший близкое родство с европейскими изолятами агента, выделенными в 1991 г. [58].

В естественных условиях ВГЛ патогенны исключительно для однокопытных [59, 60]. Однако существуют сведения, о том, что некоторые типы вируса гриппа А могут инфицировать несколько видов животных и преодолевать межвидовой барьер [61]. Первый случай межвидового переноса вируса гриппа лошадей A/H3N8 от лошадей к собакам был описан в 2005 году [62]. Отмечают также родство между вирусами гриппа лошадей и некоторыми типами вируса гриппа птиц [63-65]. Это свидетельствует о том, что многие типы животных: птицы, свиньи, лошади, морские млекопитающие, могут быть инфицированы вирусом гриппа А.

Установлено, что в природе происходит обмен вирусами гриппа между человеком и лошадью, причём ВГЛ способен преодолевать видовой барьер и вызывать инфицирование человека. Проявление гриппа лошадей у человека варьирует от бессимптомного до слабо клинически выраженного. С другой стороны, есть сведения, что вирусы гриппа человека могут развиваться в организме лошадей [66-68]. Венгерскими учеными, был изолирован вирус гриппа свиней от больных гриппом лошадей [69, 70].

Большое многообразие штаммов вируса гриппа, выделенных от различных видов животных свидетельствует о широком распространении этого вируса в природе. Грипп занимает особое положение, среди инфекционных болезней лошадей, что обусловлено чрезвычайной изменчивостью возбудителя.

В связи с этим экспертная группа, включающая представителей трех лабораторий Международного эпизоотического бюро (МЭБ) и трех лабораторий Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно представляет эпизоотологическую и эпидемиологическую информацию о циркулирующих штаммах вируса гриппа в мире, дает рекомендации об использовании штаммов

в составе вакцины и использовании методик определения качества вакцин. Данные рекомендации ежегодно публикуются в Бюллетене МЭБ.

1.3 Морфология, геном и основные белки вируса гриппа лошадей

ВГЛ относится к роду *Influenza A* семейство *Orthomyxoviridae* и размеры вирионов составляют 80-120 нм. Генетическая информация вируса гриппа зашифрована в 8 сегментах однонитчатой РНК. Они содержат фрагментированную однонитчатую РНК. Сегменты РНК различаются по длине (830-2341 нуклеотид), величине ММ (0,2-1,0 мД), коэффициенту седиментации (7-23 S), последовательности расположения нуклеотидов. В состав вириона входит РНК-зависимая РНК-транскриптаза. Молекулы однонитчатой РНК имеют неинфекционную полярность. Геном составляет примерно 1 %, а белки около 70 % массы вириона и построены из нейтральных и дикарбоновых аминокислот [71-74].

Нуклеопротеид (NP) – доминирующая белковая субъединица нуклеокапсида. Подсчитано, что одна молекула NP взаимодействует приблизительно с 10 нуклеотидами. Остальные 3 белка (PB1, PB2, PA) ассоциированные с РНП, содержатся в минорных количествах. В зрелом вирионе РНП образует единую структуру с ММ 5,9 мД. Морфология РНП определяется белок-белковыми взаимодействиями, РНК и NP связываются друг с другом благодаря ионным взаимодействиям заряженных групп белка с фосфорнодиэфирным остовом РНК [75].

Нуклеопротеидный белок с относительной ММ 58-60 кД (удельное содержание 14-20 %) не гликолизирован, формирует чехол для РНК, участвует в инициации инфекции, обладает антигенной специфичностью, стабильность которой позволяет распознавать вирус гриппа родов А, В, С.

Матриксный белок представлен в вирионе в наибольшем количестве (его удельное содержание составляет приблизительно 23%), однако он самый мелкий (ММ 21-28 кД), не гликолизирован, образует непрерывный молекулярный каркас (мембрану) липидного бислоя [76].

Характерной морфологической особенностью вирусных частиц гриппа лошадей является липидная оболочка с поверхностными выступами или шипами длиной 10-14 нм и шириной 4-8 нм, разделенные пространством 6-7 нм и радиально ориентированными наружу. Распределение шипов на поверхности вириона неравномерно: каждый имеет 5 соседних, и они между собой связаны в соты. На вирионы округлой формы приходится 700-800 шипов, у нитевидных вирусных частиц их значительно больше. Шипы образованы белками двух типов: стержнеобразные шипы гемагглютинина (HA) и гирообразные шипы нейраминидазы (NA). Соотношение субъединиц HA и NA у вирионов гриппа лошадей варьирует в пределах 5:1 (около 400 субъединиц HA и 80 NA) [77].

Гемагглютинин является главным поверхностным антигеном вируса гриппа, стимулирующим выработку в инфицированном организме вируснейтрализующих антител [78].

Нейраминидаза также является антигеном вируса гриппа и обладает достаточно высокой антигенной активностью. Антитела к нейраминидазе могут

быть обнаружены в организме человека спустя много лет после их синтеза [79, 80].

Вариабельность гемагглютинина и нейраминидазы со способностью менять антигенные свойства, приводят к возникновению новых штаммов вирусов гриппа, и являются причиной периодически возникающих эпидемий и пандемий. По этим причинам HA и NA являются одними из главных объектов молекулярных, иммунобиологических и биохимических исследований, направленных, в конечном счете, на изыскание эффективных методов борьбы с гриппом. Проведение такого рода исследований определяется возможностью получения чистого HA и NA в препаративных количествах из антигенно различных штаммов вируса гриппа [81].

Для выделения отдельных компонентов вируса были подобраны методики, позволяющие выделять чистые препараты белков для изучения их физических и антигенных свойств. Известно, что белки исследуемого штамма имеют незначительно различающиеся значения молекулярных масс от других штаммов [82]. Выделенные белки сохраняют антигенную активность и могут быть использованы в серологических реакциях при выявлении вируса гриппа, а также определении подтипа гемагглютинина H3. Полученные в чистом виде поверхностные и внутренние антигены вируса гриппа могут быть использованы для получения моновалентных сывороток, а также в производстве субъединичных вакцин [83].

На грипп лошадей окончательный диагноз ставят на основании результатов лабораторного исследования. Для прижизненной диагностики материалом служит носовая слизь, выделенная в первые дни болезни, а для посмертной – кусочки легких, глотки, трахеи, слизистой оболочки носа, взятая от павших лошадей. Для ретроспективной серологической диагностики используют парные пробы сыворотки крови, взятые у животных в первые дни болезни и спустя 14-20 дней с целью выявления прироста уровня антител. Патологический материал исследуют в ПЦР и ИФА [84].

В настоящее время в вирусологической практике широкое развитие получает использование новых методических подходов, как в прикладном, так и в фундаментальном аспекте. Среди них ведущее место заняли следующие молекулярно-генетические методы: молекулярное клонирование, секвенирование нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция и биологические микрочипы. Основное преимущество этих методов, по сравнению с иммунологическими, состоит в возможности их использования при латентном и хроническом течении инфекции, они позволяют определять генетическое родство возбудителя и его таксономическую принадлежность.

1.4 Эпизоотологическая ситуация по гриппу лошадей

Анализ эпизоотологической ситуации, по данным МЭБ показывает, что, начиная с 2005 года и по настоящее время грипп лошадей (*Equine influenza*) регистрируется во многих странах мира [85]. Все подтвержденные случаи были вызваны подтипом вируса гриппа лошадей H3N8, который, по литературным

данным, начиная с 1980 года, связан со всеми случаями заболевания у лошадей [86-88]. Распространение гриппа лошадей в мире представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Подтвержденные МЭБ случаи заболевания гриппом лошадей

Страна	Статус	Число вспышек	Заболело животных	Число смертельных случаев
2005 год				
Тунис	прекращена 04.07.2005	1	4	0
2006 год, вспышки не зарегистрированы				
2007 год				
Австралия	прекращена 25.12.2007	240	1497	1
Китай	прекращена 04.07.2008	3	5515	0
Япония	прекращена 02.07.2009	120	2335	0
Монголия	прекращена 01.05.2008	7	9503	9
2008 год				
Китай	прекращена 04.07.2008	3	6336	9
Египет	прекращена 29.09.2008	7	617	0
Индия	продолжается	40	19273	16
Япония	прекращена 02.07.2008	120	2512	0
Монголия	прекращена 01.05.2008	7	9503	9
2009 год				
Япония	прекращена 02.07.2009	120	2512	0
		2010 год		
Индия	прекращена 09.07.2010	40	19523	21
2011 год				
Монголия	прекращена 07.09.2011	104	75208	40
2012 год				
Чили	прекращена 07.07.2012	3	9	0

Как видно из представленных в таблице данных, в период с 2005 г. по настоящее время грипп лошадей официально зарегистрирован в семи странах: Индии, Японии, Китае, Монголии, Египте, Австралии, Тунисе и Чили.

В мае 2005 года в Тунисе произошла вспышка гриппа лошадей в провинции Мануоба. Заболевание было вызвано штаммом *H3N8*, во время вспышки заболело 4 животных из 13 породистых скакунов на частной ферме. По свидетельству хозяина лошади были не вакцинированы. Уровень заболеваемости составил 31 %. В целях ликвидации вспышки и недопущения распространения заболевания по всей стране были приняты следующие карантинные меры: запрет передвижения животных, вакцинация, дезинфекция помещений, где содержались заболевшие животные, лечение заболевших животных при помощи антибиотиков, антипиретиков и витаминных добавок. Вспышка была ликвидирована в июле 2005 года [89-92].

В течение 2006 года по данным МЭБ подтвержденных вспышек гриппа лошадей в мире зарегистрировано не было [93-96].

В августе 2007 г. в парке г. Сидней произошла вспышка гриппа лошадей. Заболевание лошадей гриппом до этого момента никогда не регистрировали. Из 190 лошадей заболело 11 животных. В последующем заболевание распространилось практически по всей Австралии. Вспышка заболевания была ликвидирована 25 декабря 2007 года [97].

В августе 2007 года впервые за 36 лет грипп лошадей вспыхнул в Японии. До этого грипп лошадей в Японии регистрировался в 1971 году.

Процент заболеваемости составил 16%. Павших животных от гриппа лошадей зарегистрировано не было, однако заболевание, охватившее почти всю территорию страны не могли ликвидировать достаточно долгое время. Последняя вспышка была зарегистрирована 1 июля 2008 года в Хоккайдо. Благодаря предпринятым мерам ликвидации с этого дня заболевание больше не обнаруживалось в стране. В последующие 12 месяцев в Японии проводились мониторинговые исследования в соответствие с главой 1,4 Кодекса МЭБ по охране здоровья наземных животных. В июле 2009 года власти Японии объявили, что в соответствие с главой 12.7.3 Кодекса МЭБ по охране здоровья наземных животных страна вновь обрела статус страны, на территории которой полностью ликвидирован грипп лошадей [98].

Эпизоотия гриппа лошадей, начавшаяся в Монголии в октябре 2007 г. в западных аймаках, продолжалась и 2008 г. В Монголии от гриппа лошадей сильно пострадали аймаки Кобдоский (Khovd) и Баян-Улэгэйский (Bayan-Ulgii). В отчете Монголии для МЭБ от 14 ноября отмечено, что из 101587 восприимчивых лошадей в семи хозяйствах был идентифицирован 11631 случай заболевания, в результате чего уровень смертности составил 11,5 % [99].

7 января 2008 года Агентство по чрезвычайным ситуациям Монголии официально сообщило, что с октября 2007 года, когда грипп лошадей появился в западных аймаках страны Кобдоском и Баян-Улэгэйском. Далее заболевание постепенно распространилось по территории страны, поразив в общей сложности свыше 60 тысяч лошадей в 11 монгольских провинциях.

В 2008 году заболевание было зарегистрировано на территории 75 сомонов, 13 аймаков. Лабораторными исследованиями было установлено, что грипп у лошадей был вызван подтипом вируса H3N8. Об этом сообщило ГУ МЧС России по Бурятии со ссылкой на комиссара - заместителя руководителя Государственного управления по чрезвычайным ситуациям Монголии. В связи с тем, что очаги заболевания находились вблизи государственной границы России, отмечали в ГУ МЧС России, не исключается возможность заноса инфекции на территорию Бурятии [100].

В июне 2008 г. грипп лошадей проник на территорию Индии. За время эпизоотии 2008-2009 гг. было зарегистрировано 40 очагов заболевания, в результате которых заболело 19273 животных и пало 16 лошадей [101]. Заболевание, охватившее 10 районов на западе и северо-западе страны, было вызвано штаммом H3N8 принадлежащим ко 2 клайду. В качестве мер контроля и ликвидации заболевания были приняты следующие мероприятия: запрет передвижения животных по стране, скрининговые исследования, дезинфекция, симптоматическое лечение заболевших животных. Вакцинация применена не была. Данную вспышку удалось ликвидировать только в июле 2010 года [102].

5 ноября 2007 года власти Китая официально сообщили о вспышке гриппа лошадей, которая стала первой после 1994 года. Вспышка началась 9 октября 2007 г. в п. Алтай округе Хинжанг и продолжилась до июля 2008 года. С помощью лабораторных исследований был идентифицирован вирус гриппа лошадей подтипа А H3N8, который вызвал 5515 случаев заболевания гриппом лошадей при уровне смертности 4,24 % [103].

В июле 2008 года в пяти областях Египта было зарегистрировано 7 вспышек гриппа лошадей. Заболевание было вызвано штаммом *H3N8*. До вспышки в 2008 году грипп лошадей уже регистрировался ранее в Египте в 1989 году. Всего за период с июля по сентябрь 2008 года из 3538 голов лошадей заболело 617 голов, что составило уровень заболеваемости 24%. Власти Египта официально объявили о ликвидации вспышки 29 сентября 2008 года, причем вакцинация не применялась [104].

Впервые с 1965 г. заболевание гриппом лошадей было зарегистрировано на территории Российской Федерации в 2007 году, три вспышки в Республике Хакассия, а также Алтайском и Пермском краях, где заболело 352 головы лошадей [105].

По данным информационного аналитического центра Россельхознадзора в 2009 г. в России заболевание выявлено в Республике Тыва, где заболело три лошади. В 2010 году в России случаи заболевания гриппом лошадей не отмечены, риск распространения заболевания был снижен на «незначительный» [106].

В 2009 г. и 2010 г. эпизоотическая обстановка по гриппу лошадей оставалась напряженной. По данным МЭБ в 2009 г. в Японии зарегистрировано 120 очагов заболевания, в которых заболело 2512 лошадей.

В 2010 г. эпизоотия гриппа лошадей продолжалась в Индии. В 40 зарегистрированных МЭБ вспышках заболело 19523 животных и пало 21.

По данным МЭБ в 2010 г. заболевание лошадей гриппом отмечали во Франции, Ирландии и Великобритании, а также на карантинной станции в Японии у животных импортированных из Бельгии [107, 108].

В 2011 г. по данным МЭБ эпизоотия гриппа лошадей зарегистрирована в Монголии, где заболело 75208 голов лошадей и пало 40.

В 2012 г. эпизоотическая обстановка по гриппу лошадей по данным МЭБ продолжается в Чили [109].

В последующем грипп лошадей *A/H3N8* регистрировали во многих странах мира таких как Англия, США, Китай, Япония, Индия, Монголия, Россия и др. Анализ различных изолятов показал, что их можно разделить на 2 большие группы: “штаммы европейского типа” и “штаммы американского типа”. В результате интенсивного перемещения лошадей между континентами оба типа штаммов распространились повсеместно. Результаты исследований показали, что большая часть изолятов вируса гриппа лошадей, циркулирующих в настоящее время в Европе, относится к “американскому типу” [110, 111].

В Монголии правительственные записи показывают 4 крупных вспышки ВГЛ с некоторыми из самых высоких из известных смертностей в 1974–1975, 1983–1984, 1993–1994 и 2007–2008 (21). Показатели смертности составляли 20–30% по всем, кроме вспышки 2007–2008 гг., во время которой в стране были внедрены вакцинации, а уровень смертности снизился до ≈5% (21). В то время как некоторые из этих показателей смертности частично связаны с экстремальными погодными условиями и различиями в отчетности, диагностике и питании среди лошадей, снижение уровня смертности, наблюдаемое при вакцинации, представляется реальным. Вспышка ВГЛ в 2012 году в Монголии была связана со вспышкой в Казахстане в этом году и вспышкой в Китае в 2013 году (1,2). Дополнительные вспышки ВГЛ произошли в Малайзии в 2015 году, в США и Ирландии в 2016 году и в Чили в 2018 году (8,17).

С начала 2018 года По данным МЭБ, вспышки гриппа лошадей были зарегистрированы в Африке, Азии, Европе, Северной и Южной Америке [112].

Вирусы гриппа А (H3N8) были выделены и охарактеризованы в результате вспышек в Аргентине, Чили, Китае, Франции, Германии, Ирландии, Нидерландах, Нигерии, Швеции, Великобритании, Уругвае и США [113, 114].

В январе 2018 года в Чили был диагностирован грипп лошадей. В Аргентине вспышки ВГЛ были подтверждены весной и летом 2018 года. Первые случаи были зафиксированы в конюшне на андском переходе, где были лошади из Чили и Аргентины. Впоследствии инфекция была подтверждена в ипподромах и поло-клубах. Клинические признаки были отмечены как более выраженные, чем во время предыдущей обширной вспышки в 2012 году. Пострадали многие привитые и пожилые лошади. Широко распространенные вспышки гриппа среди лошадей были также зарегистрированы в Колумбии, Уругвае и Эквадоре [115, 116].

Обширная вспышка конского гриппа была подтверждена в Нигерии в конце 2018 года и продолжается. На сегодняшний день вспышка происходит главным образом у ослов, используемых для транспортных, сельскохозяйственных и

бытовых целей, и было зарегистрировано до 25% смертельных исходов. Наблюдался большой падеж среди лошадей. Вакцинация против гриппа лошадей в Нигерии практически не проводится [117].

По всей Европе отмечается повсеместный рост гриппа лошадей с конца 2018 года, когда были зарегистрированы вспышки во Франции. С того времени были зарегистрированы многочисленные вспышки в Германии, Ирландии, Италии, Нидерландах, Великобритании и Швеции. Болезнь также была подтверждена в Бельгии и Дании. Вспышка продолжается, и затронуты все отрасли промышленности, включая лошадей для отдыха, выставочных соревнований, скаковых лошадей, рысаков и племенных животных. Большинство лабораторно подтвержденных положительных случаев не вакцинированы. Тем не менее, грипп также был подтвержден у лошадей, имунизированных вакцинами, обновлёнными в соответствии с текущими рекомендациями МЭБ. Как правило, не вакцинированные лошади страдают сильнее, чем привитые лошади [118].

В США вспышки были обнаружены в течение года и во многих штатах. Данные по вакцинации были доступны для одной вспышки, и были затронуты лошади, вакцинированные в течение предыдущих шести месяцев обновлённой вакциной [119, 120].

Вирусы, выделенные и идентифицированные в результате вспышек в Аргентине, Франции, Германии, Ирландии, Нидерландах, Великобритании, США и Швеции, были генетически охарактеризованы секвенированием гена гемагглютинина (HA). Гены нейраминидазы (NA) были секвенированы для вирусов из Аргентины, Франции, Ирландии, Великобритании и США. Последовательности HA и NA были согласованы с последовательностями рекомендованного вакцинного вируса *A/equine/SouthAfrica/2003*. Последовательности полных геномов вирусов, выделенных в Чили (2018 г.), Великобритании (2018 г.) и в Ирландии (2019 г.), были определены и доступны на GISAID. Вирусы из Великобритании, Ирландии и США были антигенно охарактеризованы с помощью анализа ингибирования гемагглютинации (HI) с использованием постинфекционной антисыворотки хорька и куриных эритроцитов [121].

Все обнаруженные вирусы были охарактеризованы как клайд 1 Флорида, Американской линии. Эти вирусы были очень похожи на большинство вирусов клады 1, идентифицированных в США 2017 году. В 2017 году вирусы, выделенные во Флориде и Нью-Йорке, имели замену Q189K, ранее наблюдавшуюся в *A/equine/Pennsylvania/1/2007*. Однако ни один из вирусов, идентифицированных в течение этого периода наблюдения (2018/19), не имел такой замены. Данные HA, доступные для вирусов, выделенных в 2018/19 гг., и их антигенный картографический анализ показывают, что вирусы по-прежнему остаются антигенно тесно связанными с рекомендованными вакцинами вирусов клайда 1 [122].

В 2018/1919 гг. активность гриппа лошадей возросла. Все вирусы, выделенные и охарактеризованные в результате этих вспышек, были из группы

клайд 1 Флорида, американской линии и были аналогичны тем, которые были выявлены в США в 2017 году. Вирусы первой группы являются эндемичными в США, но это первая крупная европейская вспышка, связанная с вирусом группы 1 с 2009/10 г. Хотя вирусы 1 клайда постепенно генетически отличались от рекомендованных МЭБ вакцинных штаммов, антигенные данные с моноспецифическими сыворотками хорька не дали никаких признаков того, что обновление вакцин принесёт значительную пользу. Тем не менее, группа учитывает озабоченность коневодства в отношении увеличения числа вспышек и выявления положительных лошадей, которые были вакцинированы вакцинами, содержащими вирусы клайдов, рекомендованные МЭБ [123].

На территории РК, как и в других сопредельных странах были подтверждены две значимые эпизоотии ВГЛ в 2007 и 2012 гг. Для идентификации и изучения возбудителя были параллельно задействованы сотрудники НИИПББ и Института микробиологии и вирусологии. Наличие ВГЛ в 2007 и 2012 гг. было подтверждено практически во всех доставленных пробах, что показывает распространенность инфекции во всех регионах страны [124, 125].

После вспышки ВГЛ в 2012 году до настоящего времени подтвержденных фактов распространения данной инфекции не установлено. Однако, опасность возникновения этого заболевания все еще существует.

Таким образом, представленный обзор информационных сведений по эпизоотическому состоянию гриппа лошадей в мире, позволяет сделать заключение, что вирус гриппа лошадей постоянно меняется, что требует не только проведения исследований по мониторингу заболевания на территории Республики Казахстан, но и изоляции эпизоотически значимых представителей заболевания и изучение их биологических и молекулярно-генетических свойств.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты, материалы и оборудование

Объекты исследований

В процессе проведения экспериментальных исследований были использованы штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* ВГЛ, выделенные от больных лошадей на территории Республики Казахстан в 2012.

Оборудование:

- CO2 – инкубатор модель *CB150 (Германия)*;
- термоциклер *GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems*;
- гель документирующая система "*BioRad*", *США*;
- секвенатор *3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems/Hitachi, Japan*.
- электронный микроскоп *JEM 100 CX, JEOL;*
- синтезатор олигонуклеотидов: *H-16 Synthesizer;*
- высокоскоростная центрифуга *Becman;*
- шкаф биологической безопасности *ШББ-2;*
- центрифуга с охлаждающей системой *Eppendorf.*

Материалы

При изучении культуральных свойств вируса гриппа лошадей использовали следующие системы:

- 9-11 - суточные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) с АО «Аллель Агро» Алматинская птицефабрика (Алматинская область п. Первомайский);
- перевиваемая линия клеток Vero (почка африканской зеленной мартышки);
- перевиваемая линия клеток *MDCK* (почка собаки);
- перевиваемая линия клеток *ВНК-21* (почка новорожденного сирийского хомячка);
- перевиваемая линия клеток, *СПЭВ* (свиная почка эмбриональная версинированная);
- перевиваемая линия клеток *MDBK* (почка нормального молодого бычка);

При определении гемагглютинирующего титра получаемой вирусной суспензии использовали 0,5 %-ный раствор эритроцитов петуха.

- всего для исследования было отобрано 1563 проб сывороток крови и 857 проб носоглоточных смывов.

2.2 Сбор биологического материала от животных

Для проведения молекулярно-биологических, серологических и вирусологических исследований у животных отбирали носоглоточные смывы и получали сыворотку крови, в случаях гибели животных отбирали патологический материал. Отбор проб проводили в соответствии с руководством МЭБ по отбору проб [126, 127]. Мазки из носового и ротовой полости, а также сыворотки крови помещали в отдельные пробирки с транспортной средой для вирусов.

Биологический материал помещали в криопробирки с навинчивающейся полипропиленовой крышкой и снабжали этикетками, устойчивыми к жидкому азоту. На всех образцах указывали номер протокола вскрытия и аббревиатуру, обозначающую участок взятого материала. Транспортировку образцов носоглоточных смывов проводили в жидком азоте. Транспортировку сывороток проводили в термочемодане.

Поступивший в лабораторию биоматериал для вирусологических исследований подвергался предварительной обработке согласно стандартным операционным процедурам. Стандартные операционные процедуры предусматривают порядок подготовки различных типов материалов в лаборатории для анализа, дают конкретные указания по обработке проб и мерах безопасности [128].

2.3 Оптимизация параметров культивирования вируса гриппа лошадей на культуре клеток и РКЭ

2.3.1 Культивирование вируса в культуре клеток

В качестве системы культивирования использовали перевиваемые линии клеток *Vero, MDCK, ВНК-21, СПЭВ и MDBK* [129].

Эксперименты с культурами клеток проводили при инфицировании в поддерживающую среду в различных дозах. Инкубирование зараженных культур клеток проводили в термостате при температуре (34,0±0,5) °С, в течение 72 часов с последующим замораживанием при минус 70°С на 12-14 часов после подтверждения наличия вируса в реакции гемагглютинации вируссодержащую суспензию отбирали для проведения дальнейших экспериментов.

Культивирование ВГЛ проводили в течение 72 час. в термостате при температуре (34,0±0,5) °С, с ежедневным наблюдением под световым микроскопом.

Активность ВГЛ определяли методом титрования в культуре клеток [130]. Для этого из полученной смеси готовили 10-кратные разведения от 10^{-1} до 10^{-8} на поддерживающей среде. Разведения готовили в следующем порядке: в 8 пробирок наливали по 4,5 $см^3$ поддерживающей среды, в первую пробирку вносили 0,5 $см^3$ смеси вируса. Новой пипеткой смешивали содержимое первой пробирки и 0,5 $см^3$ переносили во вторую пробирку. Следующие разведения готовили таким же образом. Перед началом инфицирования монослой клеток по 3 раза промывали питательной средой с добавлением трипсина в конечной концентрации 0,02%. Далее каждым разведением вируса, начиная с наибольшего, заражали по 4 пробирочные культуры клеток, внося по 1,0 $см^3$ приготовленных разведений с добавлением в поддерживающую среду трипсина в конечной концентрации 0,005%. Зараженные и контрольные пробирки с культурой клеток инкубировали в стационарном положении при (34,0±0,5) °С. Контролем служили пробирки с культурой клеток той же партии, в которые вносили по 1,0 $см^3$ поддерживающей среды с трипсином без вируса.

Результаты титрования учитывали по наличию цитопатических изменений в монослое зараженных пробирок при отсутствии таковых в контрольных. Гемагглютинирующий титр ВГЛ в полученных культуральных суспензиях определяли в РГА, а инфекционную активность титрованием и выражали в lg ТЦД50/$см^3$, который рассчитывали по методу Рида и Менча [131].

2.3.2 Культивирование вируса в РКЭ

В качестве системы культивирования использовали 8-13 суточные куриные эмбрионы [132].

Эксперименты с куриными эмбрионами проводили при инфицировании в аллантоисную полость в различных дозах. Инкубирование инфицированных куриных эмбрионов проводили в инкубаторе при температуре (33,0±0,5) °С и относительной влажности 60±5 %, в течение 72 часов последующим охлаждением при (4±2) °С. Для проведения дальнейших экспериментов отбирали аллантоисную жидкость эмбрионов, после подтверждения наличия вируса в реакции гемагглютинации.

При адаптации и выделении вируса гриппа лошадей, инкубирование зараженных РКЭ проводили в течение 3-4 суток в условиях термостата при температуре (36 – 37) ºС и относительной влажности воздуха (55–60) % с овоскопированием эмбрионов через каждые 5-6 ч.

2.3.3 Постановка реакции гемагглютинации

Для постановки реакции гемагглютинации (РГА) готовили двукратные разведения вируссодержащего материала на 0,85% растворе хлористого натрия [133]. С этой целью в лунки 96-ти луночного планшета наливали физиологический раствор по 25 мкл и добавляли в первую лунку 25 мкл вируссодержащего материала. Затем пипеткой-дозатором переносили 25 мкл из первой лунки во вторую, из второй в третью и т. д. Из последней лунки 25 мкл смеси удаляли. Во все лунки с разведениями вируса добавляли по 25 мкл 1 %-ной взвеси эритроцитов петуха.

Результат реакции учитывали по истечении 20-30 минут при комнатной температуре. Титром гемагглютинирующей активности вируса считали наибольшее разведение, при котором наблюдалась полная агглютинация эритроцитов.

2.3.4 Постановка реакции торможения гемагглютинации

Постановку реакции торможения гемагглютинации (РТГА) проводили по общепринятой в вирусологии методике [134]. Предварительно до постановки РТГА титрацию вируса в РГА, чтобы определить 1 агглютинирующую единицу (АЕ). Для постановки РТГА вирус берут в титре 4 АЕ, то есть разведение в 4 раза меньше, чем был титр в РГА.

Все сыворотки перед постановкой РТГА прогревали для удаления термолабильных ингибиторов в течение 30 минут при температуре от 56°С до 62°С в зависимости от вида животных. Двукратные разведения сывороток, начиная с 1:10, готовили в пробирках Флоринского на физиологическом растворе и из них переносили в соответствующие лунки плашек по 25 мкл. Затем во все лунки плашки, содержащие разведения сывороток, вносили по 25 мкл рабочего разведения вируса и ставили на контакт в течение 25-30 минут в термостат при температуре 36ºС. По истечении времени контакта во все лунки вносили по 50 мкл 1 %-ной взвеси эритроцитов петуха. Реакцию выдерживали при комнатной температуре в течение 20-25 минут и затем вели учет. В качестве контроля использовали нормальную и специфическую сыворотку.

2.4 Очистка и концентрирование ВГЛ

Для получения очищенной и концентрированной суспензии ВГЛ использовали методы ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе и ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы.

2.4.1 Очистка и концентрирование ВГЛ с методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы

На начальном этапе осветляли аллантоисную жидкость инфицированных куриных эмбрионов низкоскоростным центрифугированием при 2100 g в течение 20 минут при температуре 4°С [135]. Осветленный вируссодержащий материал наслаивали на двухступенчатый градиент плотностей сахарозы (35-60) % и центрифугировали при 106200 g, при температуре 4°С в течение 2 часов. Опалисценция вируса наблюдалась над 60% слоем сахарозы. Отмывку вирусной

суспензии от сахарозы проводили центрифугированием при ускорении 106200 g в течение 30 минут при температуре 4°С. Полученный осадок ресуспендировали в 0,05 М ФБР, pH 7,2 [136].

2.4.2 Очистка и концентрирование ВГЛ методом ионообменной хроматографии

Приготовление волокнистой ДЕАЕ-целлюлозы проводили согласно протоколу производителя. Колонку упаковывали и уравновешивали стартовым буфером. Вируссодержащую аллантоисную жидкость осветляли центрифугированием при 2100 g, при температуре 4°С в течение 20 минут. Осветленный вируссодержащий материал смешивали 1:1 со стартовым буфером и наслаивали на колонку с ионообменником [137]. Элюцию вируса с ионообменника осуществляли буфером с добавлением хлорида натрия. Очищенную вирусную суспензию при необходимости концентрировали ультрацентрифугированием при 106200 g в течение 30 мин. при температуре 4°С.

2.4.3 Определение антигенной активности очищенных препаратов вируса гриппа

Антигенную активность выделенных препаратов гемагглютинина и нейраминидазы проверяли методом вестерн блота [138].

2.5 Морфометрия и определение основных физико-химических свойств ВГЛ

2.5.1 Определение морфометрических характеристик ВГЛ

Морфологию вирионов исследовали на электронном микроскопе *JEM-100 CX JEOL* (Япония) при увеличении 20000-40000 и ускоряющем напряжении 80 кВ [139]. Препараты ВГЛ готовили адсорбцией в электростатическом поле тефлоновой пластины на медные сетки с формваровой подложкой, укрепленной углем. Негативное контрастирование проводили 2%-ным водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Для изучения морфометрических и морфологических характеристик вируса гриппа использовали очищенные и концентрированные препараты ВГЛ, которые снимали при увеличении 100000 и 200000. Обсчёт размеров вирионов проводили с ипользованием специальной шкалы, делением равным 0,1 мм. По полученным значениям рассчитывали среднюю арифметическую величину и среднее квадратичное отклонение [140]. По полученным данным строили гистограммы распределения вирионов по размерам в популяции штаммов.

2.5.2 Определение плавучей плотности РНК и константы седиментации вируса гриппа лошадей

Плавучую плотность нуклеиновой кислоты ВГЛ определяли путем центрифугирования очищенной вирусной суспензии в преформированном градиенте соли - хлористого цезия (CsCl) и сернокислого цезия (Cs2SO4), в горизонтальном роторе SW-55 ультрацентрифуги Optima L-90K («Becman»).

Преформированный градиент получали путем наслоения раствора соли концентрацией 30 % в центрифужных пробирках указанного ротора. Далее на приготовленный градиент наслаивали вирус.

Центрифугирование проводили при скорости 106000 g в течение 16-18 час. После завершения центрифугирования содержимое пробирок фракционировали путем отбора фракций сверху. Затем определяли коэффициент преломления (n). Плавучую плотность вычисляли по эмпирической формуле ρ25=10,860*n25 – 13,497 (при 250) с градиентом CsCl и ρ25=12,1200*n25 – 15,1162 (при 250) с градиентом Cs2SO4.

Концентрацию РНК во фракциях определяли с помощью спектрофотометра *NanoDrop (Thermo Scientific*).

Из градуировочных графиков зависимости показателя преломления от плотности раствора соли определяют значение плавучей плотности в пиках проявления концентрации РНК [141].

Скорость седиментации вирусных частиц, приведенная к единице центробежного ускорения, является специфической характеристикой макромолекул (коэффициент седиментации, S).

Исходя из соотношения пропорциональности констант седиментации и расстоянии пика маркерного вируса (вирус гриппа птиц штамм*А/крачка/ЮА/61(H5N3))* и вируса гриппа лошадей определяли константу седиментации по методу *Мартина-Эймса* (1):

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{S_{25w1}}{S_{25w2}} \quad (1)$$

где R_1 – пройденное частицей расстояние, с ранее известным коэффициентом седиментации;

R_2 – пройденное расстояние, исследуемой частицей;

$S_{25}\, w_1$ – коэффициент седиментации известного агента (при температуре 25℃);

$S_{25}\, w_2$ – коэффициент седиментации исследуемого вируса (при температуре 25℃) [142].

Подбор маркерных вирусов проводят с таким расчетом, чтобы коэффициент седиментации исследуемого вируса находился между коэффициентами седиментации маркера, а концентрация нуклеиновой кислоты в исследуемом вирусе и в маркере было наиболее одинаковым. Последняя предосторожность позволяет избежать искажения коэффициента седиментации. Достаточные для обнаружения зон количества исследуемого вируса и маркера центрифугируют в параллельных градиентах. Коэффициент седиментации исследуемого вируса определяли путем сравнения расстояния, пройденного им в градиенте, с расстоянием, пройденным маркером. В этом случае зоны локализуют визуально, освещая пробирки сверху и измеряя расстояние от мениска.

2.6 Воздействие физических факторов на очищенный вирус гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012*, (H3N8)

Для определения воздействия на вирус УФ-лучей суспензию очищенного вируса переносили в чашки Петри в объеме 1 мл. Облучение проводили в *UV-Sterilizer* фирмы *Millipore*, длина волны составляла 254 нм, после чего в образцах определяли нейраминидазную и гемагглютинирующую активность вируса [143].

Воздействие на вирус различных температур определяли при инкубировании в термоблоках с различной температурой в диапазоне 33-37°С. Затем определяли нейраминидазную и гемагглютинирующую активность вируса [144].

При определении воздействия pH-среды на очищенный вирус осадок ресуспендировали в 0,05 М ФБР с различными значениями pH и определяли его нейраминидазную и гемагглютинирующую активность [145].

2.7 Электрофоретический анализ белков

Электрофоретический анализ белковых фракций проводили по методу разделения смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью [146].

Метод определения наличия нейраминидазной активности основан на: выделении свободной N-ацетилнейраминовой кислоты из фетуинового субстрата под действием нейраминидазы вируса. Розовое окрашивание указывает на присутствие активности нейраминидазы в исследуемом антигене. При ингибировании нейраминидазной активности гомологичной антисывороткой. Отсутствие или значимое уменьшение цветности в пробах с гомологичной сывороткой, в отличие от гетерологичных или нормальной, указывает, что нейраминидазная активность была ингибирована, на основании чего и проводится идентификация подлинности нейраминидазы. [147].

2.8 Диагностика и идентификация вируса гриппа лошадей

2.8.1 Идентификация вируса гриппа типа А методомОТ-ПЦР-РВ [148]

Для обнаружения ВГЛ типа А методом ОТ-ПЦР-РВ, использовали специфичные М-гену вируса гриппа праймеры:

Inf-A-F 5’-GAC CRA CGT TGT CAC CTC TGA C-3’;

Inf-A-R 5’-AGG GCA TTY TGC ACA AAK CGT CTA-3’;

Inf-A-P 5’-TGC AGT CCT CGC GCA CTG GGC ACG-3’.

Для постановки реакции применяли набор для проведения одношаговой ОТ-ПЦР «*OneStep RT-PCR Kit*», фирмы «*Qiagen*».

Состав реакционной смеси: вода – 8,5 мкл; InfA-F, InfA-R, InfA-P по 0,5 мкл; ×5 buffer - 4 мкл; dNTP – 1 мкл, Mix – 1 мкл и РНК – 4 мкл. Объем – 20 мкл.

Программа амплификации: 50^0С – 30 мин; 95^0С – 10 мин (обратная транскрипция); 45 циклов амплификации: 95^0С – 15 сек, 55^0С – 30 сек (530 нм).

Амплификацию и анализ полученных результатов проводили с помощью автоматической системы «*LightCycler 2.0», Roche*.

2.8.2 Проведение ОТ-ПЦР для идентификации подтипа A/H3 вируса гриппа лошадей

Идентификацию проб положительных на грипп А проводили в ОТ-ПЦР с использованием специфических на подтип A/H3 вируса гриппа лошадей праймеров *HA3R* и *HA3F (Sigma):*

- праймер *HA3R* – GATGCTTCCATTTGGTGTA;
- праймер *HA3F* – GAATGTGACAATGCCTAAC.

Для выявления вируса гриппа подтип A/H3 использовали набор для постановки ОТ-ПЦР фирмы «*Qiagen» (OneStep RT-PCR Kit).*

Реакционная смесь для постановки реакции состояла из следующих компонентов: 5x Buffer - 5 мкл; dNTPs - 0.8 мкл; праймер H3R - 1 мкл; праймер H3F - 1 мкл; Enzyme mix - 0.8 мкл; H2O - 12.4 мкл; РНК - 4 мкл.

Постановку ОТ-ПЦР проводили при следующем температурном режиме: пре-денатурация 50^0C - 30 мин; денатурация 95^0C – 15 мин; отжиг 95^0C – 20 сек; репликация 50^0C – 20 сек, 72^0C – 60 сек и пост-репликация 72^0C – 10 мин. Амплификацию проводили в течение 40 циклов.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

2.8.3 Проведение ОТ-ПЦР для идентификации подтипа A/N8 вируса гриппа лошадей

Идентификацию проб положительных на грипп А проводили в ОТ-ПЦР с использованием специфических на подтип A/N8 вируса гриппа лошадей праймеров *N8Eq-F30 b* и *N8Eq-R535* (*Sigma*):

- праймер *N8-Eq-F30 b* 5’-GAC AAT AGG ACT GGA AC-3’;
- праймер *N8-Eq-R535* 5’-ACT GAT GTC ATA AGG AAG AAT AGC-3’.

Для выявления вируса гриппа подтип A/H3 использовали набор для постановки ОТ-ПЦР фирмы "*Qiagen" (OneStep RT-PCR Kit).*

Реакционная смесь для постановки реакции состояла из следующих компонентов: 5x Buffer - 5 мкл; dNTPs - 0.8 мкл; праймер H3R - 1 мкл; праймер H3F - 1 мкл; Enzyme mix - 0.8 мкл; H2O - 12.4 мкл; РНК - 4 мкл.

Постановку ОТ-ПЦР проводили при следующем температурном режиме: пре-денатурация 50^0C - 30 мин; денатурация 95^0C – 15 мин; отжиг 94^0C – 15 сек; репликация 62^0C – 15 сек, 72^0C – 90 сек; пост-репликация 72^0C - 7 мин. Амплификацию проводили в течение 40 циклов.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

2.8.4 Использование микрочипа для диагностики гриппа лошадей

Для каждого зонда подбирались специфические праймеры с помощью программы Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) в международной базе данных NCBI. Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей и поиска консервативных участков генов была использована программа *Mega 6.06* по алгоритму *ClustalW*. Последовательности олигонуклеотидных зондов подбирались с помощью

программы Picky 2.20. Подобранные зонды были проанализированы с помощью программы BLAST, для выявления возможной гомологии с известными последовательностями, имеющимися в базе данных NCBI.

Олигонуклеотидные зонды и праймеры были синтезированы на оборудовании *DNA/RNA Synthesizer H-16* фирмы *K&A Laborgeraete*, (Германия), согласно инструкции производителя.

Флуоресцентное мечение кДНК вирусов гриппа А осуществляли во время проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) на матрице РНК вирусов, и амплификации кДНК (ПЦР) с использованием специфичных праймеров, подобранных к зондам в присутствии флуоресцентно меченых нуклеотидов. Качество наработанных флуоресцентно меченых кДНК проверяли методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле и гибридизацией наработанных ПЦР продуктов на экспериментальных сериях микрочипов, с визуализацией полученных данных на компьютере после флуоресцентного сканирования [149].

ОТ-ПЦР проводили с помощью наборов *Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen)* и *Access RT-PCR System (Promega)* в соответствии с инструкцией производителя (в 50 мкл реакционной смеси: *Super Script III RT/Platinum Taq Mix* – 1 мкл; 2X Reaction Mix – до 1х; праймеры 2ОЕ/мл – по 1 мкл; 1mM Cy5-dCTP – 1 мкл; РНК – по 5 мкл; *DEPC-treated water* до 50 мкл). Для наработки ампликонов РНК вируса гриппа использовали химически синтезированные праймеры, последовательности которых приведены в разделе «Результаты исследований».

Гибридизация на микрочипе кДНК с олигонуклеотидными зондами основана на комплементарности взаимодействия цепей нуклеиновых кислот. Наработанные флуоресцентно меченые ПЦР продукты разводили с буфером для гибридизации, который состоит из щёлочи - формамида, SCC и SDS буферов. Путем нагревания и обработки щелочью двухцепочечную кДНК разделяли на отдельные цепи (денатурированная кДНК). Денатурированную кДНК инкубировали на микрочипе в термошейкере при 37 °С и 350 об/мин в течение 2-3 ч [150, 151].

Анализ результатов микрочипа проводили на флуоресцентном сканере InnoScan710AL с разрешением 5 мкм, при длинах волн 532 нм и 633 нм. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Mapix ver. 5.5.0. С использованием данной программы произведена детекция зондов по интенсивности флуоресцентного свечения с количественными выходными данными. За положительный результат принимали сигнал, превышающий фоновое значение [152].

2.9 Определение нуклеотидной последовательности штаммов вируса гриппа лошадей и проведение филогенетического анализа

Специфические праймеры для наработки полного генома ВГЛ подбирались с помощью программы Primer-*BLAST* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) в международной базе данных NCBI.

Синтез олигонуклеотидных зондов и праймеров проводили на оборудовании *DNA/RNA Synthesizer H-16,* фирмы *K&A Laborgeraete,* (Германия), по инструкции производителя.

Секвенирование ДНК проводили методом дидеоксисеквенирования с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов (метод Сенгера) на 16-капиллярном автоматическом секвенаторе *Genetic Analyser 3130 XL, Applied Biosystems*. В качестве полимера для капилляров использовали *POP-7*. Наработку терминирующих продуктов ДНК проводили методом циклического секвенирования.

Очистку ДНК от несвязавшихся красителей осуществляли гельфильтрацией на колонках *Centri-Sep* или с помощью *CleanSeq Reagent* согласно прилагаемым к наборам инструкциям.

Непосредственно процесс секвенирования ДНК на секвенаторе проводят согласно инструкции, прилагаемой к прибору.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ поверхностных белков гемагглютинина и нейраминидазы проводили при помощи базы данных BLAST и программы «Mega 7.0» согласно алгоритму «Clustal W». Полученные нуклеотидные последовательности выравнивались по методу «множественного прогрессивного выравнивания». Построение филогенетического древа проводили по методу ближайших соседей (*Neighbor Joining)*, с количеством 500 репликаций.

Статистические методы

Экспериментальные данные были проанализированы с помощью статистического програмного обеспечения SPSS 13.0 (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Данные были собраны из трех независимых повторных экспериментов, содержащих три повторности, и результаты выражены как среднее ± стандартное отклонение. Различия между средними значениями были определены с помощью тестов Дункана на нескольких диапазонах. Различия с P-значением <0,05 были расценены как существенные.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Эпизоотический мониторинг

3.1.1 Анализ распространенности гриппа в РК

С целью выявления циркуляции гриппа лошадей на территории Республики Казахстан в 2010-2012 гг. проведены несколько экспедиционных выездов в различные регионы. В период проведения экспедиций проводилось эпизоотологическое обследование хозяйств на наличие животных с клиническими признаками гриппа лошадей и отбор проб сывороток крови.

В октябре 2010 г. проведено обследование хозяйств Северо-Казахстанской, Костанайской, Жамбылской и Южно-Казахстанской областей.

В апреле-мае 2011 года проведен мониторинг заболеваемости лошадей гриппом и отбор проб в Северо-Казахстанской, Костанайской, Жамбылской, Южно-Казахстанской, Восточно-Казахстанской, Западно-Казахстанской и Алматинской областей.

В сентябре-октябре 2011 г. проведено обследование коневодческих хозяйств Западно-Казахстанской, Костанайской, Северо-Казахстанской, Жамбылской и Южно-Казахстанской областей.

В апреле-мае 2012 года проведено обследование хозяйств Костанайской, Северо-Казахстанской, Южно-Казахстанской, Жамбылской, Актюбинской и Западно-Казахстанской областей, а в августе-сентябре 2012 года обследование хозяйств Костанайской, Северо-Казахстанской, Южно-Казахстанской, Жамбылской областей.

Районы, обследованные в период 2010-2012 гг. представлены на рисунке 2.

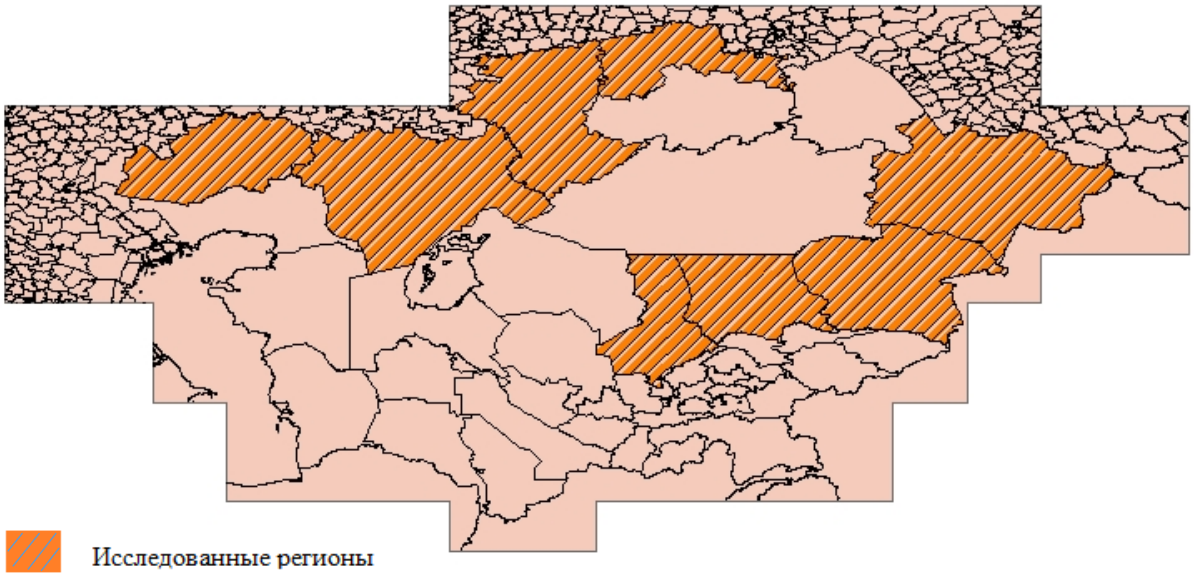


Рисунок 2 – Районы РК, обследованные в 2010-2012 годах

Характеристика биопроб и количество обследованных хозяйств и отобранных в различных регионах Республики Казахстан представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Биопробы от лошадей, отобранные во время экспедиций в различные регионы Республики Казахстан в 2010-2011 годы

Область	Район	Хозяйство	Отобрано	
			сывороток крови	носоглоточных смывов
1	2	3	4	5
Осень 2010 г.				
Костанайская	3	4	81	80
Северо-Казахстанская	2	2	37	17
Южно-Казахстанская	3	3	61	12
Жамбылская	3	7	149	119
Всего	11	16	328	228
Май 2011 г.				
Костанайская	5	7	86	33
Северо-Казахстанская	2	2	45	45
Южно-Казахстанская	3	3	62	62
Жамбылская	3	3	91	5
Восточно-Казахстанская	4	4	56	51
Алматинская	4	4	73	62
Западно-Казахстанская	3	3	50	-
Всего	24	26	463	258
Сентябрь 2011 г.				
Костанайская	5	7	25	15
Северо-Казахстанская	2	2	20	-
Южно-Казахстанская	3	3	60	73
Жамбылская	1	1	43	22
Западно-Казахстанская	5	5	215	-
Всего	16	18	363	110

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Апрель-май 2012 г.				
Костанайская	1	1	5	0
Восточно-Казахстанская	1	1	17	17
Жамбылская	1	2	40	40
Алмаатинская	1	1	13	13
Актюбинская	1	1	11	8
Западно-Казахстанская	1	2	7	7
Всего	6	8	103	95
Август-сентябрь 2012 г.				
Костанайская	3	4	65	65
Северо-Казахстанская	2	2	23	23
Южно-Казахстанская	3	3	171	31
Жамбылская	3	3	33	33
Алмаатинская	2	2	14	14
Всего	13	14	306	166
Итого	58	81	1563	857

В общей сложности за 2010-2012 гг. для лабораторных исследований в различных регионах Республики Казахстан было отобрано и доставлено в НИИПББ 1563 пробы сывороток крови и 857 проб носоглоточных смывов. Осенью 2010 г. в 11 районах РК обследовано 16 хозяйств и отобрано 328 проб сывороток и 228 проб носоглоточных смывов. Весной 2011 г. в 26 хозяйствах из 24 районов отобрано 463 пробы сывороток крови и 258 проб носоглоточных смывов, и осенью 2011 г. в 16 районах обследовано 18 хозяйств и отобрано 363 пробы сывороток крови и 110 проб носоглоточных смывов от лошадей. Весной 2012 г. было обследовано 8 хозяйств в 6 районах и отобрано 103 сыворотки крови и 95 проб смывов, а осенью в 14 хозяйствах из 13 районов отобрано 306 проб сывороток крови и 166 проб носоглоточных смывов.

В результате эпизоотологического обследования хозяйств в 2010 г. было выявлено только одно хозяйство, где были животные с признаками респираторного заболевания.

Так осенью 2010 г. во время проведения эпизоотологического обследования хозяйств Костанайской области в ТОО «ОХ Заречный» Костанайского района было выявлено заболевание жеребят 2-4 месячного возраста. Болезнь по сообщениям животноводов у жеребят наблюдается с весны 2010 года. Заболевание характеризовалось обильными слизистыми выделениями из носовой полости, учащенным дыханием, кашлем и повышением температуры

тела. Болезнь в большинстве случаев заканчивалась летальным исходом. Клинические и эпизоотологические данные характеризовали вероятный случай заболевания животных гриппом.

Для уточнения диагноза заболевания от больного жеребенка были отобраны пробы крови и носоглоточные смывы с целью проведения исследования в лабораторных условиях Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ). Носоглоточный смыв и пробу крови от жеребенка исследовали в ОТ-ПЦР-РВ на наличие вируса гриппа типа А. Как показали результаты эксперимента в обеих пробах был обнаружен вирус гриппа типа A/H3N8.

В 2011 г. за период проведения плановых экспедиций клинических признаков вируса гриппа у животных выявлено не было. Однако в феврале 2011 года по просьбе руководителей ТОО «Азимбек» Т.Рыскуловского района Жамбылской области был организован внеплановый выезд в хозяйство с целью выяснения причины заболевания и абортов лошадей. В результате обследования хозяйства было выявлено заболевание лошадей, которое характеризовалось абортами среди кобыл на последней стадии беременности или рождением мертвых жеребят. За время эпизоотии в хозяйстве абортировало 8 чистокровных кобыл.

Для лабораторных исследований было отобрано 10 проб от животных: 5 патологических материалов от абортированного жеребенка и 5 носоглоточных смывов от больных животных. Патологические материалы и носоглоточные смывы исследовали в ОТ-ПЦР-РВ на наличие вируса гриппа типа А. В результате проведенных исследований из 10 исследованных проб в 9 в ПЦР обнаружена РНК вируса гриппа типа А.

Весной 2012 г. животных с клиническими признаками гриппа лошадей выявлено не было. Однако, в августе 2012 г. во время обследования хозяйств Жамбылской области были выявлены животные с признаками респираторного заболевания (кашель, серозные истечения из носа). В п. Улгили Байзакского района у 9 животных и в ТОО «Азимбек» Т.Рыскуловского района у 6 животных проявились клинические признаки гриппа.

В сентябре 2012 г. во время обследования хозяйств Костанайской области в ТОО «Казак Тулпары» Костанайского района было выявлено заболевание лошадей, которое характеризовалось учащенным дыханием, повышением температуры тела, кашлем и обильными слизистыми выделениями из носовой полости. Заболевание в ТОО «Казак Тулпары» началось после поездки в Актюбинскую область. С 31 августа по 2 сентября 6 животных участвовали в соревнованиях, которые проводились в г. Актюбинске. Через сутки после приезда у 4 животных проявились признаки респираторного заболевания (кашель, истечения из носа). Все 6 животных были поставлены на карантин. Однако, несмотря на изоляцию животных через неделю начали заболевать и другие животные данного хозяйства. На момент обследования в хозяйстве было 260 голов лошадей разных возрастных групп. Из них выявлено 14 животных с клиническими признаками болезни. Заболеваемость составила 5,4 %.

В конце сентябре 2012 г. в частном хозяйстве п. Отар произошло массовое заболевание лошадей, которое характеризовалось повышением температуры тела, серозными истечениями из глаз и носа, кашлем. В хозяйстве из 38 животных разных возрастов с проявлением клинических признаков заболело 15 животных, что составило 39,5 %.

В начале октября заболевание животных гриппом лошадей было выявлено в частных хозяйствах п. Матыбулак Жамбылского района и п. Талгар Талгарского района Алматинской области.

Во всех случаях от больных животных были отобраны пробы сывороток крови и носоглоточных смывов.

Анализ данных показал, что в Республике Казахстан систематический мониторинг за заболеванием не проводится, животные не вакцинируются против гриппа лошадей. Изучение ветеринарной отчетности свидетельствует, что за последние 10 лет грипп лошадей на территории нашей страны официально не регистрировался. Однако, в 2007 году на территории Жамбылской области в п. Отар, от больных лошадей был выделен штамм ВГЛ *A/equine/Otar/764/07 (H3N8)*. Проведенные исследования по типированию и секвенированию сегментов данного штамма показали, что он принадлежит подтипу A/H3N8 американскому генотипу линии Florida 2.

В этом же году сотрудниками института вирусологии и микробиологии МОН РК от инфицированных лошадей был выделен вирус гриппа A/H3N8. Эти факты свидетельствуют о том, что заболевание имело место и на территории нашего государства. По данным МЭБ в 2007 году на территории Республики Казахстан была вероятность циркуляции ВГЛ, но официального заявления от надзорных служб не было.

Анализ данных эпизоотической ситуации показывает, что грипп лошадей широко распространен в приграничных с РК странах и вероятной причиной заноса инфекции является неконтролируемый ввоз животных.

Таким образом, анализ эпизоотологической ситуации по гриппу лошадей в Казахстане и в странах СНГ позволяет сделать следующие выводы:

- грипп лошадей распространен по всему миру, и официально, начиная с 2005 года, регистрируется в восьми странах: Индии, Японии, Китае, Монголии, Египте, Австралии, Тунисе и Чили. Все подтвержденные случаи были вызваны вирусом гриппа подтипа H3N8;
- Республика Казахстан имеет общие границы, тесное экономическое и торговое сотрудничество с неблагополучными по гриппу лошадей странами;
- существует реальная угроза возникновения эпидемии гриппа лошадей в Казахстане из-за отсутствия мер профилактики и нерегулярного мониторинга гриппа лошадей на территории Республики Казахстан.

На рисунке 3 представлены граничащие с Республикой Казахстан страны, а именно Россия, Монголия и Китай, откуда возможны пути заноса гриппа лошадей на территорию РК в виду своей близости.

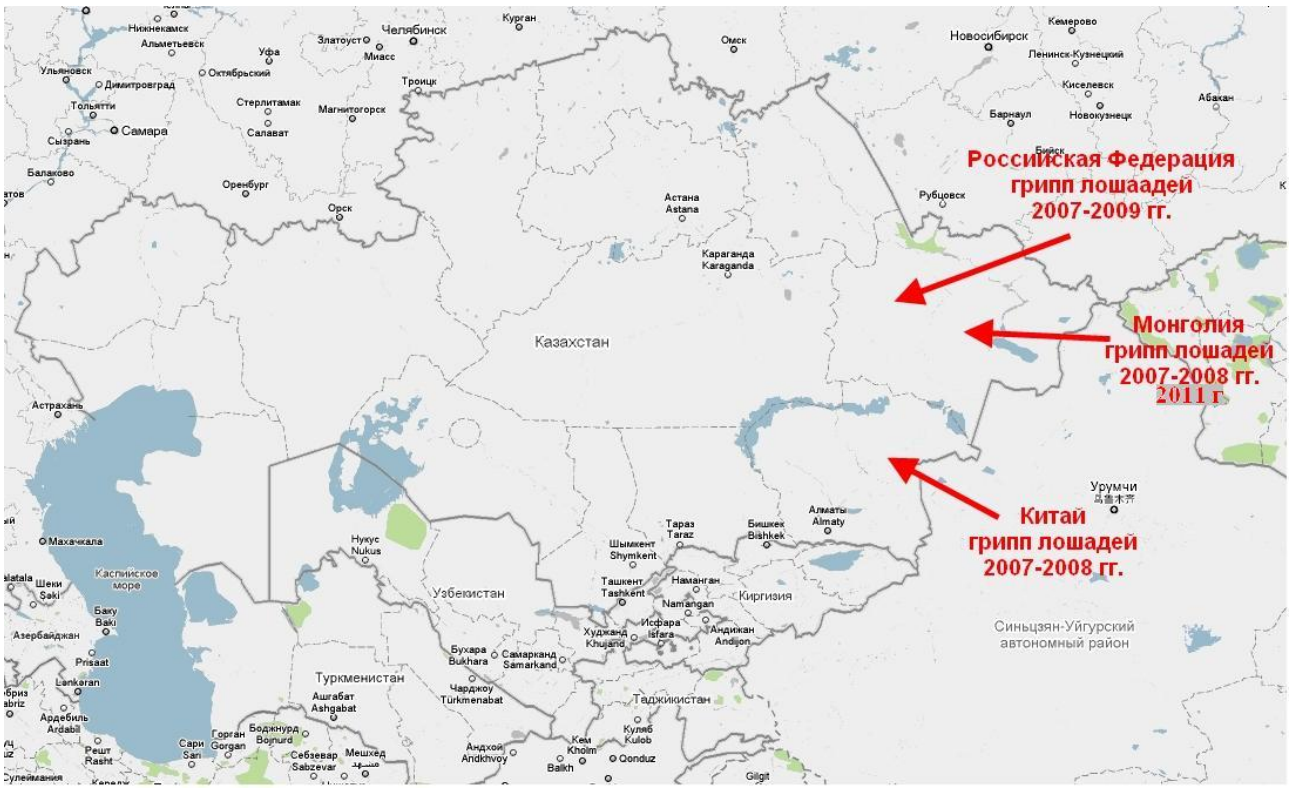


Рисунок 3 – Возможные пути заноса гриппа лошадей на территорию РК

По данным МЭБ, ВГЛ в 2007-2009, а также в 2011 года был зарегистрирован на территории приграничных с Казахстаном странах. Учитывая контагиозность и частый транзит лошадей из данных государств распространение данной инфекции в РК было неизбежно.

3.1.2 ПЦР диагностика вируса гриппа лошадей

С целью выяснения циркуляции вируса гриппа лошадей на территории Республики Казахстан нами были проведены исследования проб от лошадей, отобранных во время экспедиций 2010-12 гг. в различных регионах страны.

Для обнаружения вируса гриппа типа А в носоглоточных смывах использовали ОТ-ПЦР-РВ. Реакцию ОТ-ПЦР-РВ проводили как указанно в пункте 2.5

В 2010 г. для лабораторных исследований были доставлены пробы носоглоточных смывов из Костанайской, Северо-Казахстанской, Южно-Казахстанской и Жамбылской областей.

В ТОО «ОХ Заречный» Костанайского района были выявлены животные с признаками респираторного заболевания. При проведении ПЦР с пробами от больных животных были получены положительные на грипп А результаты (рисунок 4). Из 30 исследованных проб на грипп А положительно реагировали 4 пробы, в том числе пробы (№47, №51) отобранные в ТОО «ОХ Заречный» от животных с признаками респираторного заболевания. На основании полученных данных можно заключить, что причиной заболевания и гибели жеребят в ТОО «ОХ Заречный» является грипп лошадей.

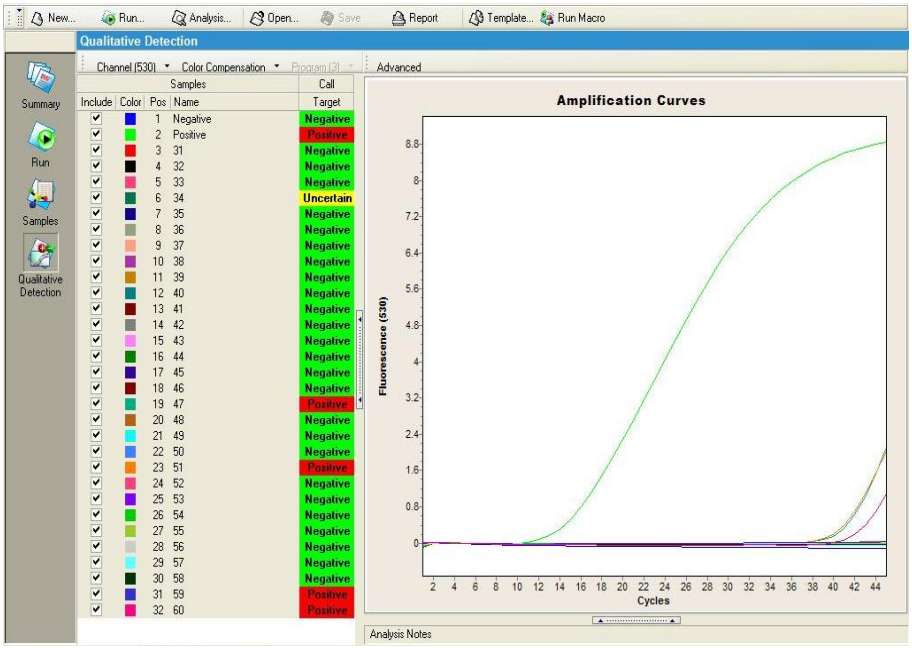


Рисунок 4 – Результаты ОТ-ПЦР-РВ для обнаружения вируса гриппа А

Обобщенные данные по результатам ПЦР исследований носоглоточных смывов, доставленных в 2010 г. из различных регионов Республики Казахстан представлены в таблице 3. Из 122 исследованных образцов вирус гриппа А удалось обнаружить в 5 образцах, что составило 4,09 % от общего числа. Положительно реагирующие пробы были доставлены из Костанайской (4 пробы) и Северо-Казахстанской (1 проба) областей.

Таблица 3 – Превалентность гриппа лошадей в различных регионах Республики Казахстан в 2010 г.

Область	Район, хозяйство	Животное	Число исследованных проб	Число положительных проб,
1	2	3	4	5
Жамбылская	Рыскуловский, ТОО «Азимбек»	лошадь	6	0
Жамбылская	Кордайский, ОПЖ НИИПББ	лошадь	4	0
		осел	3	0
		МРС	8	0
		КРС	4	0
Костанайская	Костанайский, ТОО «Казак тулпары»	лошадь	52	2
Костанайская	Костанайский, ТОО «ОХ Заречный»	лошадь	9	2

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
Костанайская	Аулекольский, «Агрофирма Диевское»	лошадь	6	0
Костанайская	Мендыкаринский, ТОО «Кменорал»	лошадь	13	0
Северо-Казахстанская	Кызылжарский, ИП Зарипов	лошадь	17	1
Итого:			122	5

В 2011 г. для лабораторных исследований были доставлены пробы носоглоточных смывов из Костанайской, Северо-Казахстанской, Южно-Казахстанской, Жамбылской, Алматинской, Восточно-Казахстанской областей, в том числе пробы патологического материала от абортированных жеребят и носоглоточные смывы от кобыл из ТОО «ЛКЗ Азимбек» Т. Рыскуловского района Жамбылской области.

Результаты исследований проб патологического материала от абортированных жеребят и носоглоточные смывы от кобыл в ОТ-ПЦР-РВ представлены на рисунке 5. Из 10 исследованных методом ПЦР проб в 9 обнаружен РНК вируса гриппа типа А.

В результате проведенных исследований установлено, что причиной заболевания животных в ТОО «Азимбек» Т.Рыскуловского района Жамбылской области является грипп лошадей.

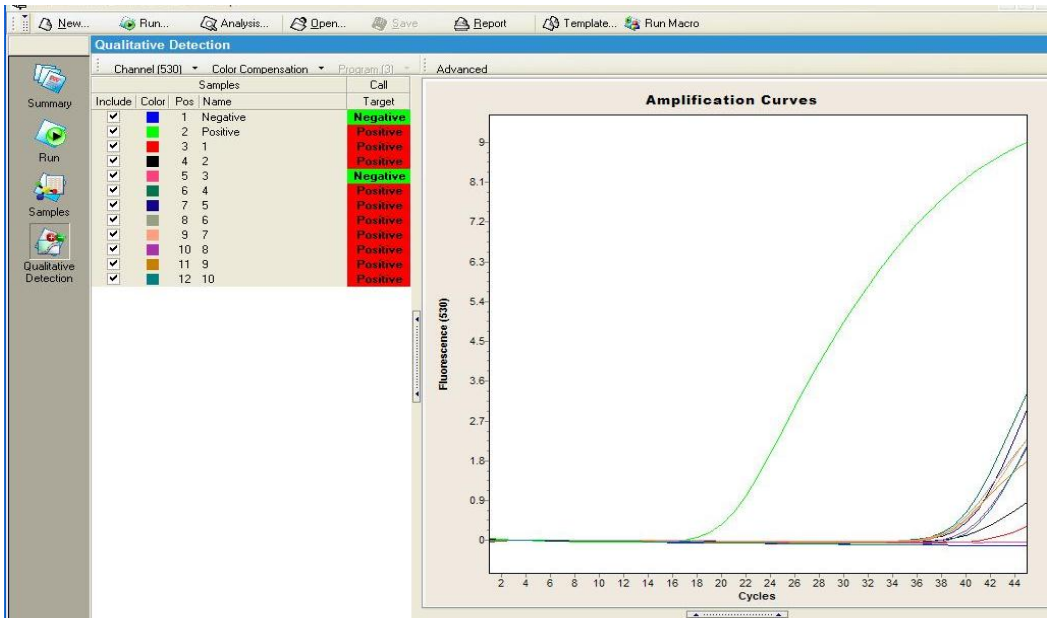


Рисунок 5 – Результаты ОТ-ПЦР-РВ при исследовании проб из ТОО «Азимбек» Т.Рыкуловского района на наличие вируса гриппа А

Данные ПЦР исследований проб от лошадей из различных регионов Республики Казахстан представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Превалентность гриппа лошадей в различных регионах Республики Казахстан в 2011 г.

Область	Район, хозяйство	Весна		Осень	
		Число исследованных проб	Число положительных проб	Число исследованных проб	Число положительных проб
1	2	3	4	5	6
Костанайская	Костанайский ТОО «ОХ Заречный»	13	3	15	0
	Мендыкаринский ТОО «Каменорал»	20	6	0	0
Итого по области		33	9	15	0
Северо-Казахстанская	Кызылжарский, ИП Зарипов	25	2	-	-
	Мамлютский Частный сектор	20	6	-	-
Итого по области		45	8	-	-
Южно-Казахстанская	Казыгуртский с. Турбат.	23	7	-	-
	Казыгуртский с.о. Жанабазар	-	-	37	6
	Ордабасинский с. Алтын тобе	23	8	-	-
	Байдибекский с. Жамбыл	16	7	-	-
	Сайрамский	-	-	36	9
Итого по области		62	22	73	15
Жамбылская	Т.Рыскуловский ТОО «Азимбек»	6	5	-	-
	Т.Рыскуловский с. Кок Донен	-	-	22	8
	Кордайский с.Отар	20	0	-	-
Итого по области		26	5	22	8
Алматинская	Ушаралский ТОО «Таусамал»	19	8	-	-
	Панфиловский с. Алтыуй	17	7	-	-
	Уйгурский с. Шарын	12	6	-	-

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6
	Раимбековский с. Узынбулак	14	5	-	-
Итого по области		62	26	-	-
Восточно-Казахстанская	Шемонаихинский с.о. Выдриха	9	2	-	-
	Бородулихинский с.о. Новая Шульба	22	8	-	-
	Зайсан с. Каратал	10	3	-	-
	Уржарский Уржар	10	4	-	-
Итого по области		51	17	-	-
Итого:		259	87	110	23

Из 369 исследованных проб РНК вируса гриппа типа А удалось обнаружить в 110 пробах, что составило 29,8 % от общего числа. На основании полученных данных можно заключить, что грипп лошадей циркулирует во всех исследованных областях РК (рисунок 6).

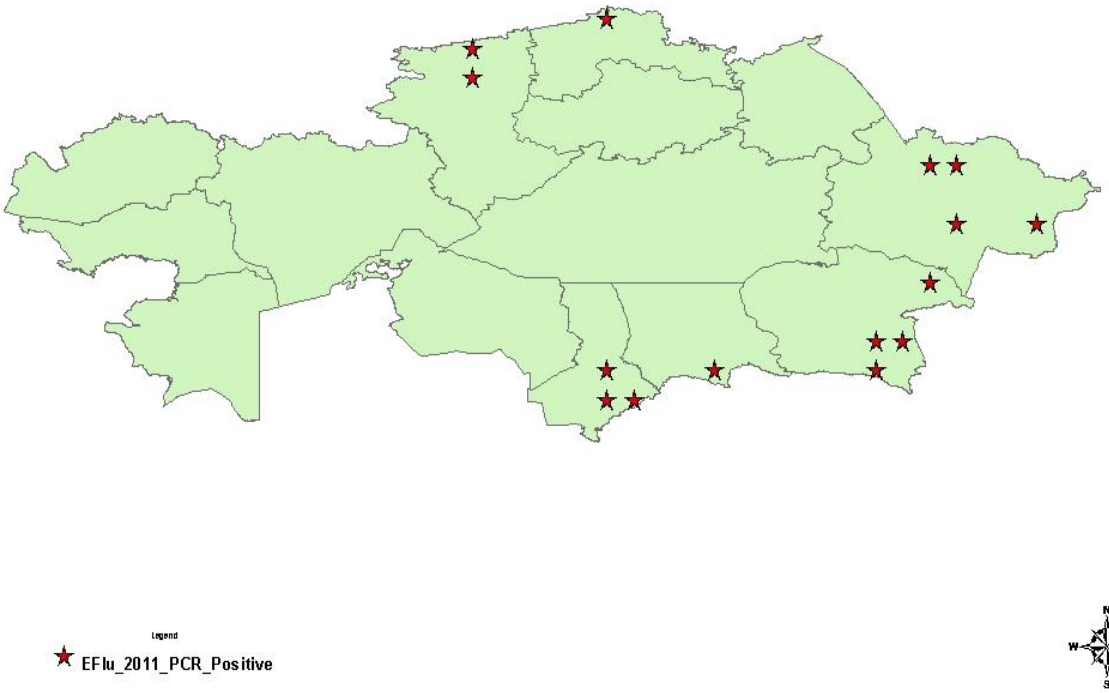


Рисунок 6 – Географическое распространения гриппа лошадей на территории РК в 2011 г. (по результатам ОТ-ПЦР-РВ)

Анализ исследований, проведенных весной 2011 г. показывает, что заболеваемость гриппом лошадей по Костанайской области составила 27,7 %, по

Северо-Казахстанской 17,7 %, по Восточно-Казахстанской 33,3 % и по Алматинской 41,9 %.

По результатам исследований проб от животных в ТОО «ОХ Заречный» Костанайской области весной и осенью вирус гриппа лошадей в хозяйстве был выявлен только в пробах, отобранных весной 2011 г. Полученные данные свидетельствуют, что в хозяйстве животные переболели гриппом в начале года.

Превалентность заболеваемости гриппом лошадей по Южно-Казахстанской области весной составила 35,48 %, а осенью 20,54 %, по Жамбылской области весной 19,2 %, а осенью 36,3 %. Наличие вирусоносителей в популяции лошадей южных регионов, как весной, так и осенью 2011 г. показывает, что заболевание приобрело характер эпизоотии и распространялось среди восприимчивого поголовья в течение всего года.

Анализ ретроспективных данных показывает, что при проведении исследований в сентябре-октябре 2010 г. в южных регионах животных вирусоносителей выявлено не было. Анализируя данные, полученные в 2010 г., можно предположить, что заболевание среди животных Южно-Казахстанской и Жамбылской областей началось в конце 2010 г. - начале 2011 г.

В 2012 г. исследования с целью выявления циркуляции вируса гриппа лошадей на территории Республики Казахстан были продолжены.

Для лабораторных исследований в НИИПББ были доставлены пробы от лошадей из Костанайской, Северо-Казахстанской, Южно-Казахстанской, Жамбылской, Алмаатинской, Восточно-Казахстанской, Актюбинской, Западно-Казахстанской областей.

Данные по изучению превалентности гриппа лошадей в различных районах Республики Казахстан в 2012 году представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Превалентность гриппа лошадей в различных регионах Республики Казахстан в 2012 г.

Область	Район, хозяйство	Весна		Осень	
		Число исследованных проб	Число положительных проб	Число исследованных проб	Число положительных проб
1	2	3	4	5	6
Костанайская	Костанайский, ТОО «ОХ Заречный»	-	-	10	0
	Мендыкаринский, ТОО «Каменорал»	-	-	19	0
	ТОО «Казак тулпары»	-	-	16	14

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
	Аулекольский, с/о Аккудык	-	-	18	0
Итого по области		0	0	63	14
Северо-Казахстанская	Аккайынский, с/о Астраханка	-	-	8	0
	Мамлютский, с/о Леденова	-	-	15	0
Итого по области		0	0	23	0
Южно-Казахстанская	Толе би, с/о Каратобе	-	-	29	4
Итого по области		0	0	29	4
Жамбылская	Т.Рыскуловский, ТОО «Азимбек»	-	-	6	5
	Кордайский, с. Соганды	23	5	-	-
	Кордайский, с.Отар ОПЖ НИИПББ	17	5	13	12
	Байзакский, с/о Улгули	-	-	9	2
Итого по области		40	10	28	19
Алматинская	Жамбылский, с. Матыбулак	13	2	11	8
	Талгарский, с. Талгар	-	-	3	2
Итого по области		13	2	14	10
Восточно-Казахстанская	Уланский, с. Торгын	17	3	-	-
Итого по области		17	3	0	0
Актюбинская	Шалкарский, с. Айшуак	6	1	-	-
	Шалкарский, Байкадам	2	0	-	-
Итого по области		8	1	0	0

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
Западно-Казахстанская	Жанибекский, Айдарлы	7	2	-	-
Итого по области		7	2	0	0
Итого:		85	18	157	47

В результате установлено, что весной 2012 г. из 85 исследованных проб РНК вируса гриппа типа А удалось обнаружить в 18 пробах, что составило 21 % от общего числа, осенью этого же года вирус гриппа лошадей был выявлен у 47 животных из 157 исследованных, что составило 30 %. Следует отметить, что если весной процент положительных реагирующих животных не превышал 30 %, то осенью в некоторых хозяйствах отмечался высокий процент заболевших животных. Так, осенью превалентность по гриппу лошадей в ТОО «Казак Тулпары» Костанайской области составила 87,5 %, в ОПЖ НИИПББ Жамбылской области - 92,3 %, ТОО «Азимбек» Жамбылской области - 83,3 %, в с.Матыбулак - 72,7 %, в с.Талгар Алматинской области - 66,7 %. Высокий процент количества положительно реагирующих животных свидетельствует о вспышке болезни в Жамбылской, Алматинской и Костанайской областях.

Обобщенные данные по заболеваемости гриппом в различных регионах РК представлены на рисунке 7.

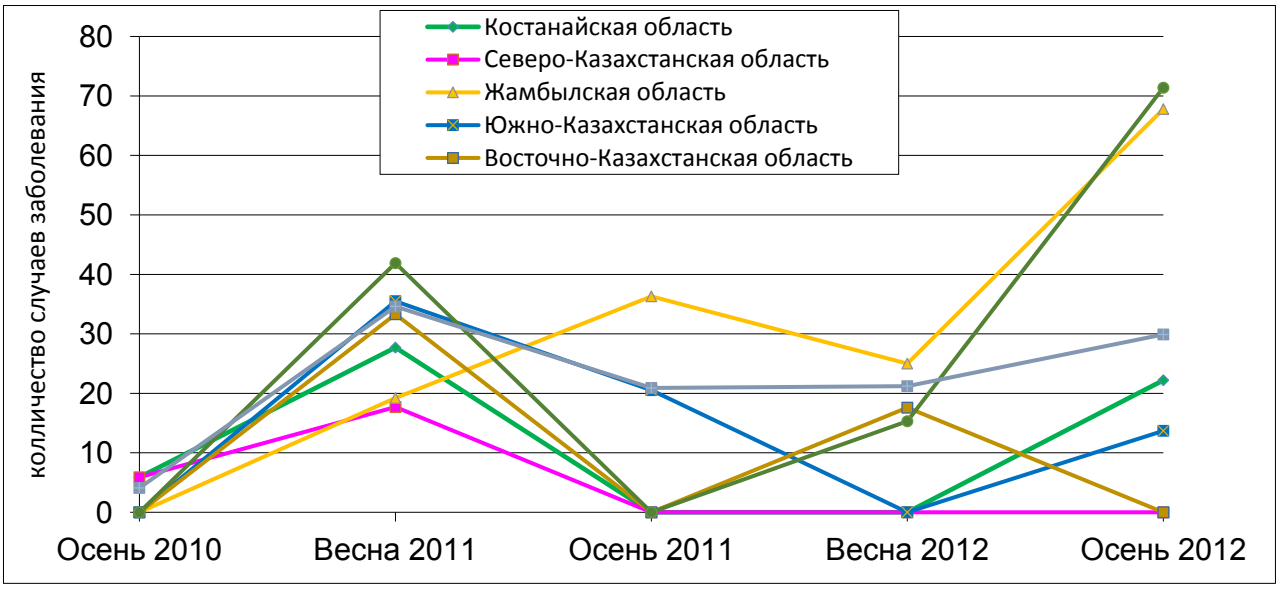
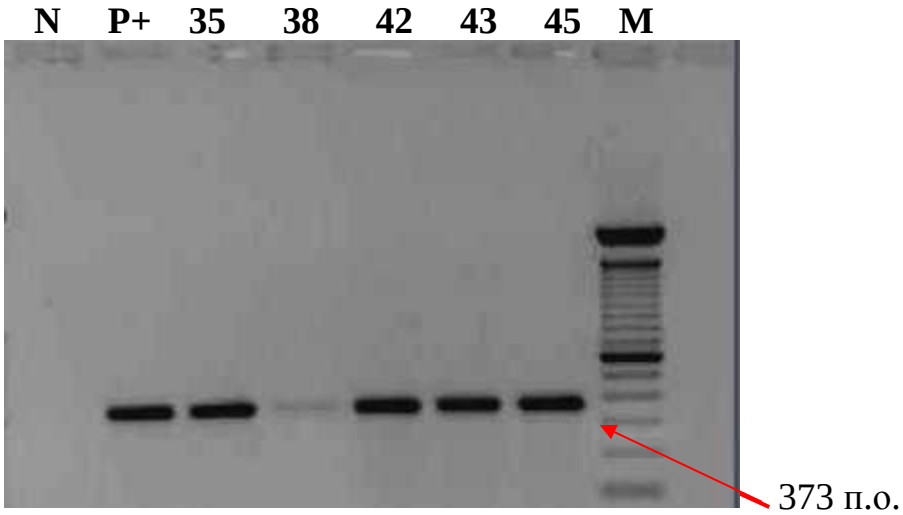


Рисунок 7 – Превалентность заболеваемости гриппом лошадей в 2010-2012 годах в различных регионах РК (по результатам ОТ-ПЦР-РВ)

Из рисунка видно, что за анализируемый период осень 2010 г. и осень 2012 г. грипп лошадей на основной территории РК имел два пика заболеваемости. Полученные данные свидетельствуют, что эпизоотия гриппа

лошадей на территории РК имело место в 2011 г. весной, а в 2012 г. заболевание животных отмечали осенью. Идентификацию субтипа H3 и N8 проводили методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров. Результаты субтипирования проб на H3 ВГЛ представлены на рисунке 8.

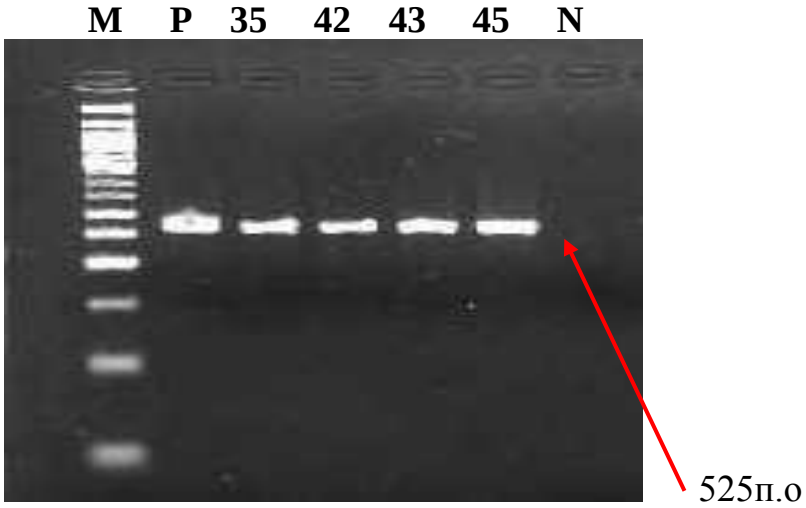


N - отрицательный контроль, P + - положительный контроль, 35 - 45 -исследуемые пробы, M - маркер 100bp

Рисунок 8 – Электрофореграмма ОТ-ПЦР при идентификации вируса гриппа A/H3

Из данных электрофореграммы видно, что в пробах 35, 42, 43 и 45 образовался ПЦР продукт размером 373 п.о., характерный для вируса гриппа лошадей типа А подтипа H3.

После определения подтипа по гемагглютинину изоляты были исследованы методом ПЦР с праймерами N8-Eq-F30 b N8-Eq-R535 специфичными к субтипу N8. Результаты исследований представлены на рисунке 9.



M - маркер 100bp, P-положительный контроль, 35, 42, 43 и 45 - исследуемые пробы, N - отрицательный контроль

Рисунок 9 – Электрофореграмма ОТ-ПЦР на ген N8 ВГЛ

Из данных рисунка 9 видно, что во всех пробах нарабатывается ПЦР продукт размером 525 п.о., характерный нейраминидазе для вируса гриппа лошадей субтипа N8 [153].

По результатам полученных данных можно заключить, что грипп лошадей циркулирует во всех исследованных областях РК.

Исходя из результатов проведенных исследований можно заключить, что все выделенные гемагглютинирующие агенты являются вирусами гриппа лошадей подтипа A/H3N8.

3.1.3 Выделение изолятов вируса лошадей

Общеизвестно, что для выделения вируса гриппа типа А из проб патологического или клинического материала используют развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ), а также первичные и перевиваемые линии культур клеток, полученные из тканей птиц или млекопитающих. Однако, по результатам исследований, обнаружили, что штаммы вируса гриппа лошадей второго подтипа A/H3N8, выделенные в РКЭ, быстро адаптировались к клеткам почек обезьян, несмотря на отрицательные результаты при попытках выделить вирус в этой культуре из первичного патологического материала. Тогда как, штаммы вируса гриппа лошадей первого подтипа (H7N7) адаптировать к этой культуре им не удалось [154].

По многочисленным данным литературы универсальной моделью для выделения и размножения вируса гриппа лошадей из эпизоотологического материала являются РКЭ [155]. В связи с этим, в наших исследованиях для выделения и адаптации изолятов вируса гриппа лошадей из первичного материала использовали 10-12 суточные РКЭ, для заражения которых исходный клинический материал, состоящий из слизистых истечений носа больных животных, после добавления антибиотиков, инокулировали в аллантоисную полость в объеме 0,1 мл. Овоскопирование зараженных эмбрионов проводили через 22-24 часа, после инокуляции исследуемого материла интервалом каждые 4-5 часов, в течение 4 суток. Погибшие в течение срока наблюдения, а также оставшиеся в живых эмбрионы охлаждали, и аллантоисную жидкость исследовали на наличие гемагглютинина вируса.

Всего из очагов эпизоотии, возникших на территории Республики Казахстан, от больных лошадей поступило 14 проб клинического материала в виде истечений из носовой полости. Эти пробы были доставлены из ТОО «Казак Тулпары» Костанайской области, ТОО «ЛКЗ» Т. Рыскуловского района, села Улгили Байзаковского района Жамбылской области, а также местности Матибулак Жамбылского района, Алматинской области. Для получения изолятов вируса гриппа лошадей использовали выделения слизистой оболочки носовой полости больных животных с явными признаками ринита и повышенной температурой тела от 39,0°С до 40,3°С. Сбор клинического материала для лабораторных исследований, заражение РКЭ проводили по общепринятой в вирусологии методике. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Адаптация и выделение местных изолятов вируса гриппа лошадей

Испытуемые пробы	Изолят	I пассаж	Титр в РГА	II пассаж	Титр в РГА	III пассаж	Титр в РГА	Биологическая активность lg $ЭИД_{50}/см^3$
Смыв № 1	Байзак	+	1:16*	+	1:32*	+	1:128*	6,70
Смыв № 2	Байзак	+	1:32*	+	1:64*	+	1:256*	5,45
Смыв № 3	Байзак	+	1:32*	+	1:128*	+	1:512*	6,58
Смыв № 1	Казак Тулпары	+	1:2*	+	1:4*	+	1:16*	4,20
Смыв № 2	Казак Тулпары	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 3	ЛКЗ	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 4	ЛКЗ	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 5	ЛКЗ	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 1	ЛКЗ	-	-	+	1:2*	+	1:16*	4,62
Смыв № 2	Матибулак	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 3	Матибулак	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 4	Матибулак	-	-	+	1:2*	+	1:16*	4,62
Смыв № 5	Матибулак	-	-	-	-	-	-	-
Смыв № 6	Матибулак	-	-	-	-	-	-	-
Примечания - 1 (+) – положительно; 2 (-) – отрицательно; 3(*) – титры гемагглютинина показаны в обратных величинах.								

Данные таблицы 6 показывают, что из 14 проб клинического материала при выделении изолята «Байзак» вируса гриппа лошадей из всех 3 проб вирус адаптировался на РКЭ с I пассажа и дал положительную реакцию в гемагглютинации с активностью от 1:16 до 1:128. При адаптации изолятов ««Казак Тулпары», «Матибулак» и «ЛКЗ» из клинического материала геммаглютинин вируса выявлен на первом и втором пассажах, активность которых в третьем пассаже составила 1:16 в том и другом случае, а биологическая - 4,20 lg$ЭИД_{50}/см^3$ и 4,62 lg$ЭИД_{50}/см^3$, соответственно.

Итак, по результатам этих исследований в арсенале имеется четыре изолята ВГЛ – «Байзак», «Казак Тулпары», «Матибулак» и «ЛКЗ», выделенных из очагов эпизоотии на территории РК. Однако, с изолятом «Байзак», предварительно проведен ряд работ по вопросу изучения его биологических свойств, в том числе и определению подтипа вируса. В связи с чем, в исследованиях по изучению патогенных и антигенных свойств вируса гриппа лошадей, выделенных на территории РК, в первую очередь целесообразно было использовать изолят «Байзак».

3.2 Подбор культур клеток и определение оптимальных параметров культивирования штаммов вируса гриппа лошадей

Для изучения ВГЛ с целью разработки средств профилактики и диагностики необходимо использование комплексного подхода, в который входят подбор оптимальных биосистем и отработка параметров культивирования вируса. Данные исследования являются неотъемлемой частью при разработке технологии изготовления противовирусных вакцин.

Наиболее подходящей моделью для размножения ВГЛ являются развивающиеся куриные эмбрионы, которых заражают в амниотическую или аллантоисную полости [156, 157]. Вместе с тем в последние годы в литературных источниках появляются новые данные, указывающие на то, что гриппозные вакцины, приготовленные на клетках *MDCK,* обладают лучшими защитными свойствами для экспериментальных животных, чем их эмбриональные аналоги. Показано, что иммунизация различных видов животных культуральными или эмбриональными гриппозными вакцинами вызывали одинаковый уровень выработки антигемагглютинирующих антител [158, 159].

Для определения наиболее чувствительной культуры клеток при культивировании вируса гриппа лошадей был проведен ряд экспериментов с использованием пяти линий культур клеток (рисунок 10).

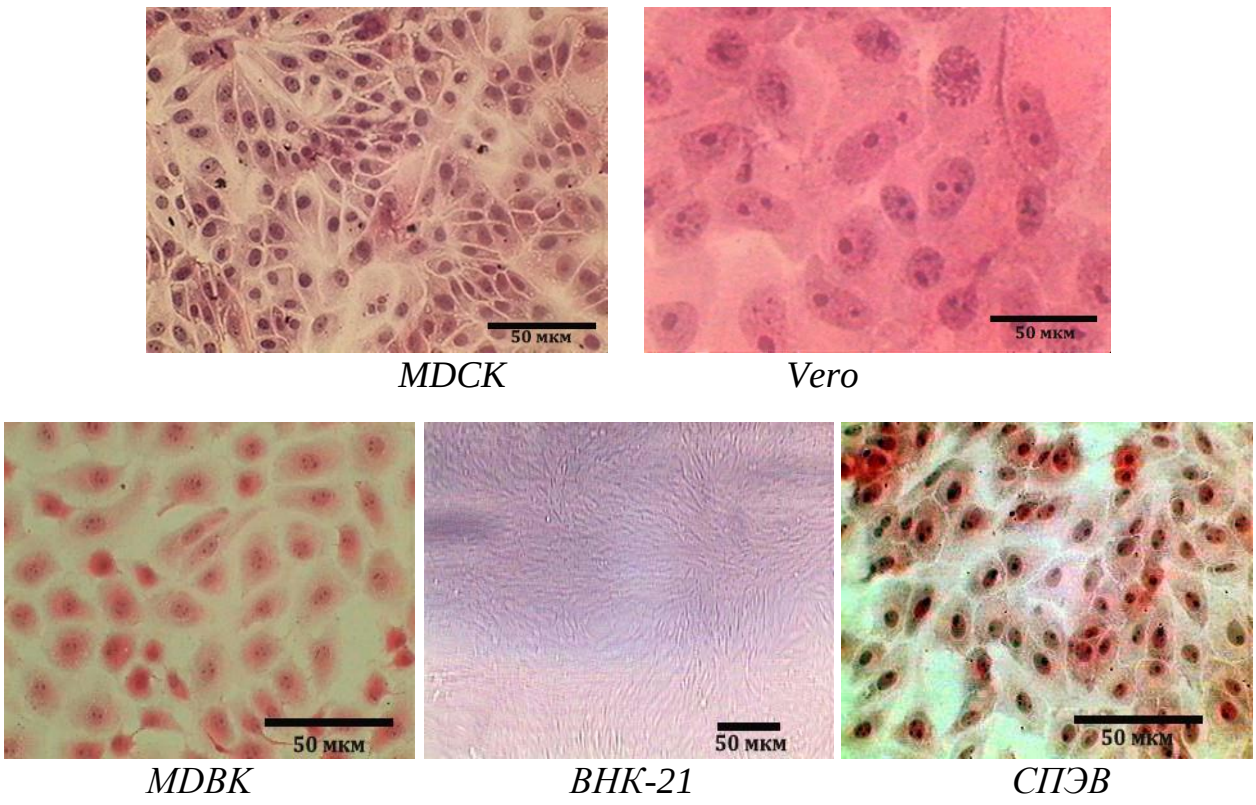


Рисунок 10 – Линии клеток после восстановления из рабочего банка

В связи с этим был проведен скрининг наиболее чувствительной перевиваемой клеточной линии для наработки вируса гриппа, необходимый для проведения дальнейших исследований.

В результате проведенных исследований установлено, что репродукция вируса гриппа отмечается во всех испытанных культурах, но наиболее чувствительной линией клеток оказалась культура клеток *MDCK* (таблица 7), где уже на первом пассаже удается получить высокоактивную вируссодержащую суспензию с инфекционной активностью не менее 7,00 lg $ТЦД_{50}/см^3$ и гемагглютинирующим титром не менее 1:256, что в точности подтверждает литературные данные [160].

Таблица 7 – Подбор наиболее чувствительной клеточной линии для культивирования вируса гриппа лошадей

Наименование штамма	Культура клеток	Биологическая активность вируса			
		Инфекционная активность, lg $ТЦД_{50}/см^3$, (x±m), n=3		Гемагглютинирующая активность	
«A/equine/Baizak/09/2012 (H_3N_8)»	MDCK	7,25 ± 0,25	p<0,1	1:256	p<0,01
	Vero	4,25 ± 0,25	p>0,5	1:64	P>0,5
	ВНК-21	5,37 ± 0,12	p<0,5	1:64	p<0,5
	СПЭВ	4,37 ± 0,37	p>0,5	1:32	p>0,5
	MDBK	3,75 ± 0,25	p<0,5	1:32	p<0,5
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при p<0,5.					

Таким образом, для проведения дальнейших исследований по отработке оптимальных параметров культивирования вируса гриппа лошадей нами выбрана культура клеток *MDCK*.

Для определения срока культивирования штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012*. Ими инфицировали культуру клеток *MDCK* в дозе 0,01 $ТЦД_{50}$ с дальнейшим инкубированием при температуре 34°С. Через 24, 48, 72 и 96 часов часть матрасов закладывали на заморозку в низкотемпературный холодильник (минус 70°С) на 12-14 час. Далее с каждого матраса брали пробу вируссодержащей жидкости для определения наличия вируса и постановки количественной РГА.

Гемагглютинирующую активность в РГА проверяли при использовании 0,5 % взвеси эритроцитов петуха, а инфекционную активность определяли титрованием в культуре клеток *MDCK*. Титр вируса выражали в lg $ТЦД_{50}/см^3$. Результаты исследований показывают, что штаммы вируса гриппа лошадей в наибольших титрах накапливаются в течение 72 часов, где гемагглютинирующая

активность вируса составляет 1:256, а инфекционный титр вируса 7,25±0,14 – 7,33±0,08 и 6,91±0,08 lg $ТЦД_{50}/см^3$, соответственно. Дальнейшее инкубирование вируса до 96 час приводит к снижению гемагглютинирующего титра до 1:64÷1:128, и инфекционного до 5,75 lg $ТЦД_{50}/см^3$. Результаты исследований представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Инфекционная и ГАА активности штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/ 10/2012* в процессе культивирования на MDCK

Штаммы	Время культивирования	Инфекционная активность, lg $ТЦД_{50}/см^3$ (X±m), n=3		Титр в РГА	
A/equine/Baizak/09/2012	48 час	5,58 ± 0,08	p>0,5	1:64	p<0,5
	72 час	7,25 ± 0,14	p<0,5	1:256	p<0,1
	96 час	5,75 ± 0,14	p>0,5	1:128	p<0,5
A/equine/Kostanai/09/2012	48 час	5,66 ± 0,16	p>0,5	1:128	p<0,5
	72 час	7,33 ± 0,08	p<0,5	1:256	p<0,1
	96 час	5,75 ± 0,28	p>0,5	1:128	p<0,5
A/equine/Matybulak/10/2012	48 час	5,16 ± 0,22	p>0,5	1:32	p>0,5
	72 час	6,91 ± 0,08	p<0,5	1:256	p<0,1
	96 час	5,75 ± 0,14	p>0,5	1:64	p<0,5
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы p<0,5.					

В результате проведенных исследований был подобран оптимальный срок культивирования штамма *A/equine/Baizak/09/2012* в культуре клеток *MDCK* 72 часов.

Для изучения репродуктивных свойств штаммов *A/equine/Baizak/09/2012* вируса гриппа лошадей в культуре клеток проведены исследования по определению уровня накопления вируса при различных дозах инфицирования. При этом использовали культуру клеток *MDCK* при заражении в дозе от 0,0001 до 0,1 $ТЦД_{50}$/кл.

Культивирование инфицированной культуры проводили при температуре (34 ± 0,5) °С и длительности 72 часов. По окончании культивирования матрасы с инфицированной культурой клеток замораживали при минус 70°С в течение

12-14 час, затем оттаивали при комнатной температуре и проводили сбор вируссодержащей суспензии. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Определение оптимальной инфицирующей дозы штаммов *ВГЛ* в культуре клеток MDCK

Наименование штамма	Доза заражения, $ТЦД_{50}$/кл	Биологическая активность вируса			
		Инфекционная активность, lg $ТЦД_{50}/см^3$, (x±m), n=3		Гемагглютинирующая активность	
A/equine/Baizak/09/2012	0,0001	3,50 ± 0,28		1:2	
	0,001	5,75 ± 0,14	p<0,5	1:32	p<0,5
	0,01	6,83 ± 0,08	p<0,5	1:128	p<0,1
	0,1	7,41 ± 0,08	p<0,1	1:256	p<0,01
A/equine/Kostanai/09/2012	0,0001	5,91 ± 0,16	p<0,5	1:32	p<0,5
	0,001	6,16 ± 0,08	p<0,5	1:64	p<0,1
	0,01	6,33 ± 0,22	p<0,5	1:64	p<0,1
	0,1	7,16 ± 0,22	p<0,1	1:256	p<0,01
A/equine/Matybulak/10/2012	0,0001	4,50 ± 0,14	p>0,5	1:8	p>0,5
	0,001	6,16 ± 0,16	p<0,5	1:64	p<0,1
	0,01	6,45 ± 0,14	p<0,5	1:128	p<0,1
	0,1	7,25 ± 0,14	p<0,1	1:256	p<0,01
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при значении p<0,5.					

В результате проведенных исследований была определена оптимальная заражающая доза для штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* ВГЛ в культуре клеток. В этой серии экспериментальных данных установлена оптимальная заражающая доза в количестве 0,1 $ТЦД_{50}$/кл, обеспечивающий выход вируса активностью более 7 lg $ТЦД_{50}/см^3$.

Из данных таблицы 9 видно, что при инфицировании культур клеток вирусами в дозе от 0,1 до 0,01 $ТЦД_{50}$/кл наблюдается накопление вируса в титрах от 6,33±0,22до 7,41±0,08 lg $ТЦД_{50}/см^3$, а гемагглютинирующий титр при этом составляет от 1:64 до 1:256. Использование дозы заражения вируса меньше 0,01 $ТЦД_{50}$/кл для наработки вируссодержащего материала в культуре клеток следует признать нецелесообразным, так как уровень накопления инфекционной и гемагглютинирующей активности при этом значительно ниже (3,50±0,28 – 6,16±0,16 lg $ТЦД_{50}/см^3$).

В технологии культивирования вируса гриппа штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* большую роль играет температура инкубирования. В этой связи в следующих опытах проведены исследования по определению влияния различных

температурных режимов инкубирования на накопление вируса гриппа лошадей в культуре клеток *MDCK*.

Инфицированные вирусом культуры клеток инкубировали при температурах: 32°С, 34°С, и 37°С. Исследования по влиянию температуры инкубирования на накопление вируса гриппа лошадей проводили в трех повторностях, с последующим определением гемагглютинирующей и биологической активности вируссодержащего материала. Результаты исследований представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Определение температуры инкубирования вируса гриппа лошадей в культуре клеток

Наименование штамма	Температура инкубирования	Биологическая активность, lg $ТЦД_{50}/см^3$ (x±m), n=3		Титр в РГА	
A/equine/Baizak/09/2012	32 °С	6,75 ± 0,1	p<0,5	1:128	p<0,1
	34 °С	7,25 ± 0,2	p<0,5	1:256	p<0,01
	37 °С	5,50 ± 0,3	p>0,5	1:64	p<0,5
A/equine/Kostanai/09/2012	32 °С	6,41 ± 0,1	p<0,5	1:128	p<0,1
	34 °С	7,16 ± 0,2	p<0,5	1:256	p<0,01
	37 °С	5,91 ± 0,1	p<0,5	1:32	p>0,5
A/equine/Matybulak/10/2012	32 °С	5,83 ± 0,1	p>0,5	1:128	p<0,1
	34 °С	6,75 ± 0,1	p<0,5	1:256	p<0,01
	37 °С	5,83 ± 0,1	p>0,5	1:128	p<0,1
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при значении p<0,5.					

По данным таблицы 10 видно, что репродукция вируса наблюдается при всех температурных режимах. Однако наиболее подходящим для инкубирования исследуемых штаммов ВГЛ является температура 34°С, где накопление инфекционной активности составляет в пределах от 6,75±0,1 до 7,25±0,2 lg $ТЦД_{50}/см^3$, а гемагглютинирующая 1:256 для трех штаммов.

В результате, определены оптимальные параметры для культивирования вируса и получения высокоактивной биомассы, пригодной для использования при производстве профилактических и диагностических препаратов.

3.3 Определение оптимальных параметров культивирования штаммов ВГЛ в РКЭ

Для изучения репродуктивных свойств исследуемых штаммов ВГЛ в куриных эмбрионах, проведены исследования по определению уровня накопления вируса при различных дозах инфицирования от 10 до 100000 $ЭИД_{50}$. При этом условия культивирования были одинаковы.

Инкубирование инфицированных РКЭ проводили при температуре (33±0,5)^{0}С и длительности 72 часов. По окончании культивирования эмбрионы охлаждали при 4^{0}С в течение 12-14 час, затем проводили сбор аллантоисной жидкости. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Определение оптимальной инфицирующей дозы штаммов ВГЛ в РКЭ

Наименование штамма	Доза заражения, ЭИД$_{50}$/0,2 см^3	Биологическая активность вируса			
		Инфекционная активность, lg ЭИД$_{50}$/см^3, (x±m), n=3		Титр в РГА	
A/equine/Baizak/09/2012	100000	6,45±0,1	p<0,5	1:128	p<0,5
	10000	6,70±0,3	p<0,5	1:256	p<0,1
	1000	7,45±0,1	p<0,5	1:1024	p<0,01
	100	6,95±0,1	p<0,5	1:512	p<0,1
	10	6,70 ±0,2	p<0,5	1:512	p<0,1
A/equine/Kostanai/09/2012	100000	5,70±0,1	p>0,5	1:512	p<0,1
	10000	5,45±0,2		1:1024	p<0,01
	1000	8,70±0,3	p<0,1	1:4096	p<0,01
	100	7,20±0,1	p<0,1	1:2048	p<0,01
	10	5,95±0,2	p>0,5	1:2048	p<0,01
A/equine/Matybulak/10/2012	100000	5,70±0,1	p>0,5	1:64	
	10000	6,45±0,2	p<0,5	1:512	p<0,1
	1000	8,20±0,3	p<0,1	1:1024	p<0,01
	100	7,45±0,1	p<0,1	1:1024	p<0,01
	10	7,20±0,2	p<0,1	1:512	p<0,1
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при значении p<0,5.					

Следовательно, оптимальная заражающая доза для этих штаммов в куриных эмбрионах составляет 1000 ЭИД$_{50}$/0,2 см^3, при котором наблюдается наибольшее накопление вируса в титрах от 7,45±0,08до 8,70±0,30 lg ЭИД$_{50}$/см^3, а гемагглютинирующий титр при этом составляет от 1:1024 до 1:4096. Использование дозы заражения вируса меньше 1000 ЭИД$_{50}$/0,2 см^3 для наработки вируссодержащего материала в РКЭ следует признать не целесообразным, так как уровень накопления инфекционной и гемагглютинирующей активности при этом существенно ниже (5,45±0,22 – 7,45±0,14 lg ЭИД$_{50}$/см^3).

Таким образом, получены необходимые данные для проведения дальнейших исследований по разработке параметров культивирования вируса и получения высокоактивной биомассы, пригодной для использования при производстве диагностических и профилактических препаратов.

Для определения оптимального срока инкубирования штаммов *ВГЛ,* инфицировали 10-суточные куриные эмбрионы в дозе 1000 ЭИД$_{50}$ с дальнейшим инкубированием при температуре 33^{0}С. Через 24, 48, 72 и 96 часов часть

эмбрионов охлаждали при 4^0С в течение 12-14 час. Далее с каждого эмбриона брали пробу аллантоисной жидкости для определения наличия вируса постановкой качественной РГА. АЖ эмбрионов положительных в РГА отбирали в одинаковом объеме и собирали в один стерильный флакон.

Объединенные пробы затем проверяли на гемагглютинирующую активность в РГА и определяли инфекционную активность титрованием на 10 суточных РКЭ. Титр вируса выражали в lg $ЭИД_{50}/см^3$. Результаты исследований, представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Определение продолжительности инкубирования штаммов ВГЛ на развивающихся куриных эмбрионах

Наименование штамма	Время инкубирования	Титр в РГА		Инфекционная активность, lg $ЭИД_{50}/см^3$ (X±m), n=3	
A/equine/Baizak/09/2012	24 час	1:0		не исследовали	
	48 час	1:64	p<0,5	6,70±0,28	
	72 час	1:1024	p<0,01	7,70±0,25	p<0,5
	96 час	1:256	p<0,1	7,28±0,08	p<0,5
A/equine/Kostanai/09/2012	24 час	1:0		не исследовали	
	48 час	1:128	p<0,1	7,61±0,22	
	72 час	1:2048	p<0,01	8,28±0,16	p<0,5
	96 час	1:512	p<0,1	7,70±0,14	p>0,5
A/equine/Matybulak/10/2012	24 час	1:0		не исследовали	
	48 час	1:128	p<0,1	8,20±0,14	p<0,5
	72 час	1:2048	p<0,01	8,20±0,25	p<0,5
	96 час	1:512	p<0,1	7,78±0,22	
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при значении p<0,5.					

В результате исследований установлено, что штаммы вируса гриппа лошадей в наибольших титрах накапливаются через 72 часа, где гемагглютинирующая активность вируса колеблется в пределах 1:1024÷1:2048. Инфекционный титр вируса в указанное время составляет 7,70±0,25 - 8,28±0,16 и 8,20±0,25 lg $ЭИД_{50}/см^3$. Дальнейшее инкубирование вируса до 96 часов приводит к снижению гемагглютинирующего титра вируса до 1:256÷1:512, а инфекционного до 7,28±0,28 lg $ЭИД_{50}/см^3$.

Таким образом, оптимальные сроки инкубирования штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* в развивающихся куриных эмбрионах, позволяют получить вирусную суспензию в объеме до 10 мл, с активностью не менее 7,70 lg $ЭИД_{50}/см^3$.

Развивающиеся куриные эмбрионы широко используются для выделения и размножения вируса еще со времени первого описания инфицирования в амниотическую полость. Исследования Beveridge и Burnet по культивированию вирусов и риккетсий в курином эмбрионе была опубликована в 1946 г. Вирусы одинаково хорошо размножается в РКЭ от 9 до 13-дневного возраста, однако начиная с 13-х суток объем аллантоисной жидкости быстро уменьшается.

В РКЭ более раннего возраста содержится меньше солей мочевой кислоты в аллантоисной жидкости и по мере развития эмбриона их содержание увеличивается. Эмбрионы, инфицированные в 12-13-дневном возрасте, содержат аллантоисную жидкость, которая становится мутной после сбора и хранения, через несколько суток в ней образуется обильный осадок. Осадки солей мочевой кислоты содержат вирус, и их образование может резко снижать титр вируса в жидкости [161].

Для выяснения влияния возраста куриных эмбрионов на уровень накопления вируса и объем получаемой аллантоисной жидкости были проведены отдельные исследования, результаты которых представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Влияние возраста КЭ на репродукцию штаммов ВГЛ

Наименование штамма	Доза заражения, $ЭИД_{50}$/0,2 $см^3$	Возраст РКЭ, сут.	Инфекционная активность, lg $ЭИД_{50}/см^3$ (x±m), n=3		Титр в РГА		Средний объем АЖ, $см^3$
1	2	3	4		5		6
A/equine/Baizak/09/2012	1000	8	6,87±0,08		1:128		9,5
		9	7,53±0,22	p<0,5	1:256	p<0,5	9,4
		10	8,11±0,08	p<0,1	1:1024	p<0,1	10,5
		11	8,20±0,14	p<0,1	1:1024	p<0,1	10,7
		12	7,95±0,14	p<0,1	1:256	p<0,5	9,1
		13	7,45±0,28	p<0,5	1:256	p<0,5	7,0
A/equine/Kostanai/09/2012	1000	8	5,78±0,22		1:256	p<0,5	9,7
		9	6,53±0,16	p<0,5	1:512	p<0,5	9,6
		10	8,11±0,08	p<0,1	1:2048	p<0,01	10,7

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4		5		6
		11	8,20±0,14	p<0,1	1:2048	p<0,01	10,3
		12	7,36±0,33	p<0,5	1:512	p<0,5	9,0
		13	6,45±0,14	p<0,5	1:128		6,6
A/equine/Matybulak/10/2012	1000	8	5,87±0,17		1:256	p<0,5	9,4
		9	6,45±0,25	p<0,5	1:512	p<0,5	9,6
		10	8,33±0,12	p<0,1	1:2048	p<0,01	10,4
		11	7,82±0,12	p<0,1	1:2048	p<0,01	10,2
		12	6,82±0,12	p<0,5	1:512	p<0,5	9,3
		13	5,95±0,25	p<0,5	1:128		7,1
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при значении при p<0,5.							

По результатам исследований было установлено, что наиболее оптимальным возрастом для получения качественного вируссодержащего материала является РКЭ 10-11 суточного возраста. Это обусловлено качеством получаемой суспензии, прозрачностью, большим объемом получаемой аллантойсной жидкости (до 10,6 $см^3$). Инфекционная активность штаммов ВГЛ при культивировании на 10 суточных РКЭ колебалась в пределах от 8,33 до 8,20 lg $ЭИД_{50}/см^3$, а гемагглютинирующий титр от 1:1024 до 1:2048. При культивировании на 12-13 суточных РКЭ у эмбрионов к началу сбора отмечается уменьшение объема получаемой АЖ (до 6$см^3$), также образование хлопьев и оперение эмбриона. Это все способствует загрязнению и снижению качества получаемой вируссодержащей суспензии [162].

Также при культивировании штаммов ВГЛ важное значение имеет температура инкубирования. В этой связи, в следующей серии опытов были проведены исследования по выяснению влияния различных температурных режимов инкубирования на накопление вируса в РКЭ.

Инфицированные вирусом 10-суточные РКЭ инкубировали при температурах: 33°С, 34°С, 35°С и 37°С. Исследования по влиянию температуры инкубирования на накопление вируса гриппа лошадей проводили в трех повторностях, с определением биологической и гемагглютинирующей активности вируссодержащего материала. Результаты исследований представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Определение влияния температуры инкубирования на развитие и активность вирусов гриппа лошадей в РКЭ

Наименование штамма	Температура инкубирования	Титр в РГА		Биологическая активность, lg $ЭИД_{50}/см^3$ (x±m),n=3	
1	2	3		4	
A/equine/Baizak/09/2012	33°С	1:512	p<0,5	7,11±0,1	p<0,5
	34°С	1:512	p<0,5	7,20±0,1	p<0,5

Продолжение таблицы 14

1	2	3		4	
	35°С	1:512	p<0,5	7,45±0,1	p<0,5
	37°С	1:256		6,70±0,2	
A/equine/Kostanai/09/2012	33°С	1:1024	p<0,1	7,45±0,3	p<0,5
	34°С	1:1024	p<0,1	7,20±0,1	p<0,5
	35°С	1:1024	p<0,1	7,95±0,2	p<0,5
	37°С	1:512	p<0,5	6,95±0,1	p>0,5
A/equine/Matybulak/10/2012	33°С	1:1024	p<0,1	7,82±0,2	p<0,1
	34°С	1:1024	p<0,1	7,70±0,2	p<0,5
	35°С	1:1024	p<0,1	7,20±0,3	p<0,5
	37°С	1:512	p<0,5	6,95±0,1	p>0,5
Примечание – Во всех случая различия между экспериментальными данными были значимы при значении при p<0,5.					

Репродукция ВГЛ наблюдается во всех заданных температурных режимах. Однако, оптимальным температурным режимом инкубирования по результатам проведенных экспериментов для исследуемых штаммов, является от 33°С до 35°С, с инфекционной активностью для трех штаммов составляла 7,11-7,95 lg $ЭИД_{50}/см^3$, а гемагглютинирующая 1:512-1024.

3.4 Морфометрические и физико-химические свойства ВГЛ

3.4.1 Получение очищенных и концентрированных препаратов вируса гриппа лошадей для электронно-микроскопических исследований

Выбор методов очистки и концентрирования вирусов существенно зависит от конечных целей использования очищенных препаратов. Для молекулярно-биологических исследований к качеству вирусного материала предъявляются определенные требования. Вирус должен сохранять целостность структур при его очистке и концентрировании, быть свободным от контаминации.

Проведение очистки и концентрирования вирусов до настоящего времени является многоэтапным и специфическим для конкретного вируса. Практически невозможно найти пригодный для всех вирусов универсальный способ очистки, что связанно с индивидуальной морфологией и физико-химическими свойствами вирусов. Также следует учитывать свойства тканей хозяина [163].

На всех этапах очистки и концентрирования чистоту и гомогенность получаемых вирусных препаратов контролировали методом электронной микроскопии и электрофореза в ПАФГе. На начальном этапе исследований для очистки штаммов вируса использовали градиентное ультрацентрифугирование в растворе сахарозы.

В таблице 15 приведены характеристики очищенных препаратов вируса гриппа лошадей методом ультрацентрифугирования [164].

Таблица 15 – Характеристика очищенных препаратов ВГЛ методом ультрацентрифугирования

Штамм	Этап очистки	Титр ГАА	Белок мг/мл	Выход вируса по ГАА, % от исходной
A/equine/Baizak/09/ 2012	Исходная ВАЖ	1:512	1,00	100
	Градиентное ультрацентрифугирование	1:8192	0,25	37
A/equine/Kostanai/09/ 2012	Исходная ВАЖ	1:256	1,20	100
	Градиентное ультрацентрифугирование	1:8192	0,28	64
A/equine/Matybulak/10/2012 (H3N8)	Исходная ВАЖ	1:256	5,25	100
	Градиентное ультрацентрифугирование	1:8192	0,21	35

Выход вируса по гемагглютинирующей активности для штаммов *A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* не превышает 40 %, тогда как для штамма *A/equine/Baizak/09/2012* он составил более 60 %.

Результаты градиентного центрифугирования представлены на рисунке 11.

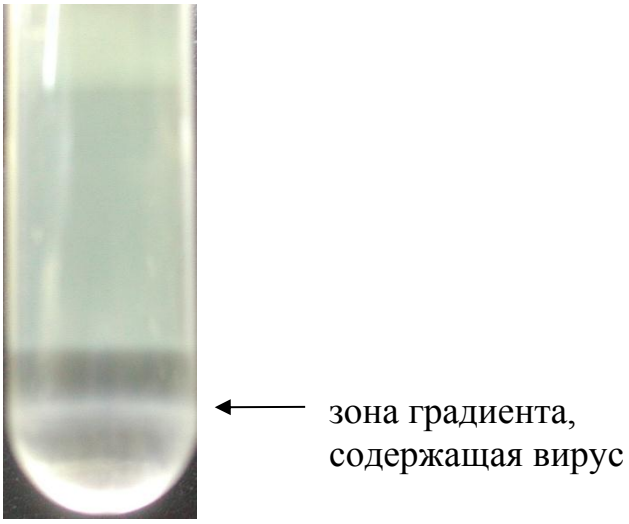


Рисунок 11 – Градиентный профиль вируса гриппа лошадей

Опалесценция ВГЛ наблюдалась между 40 % и 60 % градиентами плотности сахарозы. После очистки вирусов гриппа выход белка резко отличается, что вероятно связано со штаммовыми особенностями.

По результатам электронной-микроскопии контаминации посторонними микроорганизмами в очищенных препаратах вируса гриппа лошадей не наблюдалась (рисунок 12). Установлено, что в процессе очистки вирионы сохраняют свою структуру.

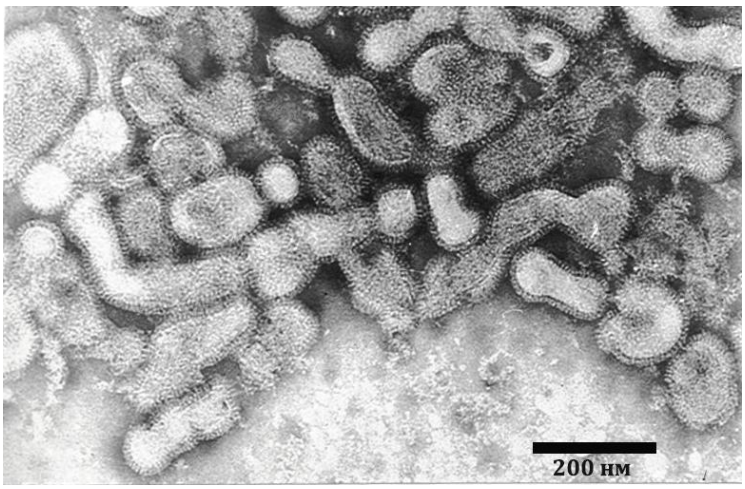
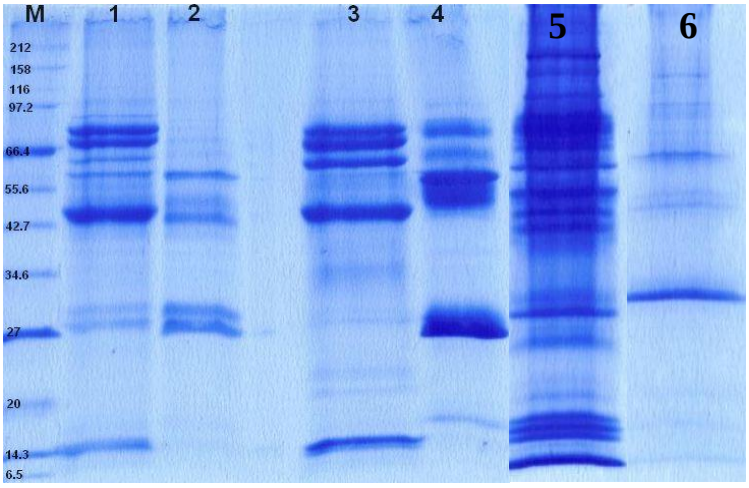


Рисунок 12 – Вирус гриппа лошадей штамм *A/equine/Baizak/09/2012*, очищенный методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Ув. 100 000х)

После анализа очищенных вирусных суспензий электрофорезом в ПААГ было установлено наличие примесных белков (овальбумина) в препаратах с низкой степенью очистки штаммов ВГЛ (H3N8) (рисунок 13).



M - маркер молекулярных масс, 1 - вируссодержащая аллантоисная жидкость штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8), 2 - очищенный препарат вируса *A/equine/Baizak/09/2012*, 3 - вируссодержащая аллантоисная жидкость штамм *A/equine/Kostanai/09/2012*, 4 - очищенный препарат вируса *A/equine/Kostanai/09/2012*, 5 - вируссодержащая аллантоисная жидкость штамм *A/equine/Matybulak/10/2012*, 6 - *A/equine/Matybulak/10/2012* очищенный препарат вируса

Рисунок 13 – Полипептидный состав вируссодержащих суспензий

Для очистки ВГЛ также был использован метод ионообменной хроматографии. Характеристика вирусных препаратов на разных стадиях очистки представлена в таблице 16.

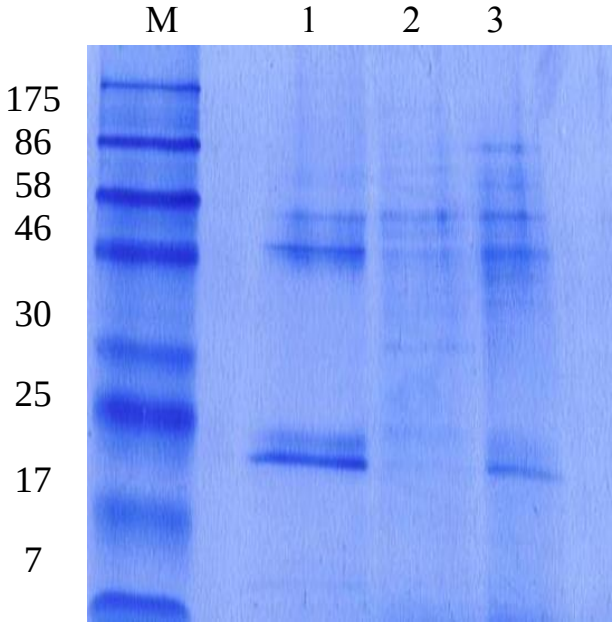
Таблица 16 – Характеристика вирусных препаратов на этапах очистки методом ионообменной хроматографии

Штамм	Этап очистки	Титр ГАА	Белок, мг/мл	Выход вируса по ГАА, % от исходной
A/equine/Baizak/09/2012	Исходная ВАЖ	128	1.000	100
	Адсорбция на ионобменнике [pH 7,0]	32	0.150	25
	Промывной буфер [0,15 М NaCl]	32	0.310	23
	Элюирующий буфер [0,5 М NaCl, 0,05 М ФБР, pH 8]	8	0.020	6.25
A/equine/Kostanai/09/2012	Исходная ВАЖ	1024	0.440	100
	Адсорбция на ионобменнике [pH 7,0]	128	0.055	12.50
	Промывной буфер [0,15 М NaCl]	512	0.205	50.00
	Элюирующий буфер [0,5 М NaCl, 0,05 М ФБР, pH 8]	2	0.010	0.19
A/equine/Matybulak/10/2012	Адсорбция на ионобменнике [pH 7,0]	0	0.265	0
	Промывной буфер [0,15 М NaCl]	2	0.095	1.56
	Элюирующий буфер [0,5 М NaCl, 0,05 М ФБР, pH 8]	128	0.030	100

Показано, что выход вируса по гемагглютинирующей активности для штамма *A/equine/Baizak/09/2012* составляет 100 %, тогда как для штаммов *A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* значения были ниже 7 %.

Установленная разница по ГАА, после очистки методом ионообменной хроматографии является примером штаммовых различий антигенной активности в популяции ВГЛ.

Очищенные вирусные суспензии анализировали электрофорезом в ПААГ (рисунок 14).



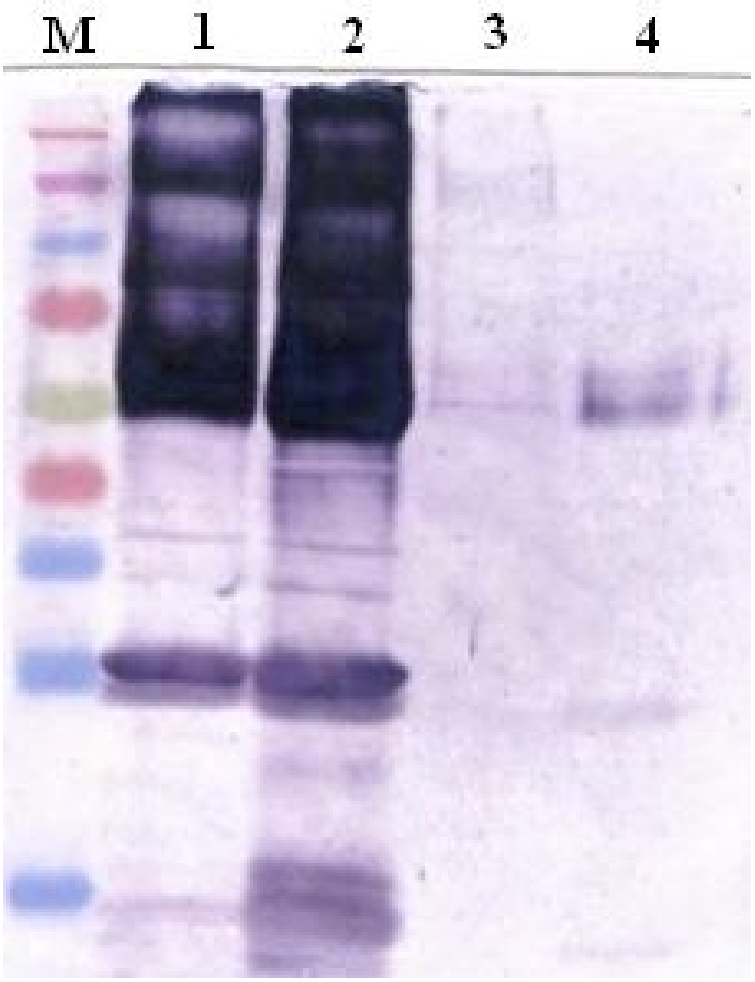
M - маркер молекулярных масс, 1 - очищенный препарат штамм *A/equine/Baizak/09/2012*,
2 - очищенный препарат штамм *A/equine/Kostanai/09/2012*,
3- очищенный препарат штамм *A/equine/Matybulak/10/2012*

Рисунок 14 – Полипептидный состав вируссодержащих суспензий

При установленных параметрах метода хроматографии полная адсорбция вируса наблюдается у штамма *A/equine/Baizak/09/2012*. Два штамма *A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* практическии не адсорбировались на ДЕАЕ-целлюлозе и это говорит о штаммовых особенностях вируса.

По полученным результатам, следует сделать вывод, что очистка вируссодержащих суспензий методом ионообменной хроматографии позволяет получить вирусный препарат с более высокой степенью чистоты, в сравнении с очисткой вируса методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы, что имеет большую значимость при производстве вакцины.

Антигенную активность выделенных препаратов гемагглютинина и нейраминидазы проверяли методом вестерн блота со специфическими сыворотками к вирусу гриппа *A/equine/Baizak/09/2012* (рисунок 15).



М – маркер, *Spectra, Fermentas*; 1 – исходный вирус; 2 – надосадок после центрифугирования, 3 – фракция НА, 4 – фракция NA

Рисунок 15 – Иммуноблотинг белков вируса гриппа лошадей штамма *A/equine/Baizak/09/2012*(H3N8)

На рисунке 15 видно, что антитела специфически взаимодействуют как с белками цельного вируса, так и с выделенными фракциями нейраминидазы и гемагглютинина, что подтверждает сохранение антигенных свойств поверхностных белков в процессе их выделения. Выделенные белковые компоненты вируса могут быть использованы в качестве антигенов в серологических реакциях.

Исследованные штаммы ВГЛ содержат вирионы удлиненной и округлой формы, размером от 80 нм до 200 нм и более. В популяции ВГЛ также встречались вирионы овальной, грушевидной, булавовидной, гантелевидной, нитевидной и неправильной формы частицы.

Около 67 % популяции изучаемых штаммов ВГЛ составляли частицы диаметром 100-170 нм (таблица 17).

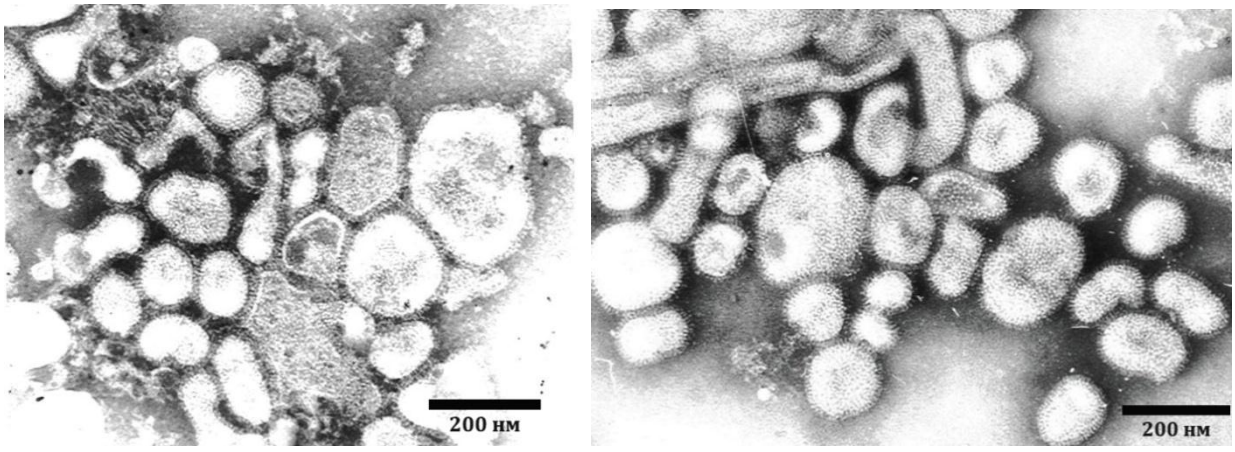
Таблица 17 – Морфология вирионов в популяции вирусов гриппа лошадей

Форма	Количество вирионов		
	A/equine/Baizak/09/ 2012	*A/equine/Kostanai/09/ 2012*	*A/equine/Matybulak/10/ 2012*
округлые	186	153	146
овальные	120	174	153
грушевидные	2	6	0
булавовидные	5	2	1
гантелевидные	4	4	0
нитевидные	54	8	0
звездчатые	0	4	1
неправильной формы	0	18	0
Всего:	371	369	301

Для каждого штамма было проанализировано более 300 вирионов, где преобладали частицы округлой и овальной формы.

Для сравнения был использован эпизоотический штамм *А/крачка/Южная Африка/61(H5N3)* вируса гриппа птиц. Данный штамм вируса гриппа птиц имеет внешнюю оболочку толщиной 10-18 нм, поверхностные шипики высотой 5-7 нм, содержит частицы округлой формы 91,3 % и удлиненной формы 8,66 % размером от 60 нм до 200 нм [165]. Кроме того, встречаются вирионы нитевидной формы, длина которых варьирует в широких пределах. Штаммы ВГЛ по морфометрическим параметрам практически идентичны эпизоотическому штамму *А/крачка/Южная Африка/61(H5N3)* вируса гриппа птиц.

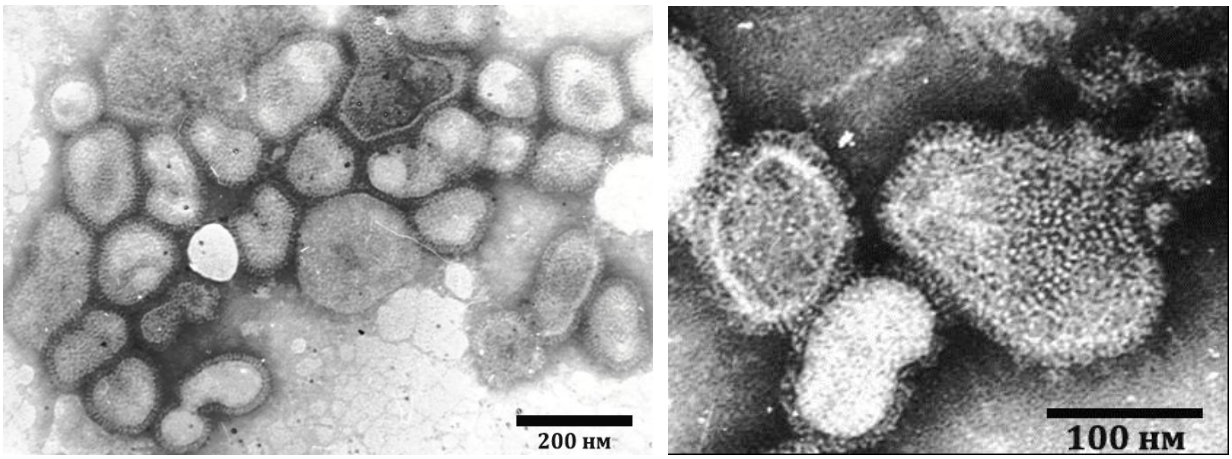
Поверхность вирусных частиц покрыта шипами высотой 6-8 нм. Толщина оболочки вирионов штаммов ВГЛ составила 8,5 - 9 нм (рисунок 16).



А Б

А - штамм*A/equine/Baizak/09/2012*, Б - штамм*A/equine/Kostanai/09/2012* (Ув. ×50000)

Рисунок 16 – Электронная микроскопия очищенных препаратов штаммов вируса гриппа лошадей, лист – 1



В Г

В - штамм*A/equine/Matybulak/10/2012*, Г - штамм *А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3)*

Рисунок 16, лист – 2

На основе полученных данных статистической обработки размеров частиц, построена гистограмма распределения вирионов по размерам в популяции вирионов штаммов ВГЛ. (рисунок 17).

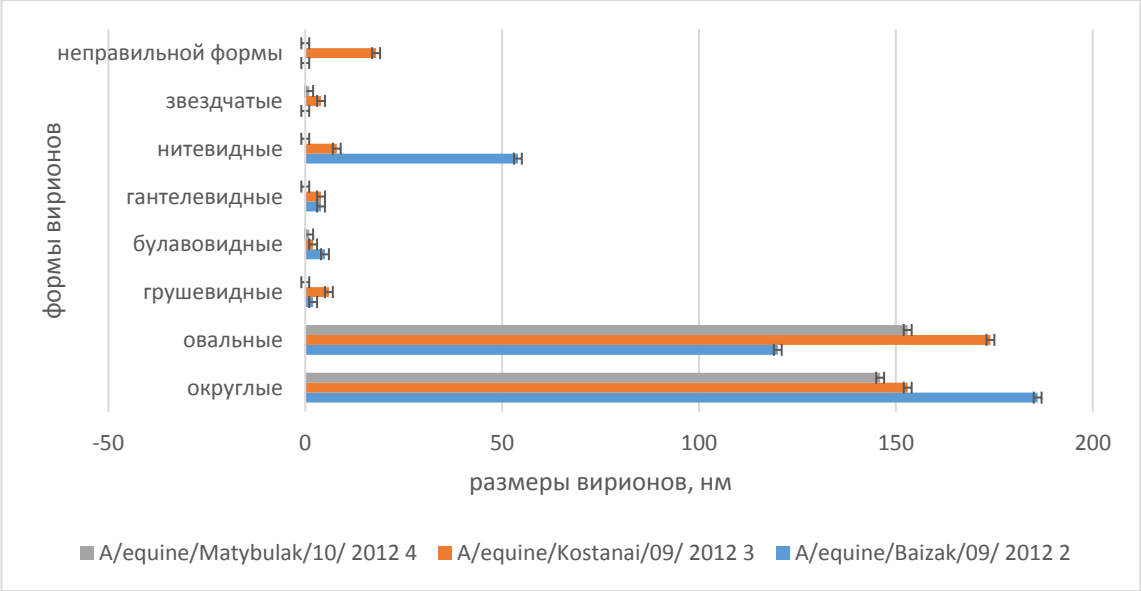


Рисунок 17 – Распределение вирионов вируса гриппа лошадей по форме

При определении в популяциях штаммов однородных групп вирусных частиц подсчитано процентное содержание различных морфологических форм вирионов.

Как видно из таблицы 18, у штаммов *A/equine/Kostanai/09/2012*, *A/equine/Baizak/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012)* ВГЛ преобладают вирионы округлой (47-55 %) и овальной формы (35-53 %). В популяции штамма *A/equine/Matybulak/10/2012* представлены вирионы различной морфологии. В

пределах 3-16 % в популяции штаммов *A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Baizak/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012* встречаются вирионы нитевидной формы, длина которых достигает до 750 нм и более.

Таблица 18 – Формы и размеры вирусных частиц вируса гриппа лошадей

Вирус гриппа лошадей	Округлые		овальные		нитевидные		грушевидные	булавообразные	гантелеобразные	Звездообразные	неправильной формы
	%	размер, нм	%	размер, нм	%	размер, нм	%	%	%	%	%
A/equine/Baizak/09/2012	55	диаметр: 100-250	35	длина: 70-150 ширина: 90-390	16	длина: 250-800	0,6	1,5	1,2	-	-
A/equine/Kostanai/09/2012	47	диаметр: 90-170	53	длина: 70-230 ширина: 150-240	3	длина: 750-1000	1,8	0,6	1,2	1,2	5,5
A/equine/Matybulak/10/2012	47	диаметр: 90-190	50	длина: 110-170 ширина: 150-200	-	-	-	0,3	-	0,3	-

По результатам исследований можно сделать следующее заключение: штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и *A/equine/Matybulak/10/2012 (H3N8)* ВГЛ обладают следующими морфологическими характеристиками:

- размер округлых вирионов составляет 80-200 нм, длина некоторых нитевидных форм вирусных частиц достигает 750 нм и более;
- поверхность вирусных частиц покрыта шипами высотой 6-8 нм;
- вирионы в популяциях исследованных штаммов имеют эллипсоидную, сферическую и нитевидную формы.

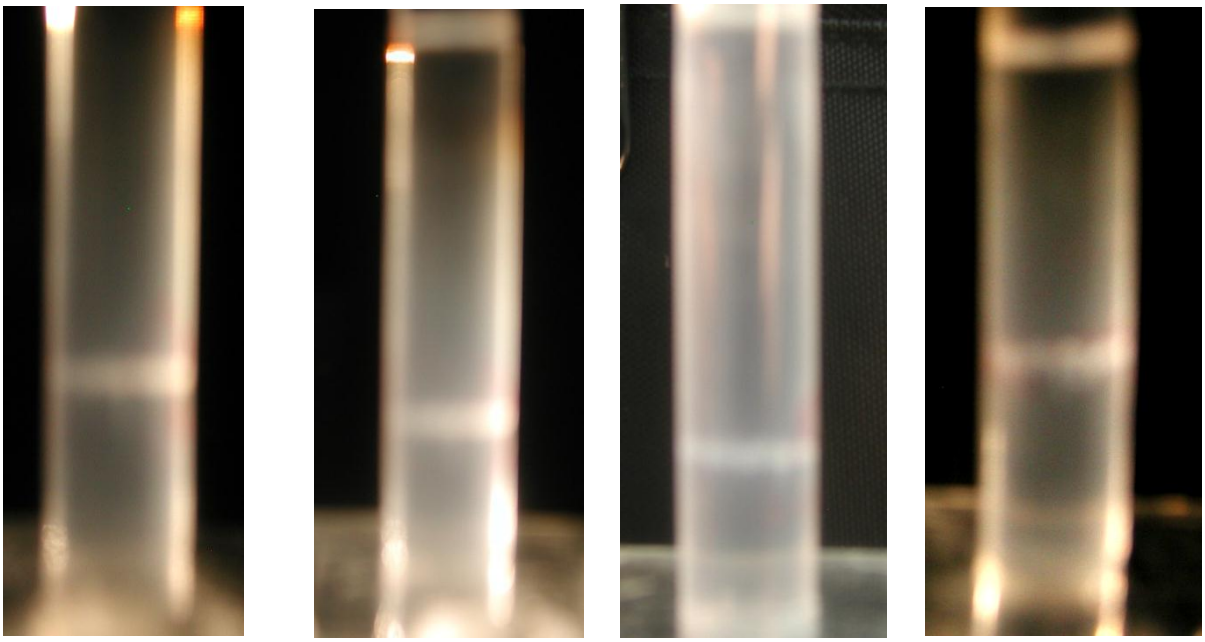
3.4.2 Определение плавучей плотности и константы седиментации вируса гриппа лошадей

Определение плавучей плотности вируса гриппа лошадей имеет большую практическую ценность для постоянного контроля чистоты вирусных

препаратов. Плотностной анализ используется для изучения природной гетерогенности мутантов. Также, согласно величине плавучей плотности, можно дифференциировать инфекционные частицы от неинфекционных, если потеря инфекционности связана с утратой части нуклеиновой кислоты или белка, а также других компонентов, например, липидов [166].

Плотностной анализ чистых препаратов ВГЛ проводили с использованием изопикнического (равновесного) центрифугирования в преформированных градиентах хлористого цезия по общепринятым методикам [167]. Центрифугирование выполняли на ультрацентрифуге *Optima L - 90K* фирмы Becman с использованием подвесного ротора SW-50. В качестве образца сравнения использовали очищенный вирус гриппа птиц, штамм *А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3)*.

Вирусы при изопикническом центрифугировании распределяются равномерно на весь объем раствора *CsCI*. Со временем все частицы оседают в области, соответствующие их собственной плавучей плотности. Когда устанавливается равновесие, центрифугирование завершают. Результаты изопикнического центрифугирования штаммов вируса гриппа лошадей представлены на рисунке 18.



А Б В Г

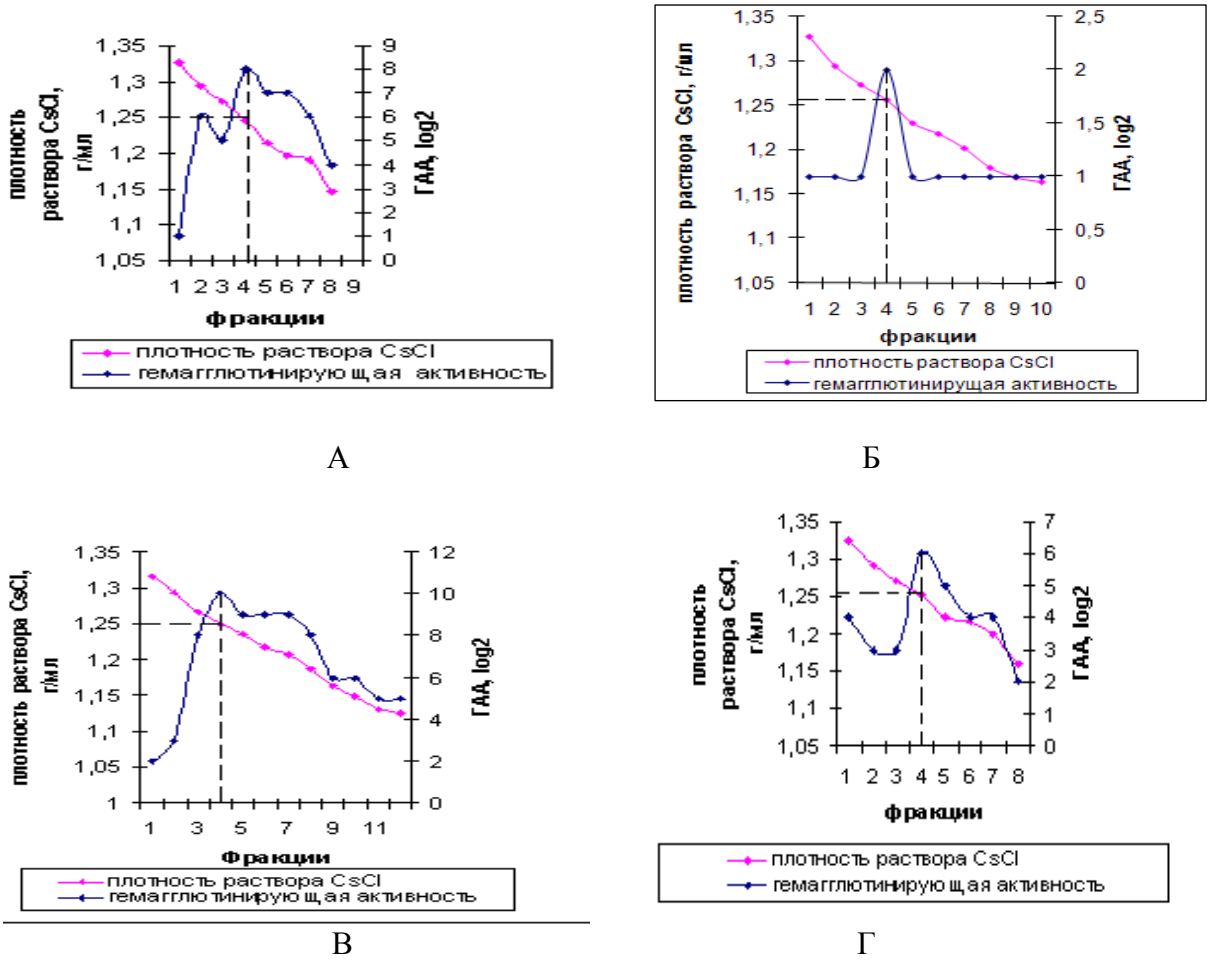
А - *А/крачка/ЮА/61(H5N3)* ВГП, Б - *A/equine/Baizak/09/2012 (H3N8)*, В - *A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8)*, Г - *A/equine/Matybulak/10/2012 (H3N8)*

Рисунок 18 – Опалесценция вируса после изопикнического центрифугирования в растворе хлористого цезия штаммов вирусов гриппа птиц и гриппа лошадей

Плавучую плотность фракции измеряли, с использованием таблицы перехода от показателя преломления к плотности. Полученную фракцию

анализировали с помощью рефрактометра [168]. По полученным данным строили графики (рисунки 13-16).

При центрифугировании штамма *А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3)* вируса гриппа птиц в градиенте хлористого цезия установлена плотностная гетерогенность вирионов в очищенном препарате. Вирусные частицы распределились в зоне градиента от 1,25 до 1,27 г/см^3. Пик проявления вирусной активности соответствовал величине 1,252 г/см^3 (рисунок 19).



А - *А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3);* Б - *A/equine/Baizak/09/2012 (H3N8);* В - *A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8);*
Г - *A/equine/Matybulak/10/2012 (H3N8)*

Рисунок 19 – Плотностная характеристика вируса гриппа. Равновесное центрифугирование в градиенте *CsCl*

Центрифугированием штамма *A/equine/Baizak/09/2012* в градиенте хлористого цезия удалось сконцентрировать вирус в пределах плотности 1,25-1,27 г/см^3, пик проявления вирусной активности приходился на величину 1,26 г/см^3. Для штамма *A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8)* в градиенте хлористого цезия вирус сконцентрировали также в пределах плотности 1,25-1,27 г/см^3, однако, пик проявления вирусной активности приходился на величину 1,25 г/см^3.

При определении плотностной характеристики штамма *A/equine/Matybulak/10/2012 (H3N8)* ВГЛ в градиенте хлористого цезия вирус сконцентрировали в пределах плотности 1,25-1,27 г/см^3, пик проявления вирусной активности приходился на величину - 1,26 г/см^3.

Определенная величина плавучей плотности ВГЛ характерна и для других представителей ортомиксовирусов. В результате проведенных экспериментов в градиенте плотности хлористого цезия было установлено, что вирионы гриппа лошадей имеют плавучую плотность в пределах 1,25-1,27 г/см^3 [169].

Постоянная седиментация частиц в поле центробежной силы является одним из важных физических характеристик биологических объектов, и зависит от их молекулярной массы. Величина константы седиментации используется для расчета молекулярной массы вирусных частиц.

Значения плавучей плотности и константы седиментации вируса гриппа лошадей и вируса гриппа птиц штамм *А/крачка/ЮА/61 (H_5N_3)* показаны в таблице 19.

Таблица 19 – Показатели физических констант эпизоотического штамма *А/крачка/ЮА/61 (H_5N_3)* и очищенных препаратов ВГЛ

Наименование вируса	Физические константы	
	Плавучая плотность *р,* г/см^3	Константа седиментации S
А/крачка/ЮА/61 (H_5N_3)	1,252	712,0±8,6
A/equine/Baizak/09/2012	1,260	778,0±11,8
A/equine/Kostanai/09/2012	1,250	737,0±2,4
A/equine/Matybulak/10/2012	1,258 по лит. данным - 1,21	714,0±9,8 по лит. данным-750 [171]

Рассчитанное для вируса гриппа птиц среднее значение константы седиментации составила от 700 до 800 единиц Сведберга. Данная величина соответствует значениям константы седиментации других видов семейства ортомиксовирусов. Таким образом, вирус гриппа свиней седиментирует при 727 S [172].

3.4.3 Влияние физико-химических факторов

Вирус гриппа в окружающей среде подвергается воздействию различных физических факторов, таких как высокая температура, кислотность среды, воздействие УФ-лучей и др. В этой связи, определение влияния некоторых из этих факторов, стало предметом нашего изучения. Полученные данные по устойчивости вируса гриппа к физическим факторам могут быть использованы при дезинфекции, а также разработке средств и методов инактивации вируса.

Влияние pH среды на нейраминидазную и гемагглютинирующую активности вируса гриппа представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Значения нейраминидазной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа, штамм *A/equine/Baizak/09/2012 (H3N8)* при различных показателях pH, (n=3)

pH	Нейраминидазная активность	Активность гемагглютининов*
6,0 - 6,2	0,499 ± 0,013	1:128
7,0 - 7,2	0,582 ± 0,009	1:256
8,0 - 8,2	0,810 ± 0,008	1:512
Контроль (физ. раствор)	0	0
Примечание - «*» - Обратное значение активности гемагглютининов		

Установлено, что при щелочных значениях pH нейраминидазная и гемагглютинирующая активности вируса повышаются.

Инкубация вируса при повышенных температурных режимах приводила к незначительному снижению нейраминидазной активности (таблица 21).

Таблица 21 – Значения гемагглютинирующей активности вируса гриппа штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) при воздействии высоких температур.

Температура, °С	Активность гемагглютининов*			Нейраминидазная активность		
	5 мин	30 мин	60 мин	5 мин	30 мин	60 мин
30	1:1024	1:512	1:512	0,696 ± 0,098	0,529 ± 0,010	0,485 ± 0,012
37	1:1024	1:512	1:128	0,730 ± 0,086	0,625 ± 0,099	0,526 ± 0,011
56	1:512	1:256	1:128	0,593 ± 0,009	0,549 ± 0,010	0,479 ± 0,016
Контроль	256			0,735		
Примечание - «*» - Обратное значение активности гемагглютининов						

Следует отметить, что даже прогревание при 56 °С в течение 1 часа не приводило к полной инактивации нейраминидазы вируса. Таким образом, нейраминидазная и гемагглютинирующая активности вируса гриппа повышаются в щелочной среде.

Вирус гриппа содержит в своем составе белки, углеводы и липиды. Важной задачей является определение роли данных компонентов в сохранении структуры вируса и антигенной активности поверхностных белков.

Для выяснения роли этих компонентов, как правило, используют обработку вируса веществами, вызывающими их гидролиз или растворение. Для разрушения углеводов – воздействие глюкооксидазами, для удаления липидов используют органические растворители и липолитические ферменты, а для разрушения белков – обработку протеазами. После обработки указанными реагентами определяют нейраминидазную и гемагглютинирующую активность

[173]. Однако, учитывая, что обработка каким-либо реагентом может не только удалить определенный компонент вируса, но и повлечь за собой конформационные изменения комплекса других структур вириона, данный прием не всегда позволяет сделать правильное заключение [174].

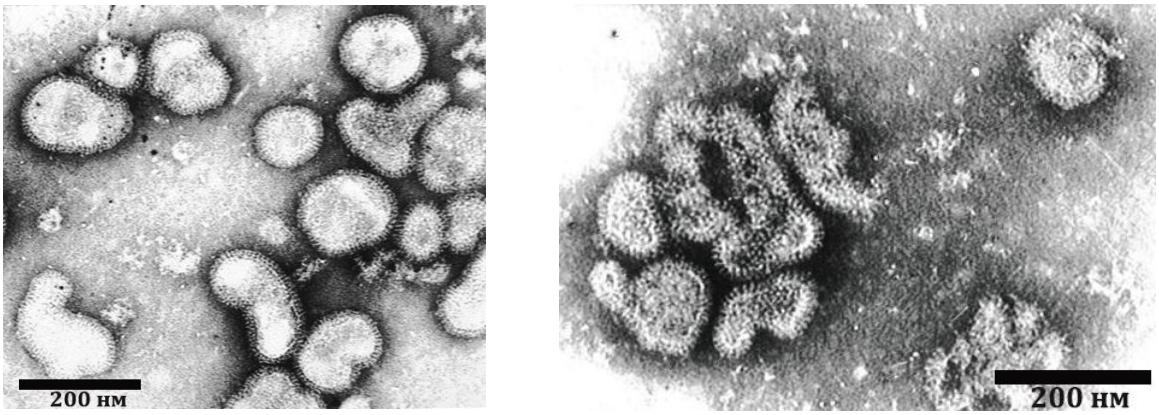
Результаты исследования влияния липидных растворителей на нейраминидазную и гемагглютинирующую активность и структуру вируса гриппа представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Значения нейраминидазной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) под действием липидных растворителей (n=3)

Реагент	Активность гемагглютининов*		% инактивации	Нейраминидазная активность		% инактивации
	до обработки	после обработки		до обработки	после обработки	
Хлороформ-метанол (2:1)	1:256	0	100	0,702 ± 0,091	0,004 ± 0,018	99,44
Фреон 113	1:256	1:128	50	0,702 ± 0,087	0,682 ± 0,096	3,04
Эфир	1:256	1:128	50	0,702 ± 0,094	0,038 ± 0,008	94,57
Примечание - «*» - Обратное значение активности гемагглютининов						

Представленные в этой таблице данные свидетельствуют о практически полной инактивации поверхностных белков вируса после экстракции липидов смесью хлороформ-метанол (2:1). В меньшей степени снижают активность гемагглютинина фреон-113 и эфир. Однако нейраминидазная активность сохраняется на прежнем уровне только при обработке фреоном-113.

Результаты электронной микроскопии препаратов вируса гриппа лошадей показали распад вирионов, разрыхление оболочки, удаление с наружной мембраны шипов гемагглютинина и нейраминидазы (рисунок 20 Б). В популяции необработанного вируса наблюдались вирионы без видимых нарушений структуры (рисунок 20 А).



А – необработанный образец вируса; Б – вирус, обработанный фреоном – 113

Рисунок 20 – Вирус гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) после обработки липидными растворителями

Для определения воздействия на ВГЛ протеаз, исследуемые штаммы обрабатывали трипсином и проназой.

Результаты влияния протеаз на ВГЛ, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Воздействие протеолитических ферментов на гемагглютинирующую и нейраминидазную активность поверхностных белков ВГЛ, штамм *A/equine/Baizak/09/2012 (H3N8)*

Фермент	Концентрация фермента, мг/см^3	Активность гемагглютининов*		% инактивации	Нейраминидазная активность		% инактивации
		до обработки	после обработки		До обработки	После обработки	
Трипсин	2	1:256	1:64	75	0,834 ± 0,063	0,699 ± 0,095	16
	1	1:256	1:32	87	0,834 ± 0,075	0,809 ± 0,081	3
Проназа	0,1	1:256	1:64	75	0,834 ± 0,068	0,545 ± 0,101	35
	0,05	1:256	1:64	75	0,834 ± 0,071	0,746 ± 0,087	11
Примечание - «*» - Обратное значение активности гемагглютининов							

Установлено, что обработка вируса трипсином и проназой приводит к существенной инактивации гемагглютинина, в то время как нейраминидазная активность спадает в меньшей степени. Некоторые вирусные частицы находились на стадии частичного или полного распада (рисунок 21).

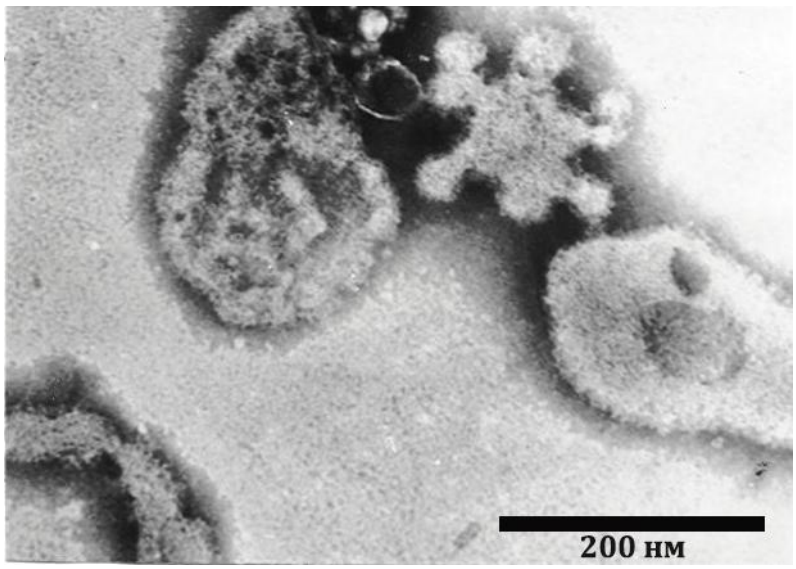


Рисунок 21 – Электронная микроскопия вируса гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) после обработки трипсином (Ув.100000х)

При электронно-микроскопическом исследовании образцов ВГЛ, обработанных протеазами, было установлено, что под действием ферментов в популяции большая часть вирусных частиц имели выраженные признаки разрыхления оболочки с незначительным удалением поверхностных шипов.

При обработке вируса 80 % раствором этанола отмечена полная инактивация как нейраминидазной, так и гемагглютинирующей активности вируса гриппа лошадей.

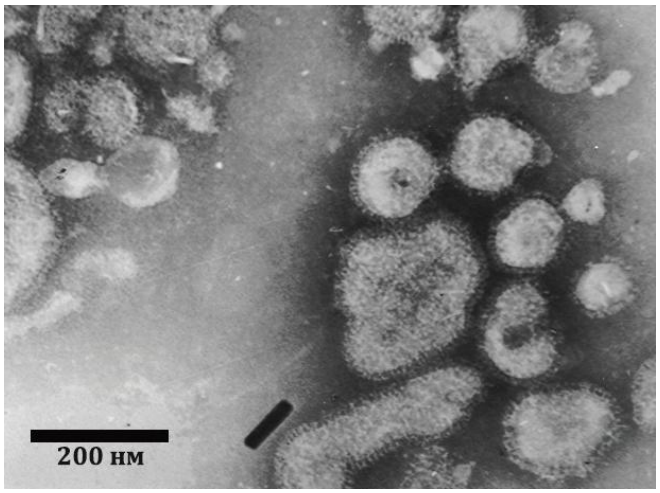
По результатам исследований, представленные в данном разделе, было установлено, что после отделения липидов следует разрушение вирионов, сопровождаемое практически полной инактивацией вируса. Таким образом определено, что смесь хлороформ-метанол (2:1) вызывает денатурацию поверхностных белков и полностью разрушает вирусные частицы. Однако по данным *Eckert E.* гемагглютинин, выделенный смесью хлороформ-метанол, теряет гемагглютинирующую активность, но остается иммуногенным, т.е. при введении в организм животных вызывает выработку антигемагглютинирующих антител [175].

При воздействии на вирус протеолитических ферментов отмечено понижение нейраминидазной и гемагглютинирующей активности при использовании низких концентраций.

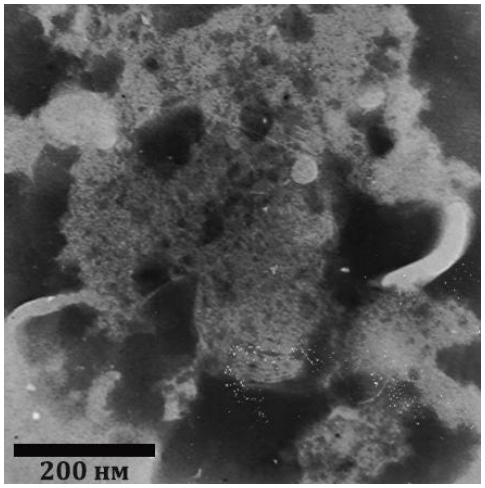
Для выделения отдельных структурных компонентов вируса гриппа используют различные детергенты. Важно было выяснить степень воздействия некоторых из них на нейраминидазную и гемагглютинирующую активности и структуру вируса гриппа.

Результаты исследований по определению разрушающего действия детергентов на вирус гриппа лошадей приведены в таблице 24, на рисунке 22.

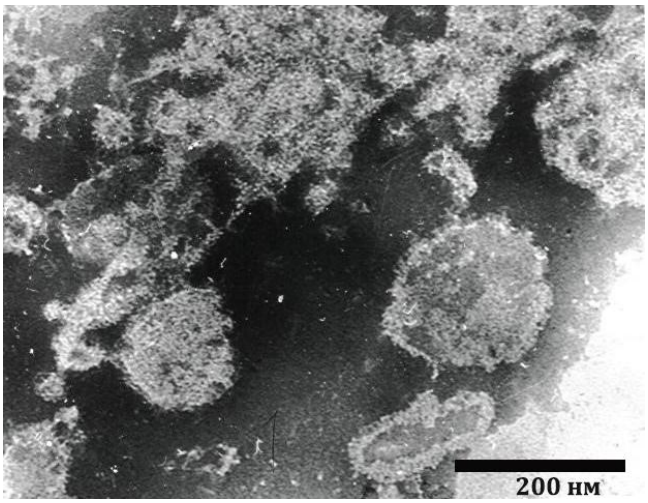
Несмотря на то, что вирусные частицы под действием детергентов теряют целостность (рисунок 22), поверхностные антигенные белки сохраняют свою активность.



А



Б



В

А – контрольный образец вируса, Б – образец вируса, обработанный ДСН, В – образец вируса, обработанный твином-20

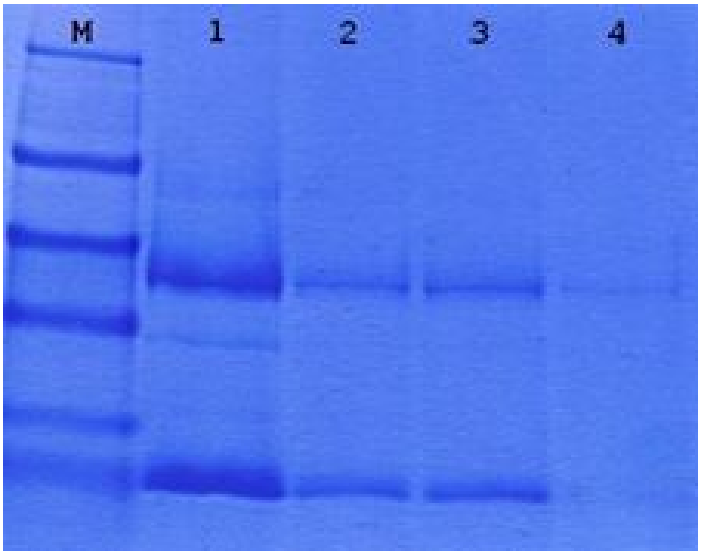
Рисунок 22 – Электронная микроскопия вируса гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012 (*H3N8) после обработки детергентами

Электронно микроскопический анализ образцов после обработки ионным детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН), показал глубокую дезинтеграцию структуры вириона с последующим выходом рибонуклеопротеида (РНП) (рисунок 22 Б). Тогда как, при обработке вируса твином-20 было установлено активное удаление шипов с поверхностной мембраны, также частичный или полный распад вирионов (рисунок 22 В). В отдельных, необработанных препаратах были обнаружены вирионы без признаков дезинтеграции (рисунок 22 А). При обработке ВГЛ детергентом тритон Х-100 был выявлен аналогичный результат, как и при воздействии твина-20. Активность антигенов представлена в таблице 24.

Таблица 24 – Нейраминидазная и гемагглютинирующая активности вируса гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) под действием детергентов (n=3)

Детергент	Активность гемагглютининов*		% инактивации	Нейраминидазная активность ($ОП_{540}$)		% инактивации
	до обработки	после обработки		до обработки	после обработки	
ДСН	1:256	1:64	75	0,744 ± 0,045	0,538 ± 0,066	28
Тритон Х-100	1:256	1:256	0	0,744 ± 0,033	0,617 ± 0,053	17
Твин-20	1:256	1:128	50	0,744 ± 0,041	0,570 ± 0,075	23
Примечание - «*» - Обратное значение активности гемагглютининов; $ОП_{540}$ – оптическая плотность, которое при значении в диапазоне 0,485-0,830 свидетельствует о наличии нейраминидазной активности.						

Степень дезинтеграции вирусных частиц ВГЛ при обработке детергентами, зависит от активности самого реагента, что подтверждается интенсивностью полос в электрофорезе (рисунок 23).



M – маркер, BioLabs; 1 – вирус гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8); 2 – вирус после обработки ДСН; 3 – вирус после обработки твином-20; 4 – вирус после обработки тритоном Х-100

Рисунок 23 – Полипептиды вируса гриппа лошадей, штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) после обработки детергентами

Высокая нейраминидазная и гемагглютинирующая активность с сохранением структуры вируса, как известно, является важным фактором при разработке вакцин. Для определения роли этих компонентов применяют обработку вируса веществами, вызывающими их растворение, гидролиз и удаления липидов.

В результате установлено, что при щелочных значениях pH нейраминидазная и гемагглютинирующая активности вируса повышаются, а инкубация вируса при повышенных температурных режимах приводит к незначительному снижению нейраминидазной активности.

Определено, что экстракция липидов смесью хлороформ-метанол (2:1) приводит к практически полной инактивации поверхностных белков вируса. Тогда как фреон-113 и эфир в меньшей степени снижают активность гемагглютинина. Однако, при обработке фреоном-113, нейраминидазная активность сохраняется на прежнем уровне.

Обработка вируса трипсином и проназой приводит к инактивации гемагглютинина, в то время как нейраминидазная активность спадает в меньшей степени.

Детергент додецилсульфат натрия (ДСН) после обработки полностью разрушает вирионы и способствует выходу рибонуклеопротеида (РНП) во внешнюю среду. Обработка вируса твином-20 приводит к активному удалению шипов с поверхностной мембраны, также частичный или полный распад вирионов. При воздействии на ВГЛ тритона Х-100 установлен аналогичный результат, как при воздействии твина-20.

3.5 Секвенирование нуклеотидной последовательности штаммов вируса гриппа лошадей и проведение филогенетического анализа

Для наработки генов НА и NA были подобраны по три пары праймеров соответственно. Праймеры с установленными параметрами и последовательностями представлены в таблице 25 [176].

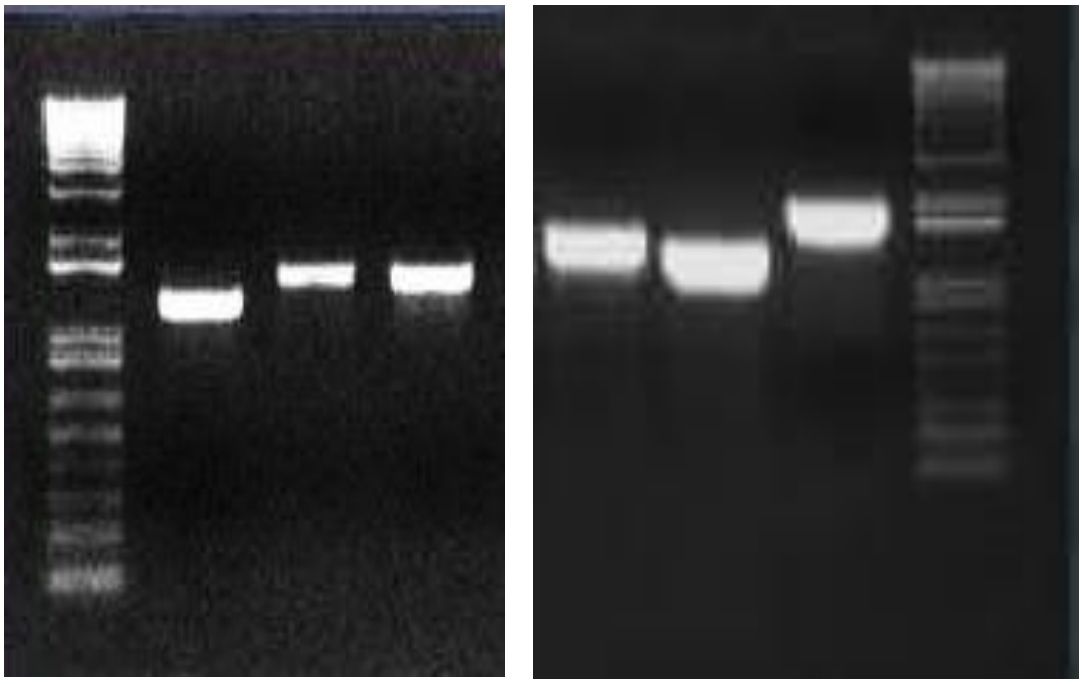
Таблица 25 – Праймеры для наработки генов НА и NA вируса ГЛ

Название	Последовательность (5'->3')	Длина	Начало	Конец	Температура плавления	Содержание GC%	Комплементарность 5'	Комплементарность 3'
1	2	3	4	5	6	7	8	9
F_HA-1	GGCCTACAGACAAAACCCAA	20	45	64	58.01	50.00	4.00	0.00
R_HA1	CAGAGCTTATCCCTGTTTTCA	21	850	830	56.64	42.86	4.00	1.00
F_HA2	CCAGAGTTCAAATCAAGAGC	20	603	622	56.81	50.00	5.00	2.00

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4	5	6	7	8	9
R_HA2	ATTTCCTAGAGCCACCAGCA	20	1350	1331	56.82	45.00	6.00	3.00
F_HA3	TCAGACGAATCTTTGGAGCAA	21	1034	1054	56.92	42.86	3.00	3.00
R_HA3	TCTGCTGTTGCCTTTTTGGC	20	1686	1667	57.18	45.00	3.00	2.00
F_NA1	AGCCAGGTTTGAATCGGTGG	20	48	67	57.60	50.00	4.00	0.00
R_NA1	TCAGTTCCTTGTCCAAACCC	20	608	589	57.75	50.00	4.00	0.00
F_NA2	CTTTTTCCTCACACAGGTCT	20	387	406	58.01	50.00	3.00	2.00
R_NA2	CTCTCCCGTAGGAGTGTCAG	20	981	962	57.93	60.00	6.00	2.00
F_NA3	AAGTTTGAATGGGGGACACA	20	801	820	57.23	45.00	3.00	1.00
R_NA3	GAAGAGTAGCTCCATCGTGCC	21	1390	1370	58.86	52.38	4.00	2.00

Результаты амплификации генов представлены в виде электрофоретических снимков ампликонов на рисунке 24.



HA NA

Рисунок 24 – Электрофоретический анализ ПЦР, генов HA и NA ВГЛ

На рисунке 27 представлено филогенетическое древо, сформированное на основе нуклеотидной последовательности гена гемагглютинина.

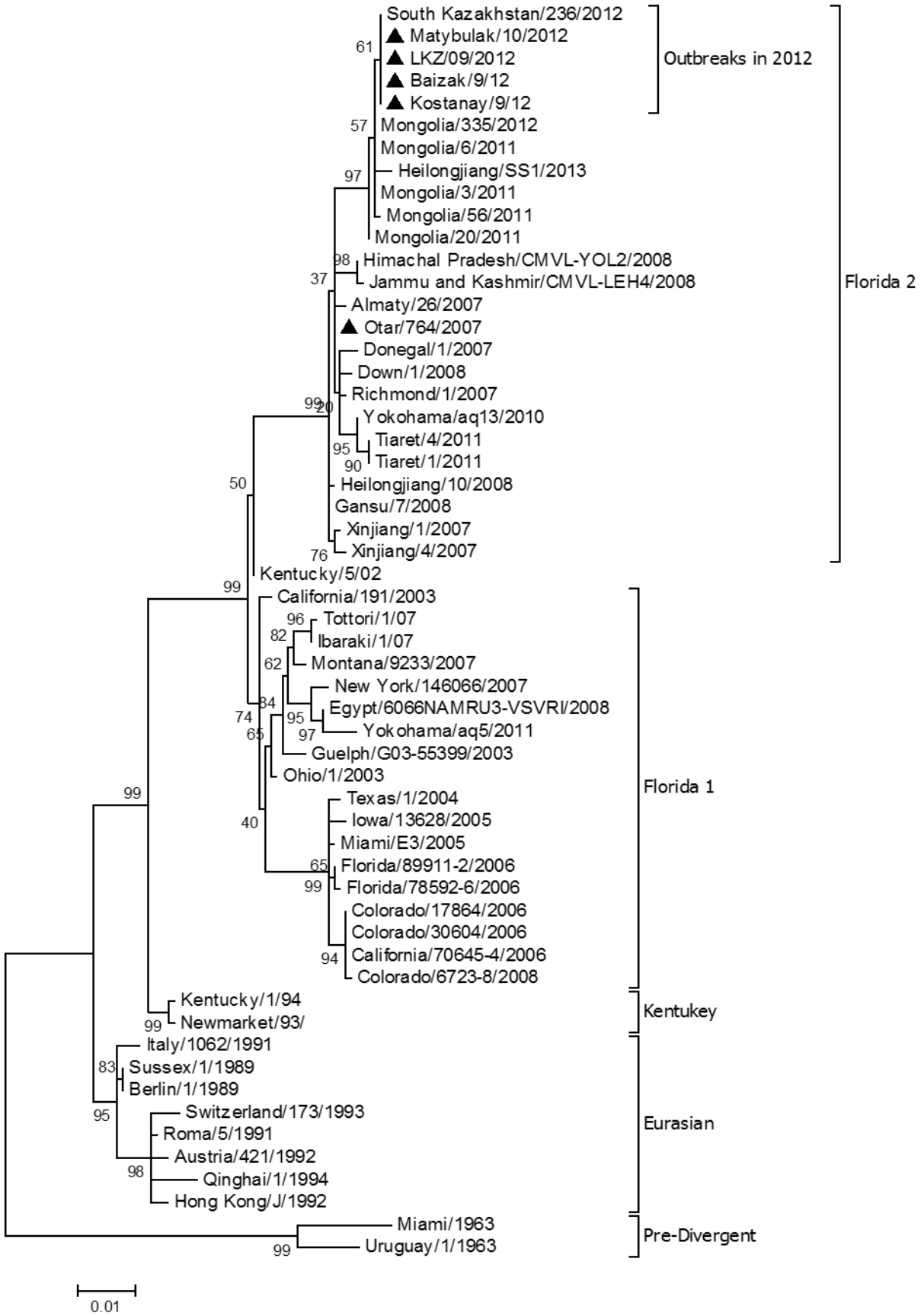


Рисунок 25 – Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей НА

Все полученные последовательности размещены в Генбанке (GenBank). В таблице 26 представлены номера доступа полного генома штаммов ВГЛ.

Таблица 26 – Номера доступа генов в базе Генбанк

Strain	Access numbers by genes in GenBank[a]							
	PB2	PB1	PA	HA	M	NP	NA	NS
A/equine/Kostanay/ 09/2012	MH173056	MH173057	MH173058	KP202380	KP202384	MH173059	KP202376	KP202388
A/equine/LKZ/ 09 /2012	MH173319	MH173320	MH173321	KP202378	KP202382	MH173322	KP202374	KP202386
Примечание - [a]PB2, полимеразный комплекс 2; PB1, полимеразный комплекс; PA, полимераза; HA, гемагглютинин; M, матриксный белок; NP, нуклеопротеин; NA, нейраминидаза; NS, неструктурный белок.								

В результате были получены последовательности некоторых генов штаммов A*/equine/Matybulak/10/2012 и A/equine/Baizak/09/2012*, а также последовательности полного генома штаммов A/equine/Kostanai/09/2012 и *A/equine/LKZ/09/2012*.

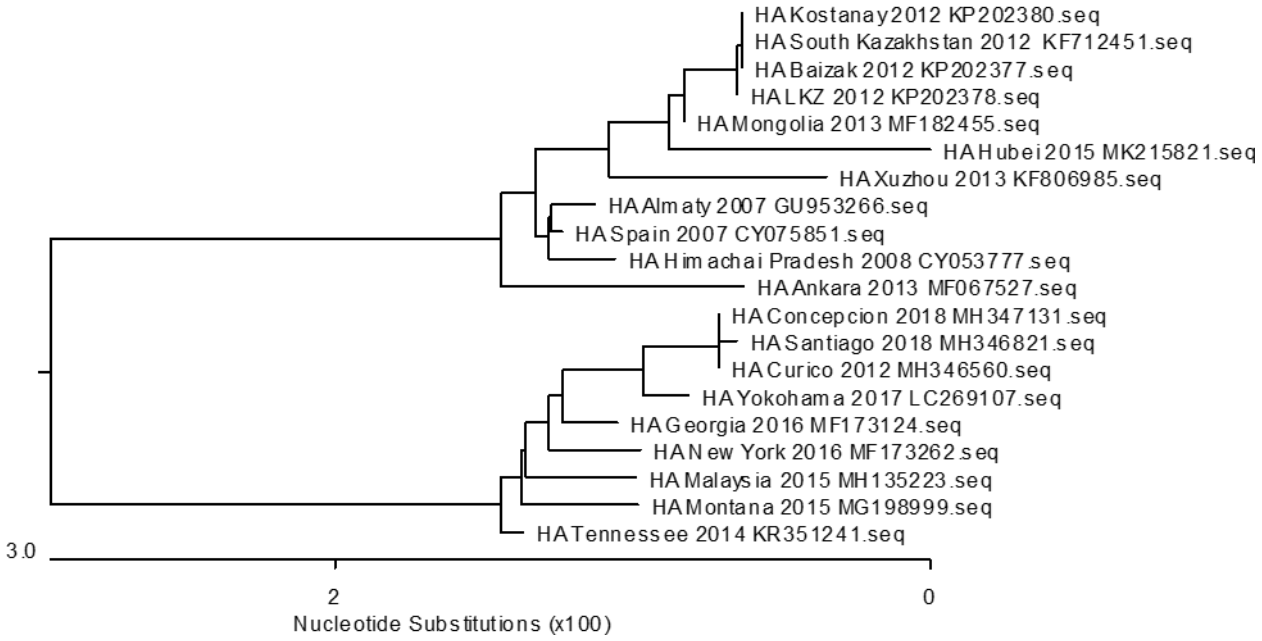


Рисунок 26 – Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей HA согласно генетической принадлежности

По результатам филогенетического анализа было определено, что штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* (H3N8) относятся к Американской линии семейству Флорида-2 вирусов гриппа лошадей [177].

При детальном анализе последовательности гена гемагглютинина штаммов вируса гриппа лошадей, выделенных в разных регионах мира, были выявлены ряд позиций, которые характерны только для Азиатского региона (таблица 27).

Таблица 27 – Аминокислотные вариации в гене НА

Место выделения	Позиция на гене							
	45	63	73	287	291	304	387	394
A/equine/Baizak/09/2012	S	M	I	V	I	S	T	E
A/equine/Kostanai/09/2012	T	T	V	A	T	P	A	G
Азия	S,T	M,I,T	I,V	V,A	I,T	S,P	T,A	E,G
Европа	T	I,M	I,V	V,A	I,T	S,P	A	G
Сев. Америка	S,T	M,I,T	I,V	V,A	I,T,A	S,P	A	G
Южная Америка	T	I,T	I,V	A	I,T	P	A	G

Установлено, что различия аминокислот в позиции 387 и 394 могут служить для определения вирусов гриппа лошадей, выделенных в 2012 году в отдельную филогенетическую ветвь.

При секвенировании гена нейраминидазы штаммов ВГЛ 2012 года был получен продукт размером 1400 нуклеотидных оснований, кодирующих одну открытую рамку считывания размером 470 аминокислотных остатков.

В результате сравнения полученной нуклеотидной последовательности с данными международной базы данных GenBank было определено, что наиболее близкими к штамму *A/equine/Baizak/09/2012*(H3N8) являются штаммы, выделенные в 2007-2008 гг. в Китае и Монголии (рисунок 27).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU794497.1	Influenza A virus (A/equine/Gansu/7/2008(H3N8)) segment 6 neuramir	2508	2508	99%	0.0	100%
EU794545.1	Influenza A virus (A/equine/Xinjiang/1/2007(H3N8)) segment 6 neuram	2503	2503	99%	0.0	99%
GU571145.1	Influenza A virus (A/equine/Huabei/1/2007(H3N8)) segment 6 neuramii	2497	2497	99%	0.0	99%
EU794513.1	Influenza A virus (A/equine/Heilongjiang/10/2008(H3N8)) segment 6 ne	2497	2497	99%	0.0	99%
EU794529.1	Influenza A virus (A/equine/Inner Mongolia/8/2008(H3N8)) segment 6 r	2497	2497	99%	0.0	99%
EU794505.1	Influenza A virus (A/equine/Hubei/6/2008(H3N8)) segment 6 neuramini	2492	2492	99%	0.0	99%
EU794553.1	Influenza A virus (A/equine/Xinjiang/2/2007(H3N8)) segment 6 neuram	2492	2492	99%	0.0	99%
EU794521.1	Influenza A virus (A/equine/Liaoning/9/2008(H3N8)) segment 6 neuram	2486	2486	99%	0.0	99%
EU794577.1	Influenza A virus (A/donkey/Xinjiang/5/2007(H3N8)) segment 6 neuran	2486	2486	99%	0.0	99%
EU794561.1	Influenza A virus (A/equine/Xinjiang/3/2007(H3N8)) segment 6 neuram	2475	2475	99%	0.0	99%
FJ375224.1	Influenza A virus (A/equine/Newmarket/5/2003(H3N8)) segment 6 neur	2459	2459	99%	0.0	99%
EU794569.1	Influenza A virus (A/equine/Xinjiang/4/2007(H3N8)) segment 6 neuram	2453	2453	99%	0.0	99%
CY030761.1	Influenza A virus (A/equine/California/8560/2002(H3N8)) segment 6, c	2453	2453	99%	0.0	99%
AY855343.1	Influenza A virus (A/equine/Kentucky/5/02(H3N8)) neuraminidase gene	2447	2447	99%	0.0	99%

Рисунок 27 – Сравнительный анализ гена нейраминидазы

Данные сравнительного анализа аминокислотной последовательности с данными GenBank показали, что штамм *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) на 100% идентичен штамму *A/equine/Gansu/7/2008*, с другими наиболее близкими штаммами имеются аминокислотные замены, так для штаммов

A/equine/Xinjiang/1/2007 и *A/equine/Huabei/1/2007* это замена в положении 218 A (аланин)→E (глютаминовая кислота), вызванная нуклеотидной заменой A653C.

В следующих экспериментах был проведен сравнительный анализ со штаммами в зависимости от эпидемиологической распространенности. Результаты проведенных исследований приведены в таблице 28.

Таблица 28 – Аминокислотные вариации в гене нейраминидазы вируса гриппа лошадей подтипа H3N8

Место выделения	Позиция расположения амиокислоты								
	40	61	66	70	72	78	191	209	235
A/equine/Baizak/09/2012	E	K	H	A	K	P	I	I	N
A/equine/Kostanai/09/2012	R	K	Y	I	E	S	V	V	D
Азия	E,R	K,R	H,Y	A,I,T	K,E,M	P,S	I,V	I,V	N,D
Европа	N	R,K	Y	T,A,K	E,K	S,P	V	V	D,N
Сев. Америка	G,R	R,K	Y	A,I,T	E,K	S,P	V	V	D
Южная Америка	V,G	R	Y	T,I	E	S,L	V	V	D

В результате установлено, что азиатские штаммы имеют уникальные замены в положениях 40, 66, 191 и 209, отсутствующие у штаммов, выделенных в других регионах.

Наиболее близким к штамму *A/equine/Baizak/09/2012* (H3N8) из европейских является штамм *A/equine/Newmarket/5/2003*, а из американских – *A/equine/Kentucky/5/02*.

Для проведения филогенетического анализа было отобрано по 4 штамма из каждого региона. Построение филогенетического проводили с использованием алгоритма "ближайших соседей". Результаты представлены на рисунке 28.

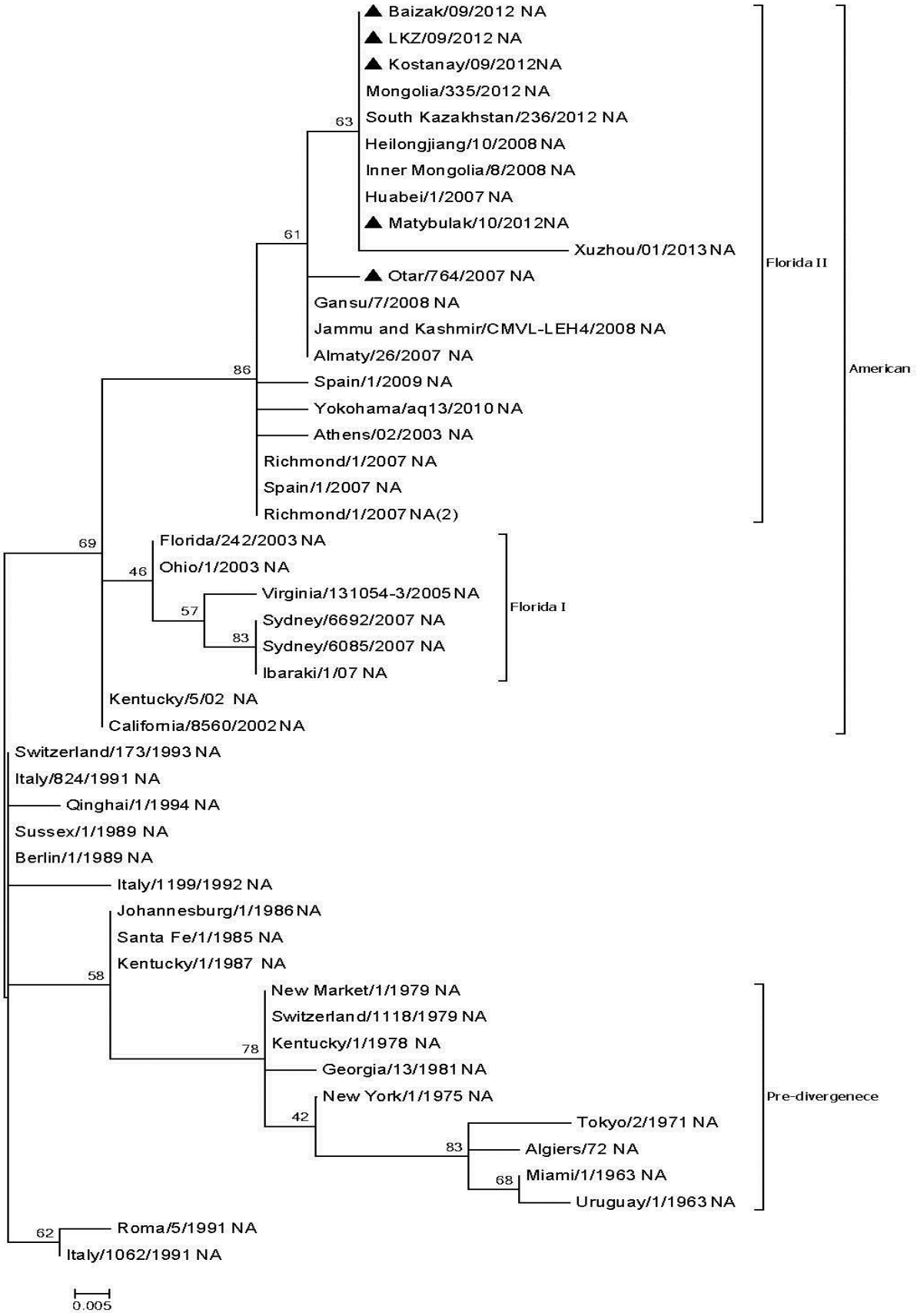


Рисунок 28 – Филогенетический анализ штаммов ВГЛ подтипа H3N8 по аминокислотным последовательностям нейраминидазы

Анализ других генов исследованных вирусов показал, что у них отсутствуют признаки реассортации, рисунок 29.

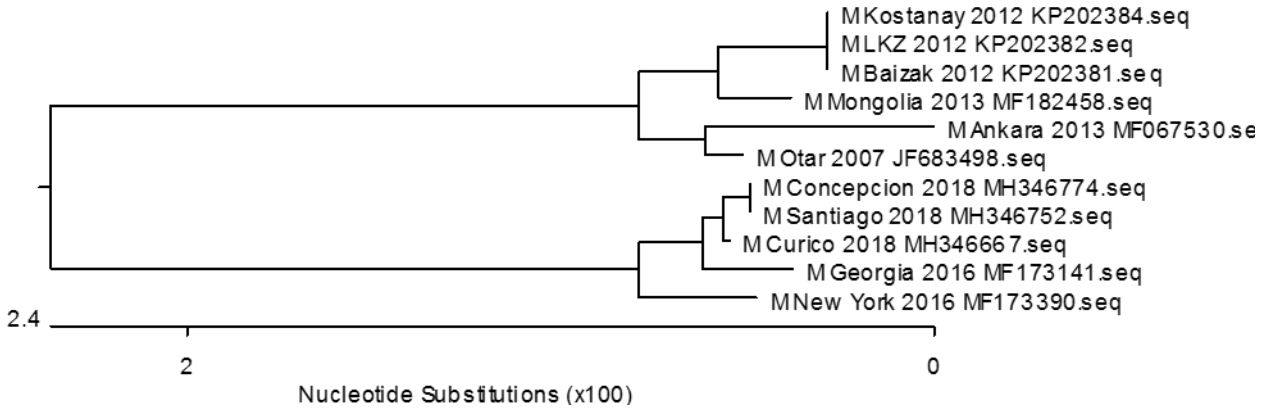


Рисунок 29 – Филогенетический анализ штаммов ВГЛ подтипа H3N8 по аминокислотным последовательностям матриксного белка

Как видно из данных представленных на рисунке 26 и 28, Казахстанские штаммы образуют единую ветвь со штаммами, выделенными в азиатском регионе в 2008 и 2012 гг., однако имеют несколько аминокислотных различий со штаммами, выделенными до 2007 года.

Данный факт подчеркивает сильную изменчивость генома вируса гриппа, в связи с чем требует постоянного проведения мониторинга, а также изучения филогенетических особенностей выделенных штаммов.

3.6 Диагностика и идентификация вируса гриппа лошадей с помощью олигонуклеотидного микрочипа

Высокая чувствительность и специфичность микрочипов при диагностике инфекционных заболеваний, в особенности гриппа, в настоящее время является одним из перспективных направлений. При помощи микрочипов возможно провести инкацию четырех инфекций одновременно. В данном случае, с использованием микрочипа были диагностированы несколько инфекционных агентов, в том числе и грипп A/H3N8. Непосредственно в тест-системе был использован штамм *А/утка/Калифорния/72,* A/H3N8, однако все исследуемые штаммы ВГЛ успешно диагностированы при помощи микрочипа.

Разработка олигонуклеотидного микрочипа состоит из нескольких этапов, первоначальным из которых явыляется дизайн и синтез зондов и праймеров.

Процесс подбора специфических олигонуклеотидных зондов для типирования вирусных инфекций состоял из 3 этапов:

1) Выравнивание последовательностей, поиск консервативных областей.

С использованием программного обеспечения «Mega 7» по алгоритму «Clustal W» для полноразмерных кодирующих последовательностей нуклеотидов исследуемых вирусов провели множественное выравнивание (рисунок 30).



Рисунок 30 – Скриншот выравнивания последовательностей нуклеотидов ВГЛ и определения консервативных участков в программе *Mega 7*

В результате анализа методом множественного выравнивания последовательностей нуклеотидов для подбора олигонуклеотидных зондов в роли мишеней были определены и выбраны консервативные гены. Таким образом, для идентификации кДНК вирусов гриппа *A (H3N8)* выбраны кодирующие белки M2 и NP гены. Нуклеотидные последовательности данных генов были отобраны из международной базы данных *NCBI «Influenza Virus Sequence Database»*.

2) Подбор олигонуклеотидных зондов.

Подбор олигонуклеотидных зондов проводили с помощью программы Picky 2.20, где олигонуклеотиды подбирались в соответствии с такими параметрами, как температура гибридизации, допустимая длина зонда, уровень перекрестной гибридизации, положение в гене и др. (рисунок 31).

Длина подобранных зондов составила порядка 32-40 нуклеотидов, которые были специфичны на консервативные участки генов M2 и NP.

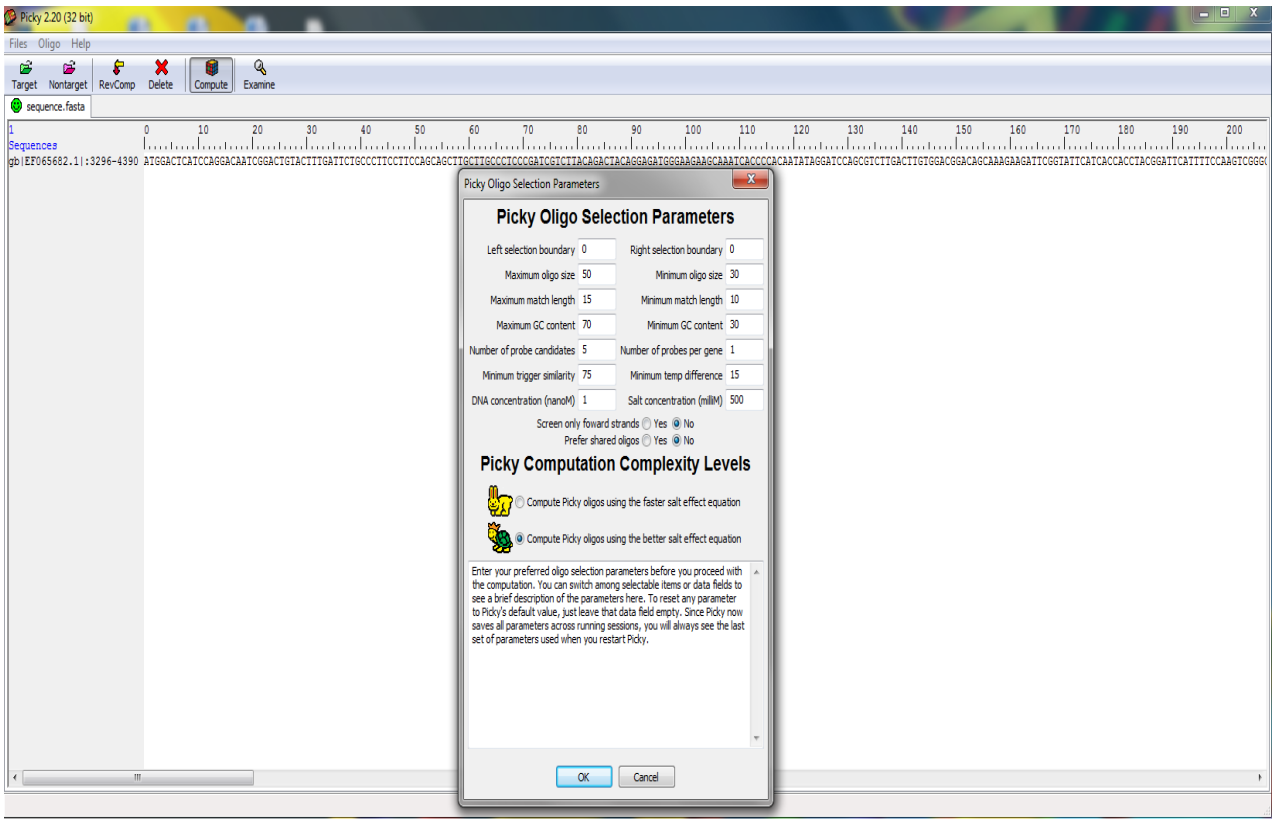


Рисунок 31 – Скриншот подбора зондов в программе Picky 2.20

3) Анализ специфичности олигонуклеотидных зондов.

Анализ подготовленных олигонуклеотидных последовательностей были провели с помощью программы BLAST на наличие их возможной гомологии с известными последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank на текущий момент времени. В результате анализа нуклеотидной последовательности, высокую гомологичность с генами других вирусов обнаружено не было.

Олигонуклеотидные зонды были синтезированы на оборудовании *Synthesizer H-16,* модели *DNA/RNA* (Германия), по инструкции производителя.

В результате экспериментальных исследований вышеуказанные три олигонуклеотидных зонда, а также некоторые ранее подобранные зонды не прошли испытания по специфичности связывания на микрочипе, и далее не рассматривались в качестве кандидатных мишеней для данной тест-системы. Таким образом, схема и расположение зондов в итоге выглядит так, как показано на рисунке 32.

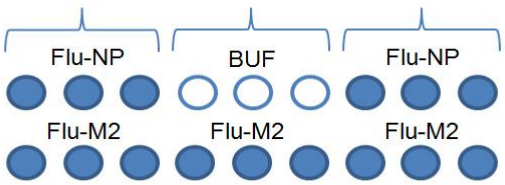


Рисунок 32 – Схема расположения зондов на микрочипе

Флуоресцентное мечение кДНК вирусов гриппа А (H3N8), осуществляли способом прямого встраивания меченого красителем Су-5 нуклеотидтрифосфатов при амплификации кДНК с использованием специфичных праймеров, подобранных к зондам.

ОТ-ПЦР проводили с помощью наборов Super-Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen) и Access RT-PCR System (Promega) в соответствии с инструкциями производителей.

С целью флуоресцентного мечения молекул вирусной нуклеиновой кислоты в процессе ОТ-ПЦР, в реакционную смесь добавлен 1 мМ флуоресцентно меченый красителем Су-5 - дезоксицитидинтрифосфат. Качество и специфичность наработанных флуоресцентно меченых кДНК вирусов проверяли методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле и гибридизацией наработанных ПЦР продуктов на экспериментальных сериях микрочипов, с визуализацией полученных данных на компьютере после флуоресцентного сканирования.

Изначально, в экспериментальных работах, во время проведения ОТ-ПЦР в одной реакционной смеси в объёме 25 мкл содержалось 5-6 мкл микса праймеров с концентрациями в 20 пкм. В ходе исследований по наработке ПЦР-продуктов были получены положительные результаты в соотношениях праймеров в реакционной смеси (таблица 29).

Таблица 29 – Оптимальные соотношения праймеров в реакционной смеси для ОТ-ПЦР

Наименование праймеров	Объём праймера в 1 реакционной смеси (25 мкл), мкл	
	№1	№2
Flu-NP (F)	0,5	0,25
Flu-NP (R)	0,5	0,25
Flu-M2 (F)	0,5	0,5
Flu-M2 (R)	0,5	0,5

ПЦР-продукты, наработанные вышеуказанными наборами для ОТ-ПЦР, были визуально сравнены по соответствующим размерам и чистоте от примесей. Из полученных во время исследований электрофореграмм было выявлено, что наиболее чистые ПЦР-продукты нарабатываются с набором *Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen)* (рисунок 33). В дальнейших исследованиях амплификацию с использованием набора *Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq («Invitrogen»*, США) проводили по следующей программе:

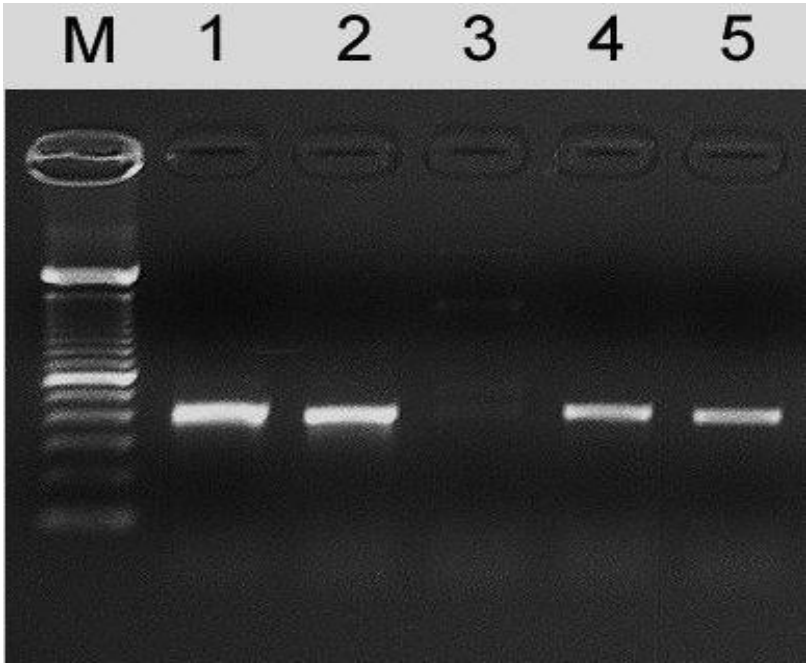
45 °С – 30 мин;

94 °С – 2 мин;

94 °С – 15 с,
55 °С – 30 с } 37 циклов
68 °С – 1 мин;

68 °С – 5 минут,

в термоциклере *Applied Biosystems* 2720. В 25 мкл реакционной смеси содержалось SS *III RT/Platinum Taq* – 0,5 мкл; 2X реакционная смесь – 12,5 мкл; 1mM Cy5-dCTP – 0,5 мкл; РНК –3 мкл; Водой доводили объём до 25 мкл.



M – маркер 100 bp (Invitrogen); 1 – штамм*A/equine/Baizak/09/2012*,; 2 – штамм*A/equine/Kostanai/09/2012*; 3 – *A/equine/Matybulak/10/2012*; 4 – *A/equine/LKZ/09/2012;* 5 – *«A/утка/Калифорния/72» (H3N8*)

Рисунок 33 – Электрофореграмма наработанных ПЦР-продуктов вирусов гриппа А, с помощью набора для ОТ-ПЦР*Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Invitrogen)*

Экспериментальные исследования показали, что методика использования мультиплексной одностадийной ОТ-ПЦР позволяет получать флуоресцентно меченые кДНК вируса гриппа А.

Главным принципом работы биологических микрочипов с иммобилизованными зондами является способность макромолекул к молекулярному распознаванию (высокоспецифичному избирательному связыванию с другими молекулами). Таким образом, рецепторы антител способны различать определенные структуры на поверхности белка, а образование дуплексов ДНК подчиняется правилу Уотсона-Крика, A<->T и G<->C. Если соответствие между иммобилизованными молекулярными зондами и

мечеными анализируемыми молекулами в растворе точно удовлетворяет условиям молекулярной комплементарности, то образующиеся комплексы будут термодинамически наиболее устойчивы. В результате чего при определенных температурах их будет больше, чем комплексов, образованных с нарушением условий комплементарности, и соответственно, в совершенных комплексах будет более активный регистрируемый сигнал.

Таким образом, к 20 мкл наработанного ПЦР-продукта, содержащий Cy5-кДНК, добавлен буфер для гибридизации в объёме 36 мкл (20 мкл - 100 % формамид, 1 мкл - 10 % SDS, 15 мкл - 20 х SSC буфер), и доведён до 90 мкл общего объема дистиллированной водой, не содержащий нуклеаз, и прогрет в твердотельном термостате при 99 °С в течение 2 минут для денатурации кДНК, затем охлажден во льду в течение 2 минут, и нанесен на микрочип. Быстрое охлаждение проб проводится для того, чтобы расщеплённые нити кДНК не связывались между собой, образуя исходный дуплекс. Параллельно при пробоподготовке, олигонуклеотидные зонды на микрочипе денатурированы кипячением стеклянного слайда в дистиллированной воде в течение 1 минуты с последующей инкубацией в 96 % этаноле, охлаждённой при минус 20 °С, в течение 1 минуты. После чего слайд высушен центрифугированием при 3000 g в течение 20 секунд, и вставлен в рамки на 16 субэрреев («*Arrayit corporation*», США).

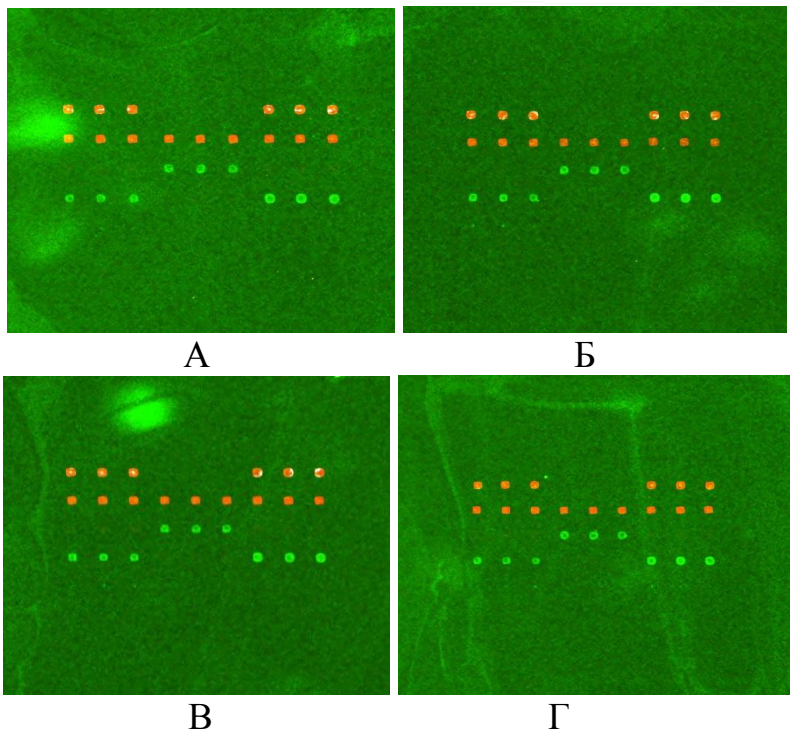
Гибридизация проведена с использованием термошейкера фирмы «Biosan» модели PST-100 (производство Латвии) в течение 2 часов при 37 °С с перемешиванием при 350 оборотах в минуту. После завершения инкубации поэтапно отмывали микрочип от не связавшихся кДНК проб буферными растворами «А», «В» и «С» фирмы «*Arrayit*», согласно протоколу производителя. Затем слайд высушен центрифугированием при 3000 g в течение 20 сна центрифуге фирмы «*Arrayit*» (США), и сканирован на сканере фирмы "*Innopsys"*, модели *InnoScan 710AL (*Франция). Дополнительно, для отмывки микрочипа экспериментально подбирали оптимальные буферы и их концентрации. В результате наилучшими параметрами отмывки микрочипа от не связавшихся кДНК проб обладал SSC-буфер в различных концентрациях. Таким образом, наилучший результат был получен при отмывке микрочипа один раз трёхкратным и два раза однократным SSC-буфером по 5 минут при комнатной температуре, и перемешиванием на шейкере при 500 оборотах в минуту.

Для флуоресцентного сканирование использован высокоскоростной конфокальный двухлазерный сканер InnoScan 710 для чипов средней и низкой плотности.

Сканеры InnoScan подходят для работы с микрочипами с флуоресцентными метками на любых носителях – стекле, пластике, нитроцеллюлозе. В нашем случае использованы стеклянные слайды. Оптическая схема InnoScan построена таким образом, что позволяет работать с любым типом слайдов как прозрачными, так и непрозрачными. Стандартная комплектация сканеров InnoScan включает два лазера: зеленый 532 нм и красный 635 нм и оптимизированной системой фильтров эмиссии (для работы с Cy3, Cy 5 и подобными метками).

Конфокальная детекция InnoScan и режим автофокусировки в реальном времени обеспечивает высочайшую чувствительность, отличное соотношение сигнал/шум и равномерное сканирование по всей поверхности слайда [178].

Настраиваемое разрешение модели InnoScan 710 3-40 мкм, размер точек на слайде от 200 мкм до 30 мкм, имеет быструю скорость сканирования. Сканирование микрочипов проведено с разрешением 5 мкм, при длинах волн 532 нм и 635 нм. Результаты сканирования представлены на рисунке 34.



А - «*А/утка/Калифорния/72*» (H3N8); Б- *A/equine/Baizak/09/2012*; В - *A/equine/Kostanai/09/2012;* Г - *A/equine/Matybulak/10/2012*

Рисунок 34 – Результаты гибридизации меченых кДНК штаммов вируса гриппа А, с зондами на микрочипе

Микрочипы с комплементарной ДНК (кДНК) были созданы с помощью зондов из библиотек кДНК вирусов гриппа*А (H3N8)* путем нанесения в виде пятна кДНК, соответствующей индивидуальному гену или зонду, в точное место на специальной микроплатформе. На микрочипе анализируют биологические образцы, что обеспечивает сравнительное измерение уровня каждой молекулы РНК вирусов гриппа. Изучаемые молекулы РНК вирусов, меченные флуоресцентным красителем, вместе с контрольным образцом присоединяют на поверхности кДНК микрочипа. Эти образцы РНК конкурируют за связывание с каждым зондом. РНК, последовательность которой соответствует таковой кДНК, соединяется с пятном кДНК на микрочипе. Под действием лазера флуоресцентная метка активируется и появляется возможность сравнить интенсивность сигналов флуоресцентных зондов, присоединившихся к кДНК.

Полученные результаты отражают относительное содержание РНК для каждого экспрессированного гена. Для стандартизации внутрисерийных

сравнений используют специальные приемы по нормализации результатов с последующим анализом [179]. Значение специфической флуоресценции при исследовании анализируемых образцов, достоверно превышало значение фоновой ($P<0,05$). Также, во всех образцах достоверно детектированы M и NP гены вируса гриппа *A (H3N8)* [180].

В качестве общего итога этой серии экспериментов можно заключить, что первичная идентификация ВГЛ проводится методом ПЦР-РВ, а при типировании необходим подбор специфических праймеров для классического ПЦР. Использование вышеназванных методов в настоящее время широко распространено при диагностике инфекционных заболеваний, однако микрочипы в виду своей мультиплексности и более высокой чувствительности могут превзойти все альтернативные методы молекулярной биологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение комплексных исследований, посвященных изучению морфометрических, антигенных и молекулярно-генетических характеристик штаммов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/ 10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Казахстана, позволило осуществить их филогенетический анализ. Установлено, что штаммы относятся к Американской линии семейству Флорида-2 вирусов гриппа лошадей. Определение нуклеотидной последовательности полного генома штаммов, использовано при разработке олигонуклеотидных микрочипов для диагностики и субтипирования вируса гриппа A/H3N8.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. При проведении эпизоотологического мониторинга проанализировано 857 пробы носоглоточных смывов и 1563 проб сывороток крови, доставленных из различных регионов Республики Казахстан. Выделено четыре актуальных штамма ВГЛ: А*/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/ 10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012*.

2. Определены оптимальные условия культивирования ВГЛ на развивающихся куриных эмбрионах и в культуре клеток *MDCK* (температура – 34 °С, длительность инкубации – 72 часов и дозой заражения 1000 $ЭИД_{50}$/0,2 $см^3$, 0,1 $ТЦД_{50}$) с соблюдением этих параметров получена вирусная суспензия с высокой гемагглютинирующей активностью не менее 1:256 и инфекционным титром порядка 7,25 lg.

3. Штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* (H3N8) отличаются как по морфометрическим (форма и размеры вирионов), так и по физическим характеристикам (константа седиментации и плавучая плотность). Установлено, что длина некоторых нитевидных форм вирусных частиц достигает 750 нм и более, размер округлых вирионов составляет 80-200 нм, а поверхность вирусных частиц покрыта шипиками высотой 6-8 нм.

4. С использованием подобранных специфических праймеров наработаны полноразмерные сегменты генома исследуемых штаммов. Полученная путем секвенирования нуклеотидная последовательность полного генома штаммов опубликована в международной базе данных GenBank. Номера доступа для штамма *A/equine/LKZ/09/2012*: MH173319, MH173320, MH173321, KP202378, KP202382, MH173322, KP202374, KP202386, для штамма *A/equine/Kostanai/09/2012*: MH173056, MH173057, MH173058, KP202380, KP202384, MH173059, KP202376 и KP202388.

5. В результате филогенетического анализа установлено, что штаммы *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* (H3N8) относятся к Американской линии семейству Флорида-2 вирусов гриппа лошадей. Установлено, что различия аминокислот в позиции 387 и 394 могут служить для определения вирусов гриппа лошадей, выделенных в 2012 году в отдельную филогенетическую ветвь.

6. Подобраны и синтезированы специфические олигонуклеотидные зонды и праймеры на грипп A/H3N8. Проведена диагностика и субтипирование исследуемых штаммов вирусов гриппа лошадей с использованием биологического микрочипа и методом ОТ-ПЦР. Разработан оптимальный дизайн расположения зондов на платформе. Изготовлена экспериментальная серия микрочипов.

Оценка полноты решения поставленных задач

Поставленные в работе задачи выполнены:

- осуществлен эпизоотологический мониторинг гриппа лошадей на территории РК в результате которого изолировано 4 новых штамма вирусов гриппа лошадей: *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012*;

- подобраны адекватные модели (РКЭ и культура клеток *MDCK*) и установлены оптимальные параметры культивирования штаммов вирусов, позволяющие получать вируссодержащие материалы с необходимой для вакцинных кандидатов инфекционной активностью и гемагглютинирующим титром;

- проведено электронно-микроскопическое исследование морфометрических характеристик вирионов, показавшее, что вирусные частицы преимущественно представлены округлыми формами с поверхностными шипами;

- определена нуклеотидная последовательность полного генома штаммов ВГЛ *A/equine/Baizak/09/2012*, *A/equine/Kostanai/09/2012* и генов (HA, NA, M, NP, NS) штаммов *A/equine/Matybulak/10/2012*, *A/equine/LKZ/09/2012*;

- проведен филогенетический анализ поверхностных генов (HA, NA) вирусов *A/equine/Baizak/09/2012*, *A/equine/Kostanai/09/2012*, *A/equine/Matybulak/10/2012*, *A/equine/LKZ/09/2012* и установлена их филогенетическая к клайду *American*, субклайду *Florila 2*;

- разработан олигонуклеотидный микрочип и система проведения полимеразной цепной реакции для диагностики и субтипирования вируса гриппа A/H3N8.

Рекомендации по конкретному использованию результатов

Штаммы вируса гриппа лошадей *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012, A/equine/Matybulak/10/2012* и *A/equine/LKZ/09/2012* рекомендуются для разработки актуальных вакцинных препаратов.

Методические рекомендации оптимальных параметров культивирования вирусов на использованных в работе экспериментальных моделях рекомендуются для получения вируссодержащих материалов с высокой инфекционной гемагглютинирующей активностью.

Отработанные методы ОТ-ПЦР рекомендуются для проведения ранней диагностики и субтипирования штаммов вируса гриппа лошадей на подтип вируса гриппа A/H3N8.

Олигонуклеотидный микрочип рекомендуется для диагностики вируса гриппа A/H3N8.

Размещение полногеномной нуклеотидной последовательности вирусов *A/equine/Baizak/09/2012, A/equine/Kostanai/09/2012* и генов (HA, NA, M, NP, NS) штаммов *A/equine/Matybulak/10/2012, A/equine/LKZ/09/2012*, в международной базе данных *GenBank* может быть применено при проведении сравнительного и филогенетического анализа.

Оценка научного уровня выполненной работы

Научный уровень представленной работы соответствует международным стандартам исследований, проводимых в данной области. С использованием адекватных вирусологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследованы биологические и молекулярно-генетические свойства штаммов вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан. Предложенная технология культивирования вирусов, сконструированные и подобранные специфические олигонуклеотидные зонды и праймеры на грипп А (H3N8), а также разработанный микрочип удовлетворяют современным требованиям проведения диагностики и субтипирования штаммов вирусов гриппа лошадей.

Все результаты, полученные в ходе исследований, были обработаны и проанализированы с помощью компьютерных программ, а для их интерпретации и обсуждения использовались литературные источники из отечественной и зарубежной литературы, Internet порталы и сайты.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Брель И.М. Перспективы совершенствования племенного коневодства и конного спорта в Казахстане. - Костанай, 2007.

2 Юров К.П. Инфекционные и инвазионные болезни лошадей. - М.: «Колос», 1976. - С. 81-90.

3 Бессарабов Б.Ф., Вашу А.А., Воронин Е.С.и др. Инфекционные болезни животных. – М.: Колос. 2007. - С. 408 – 410.

4 Вирус гриппа лошадей // http://www.allvet.ru/referats/30.php 16.08.19

5 Selleck P.W., et al. Rapid Diagnosis of Highly Pathogenic Avian Influenza Using Pancreatic Impression Smears // Avian diseases. – 2003. – Vol.47. - P. 1190–1195.

6 Cooper L. A., Subbarao K.A Simple Restriction Fragment Length Polymorphism-Based Strategy That Can Distinguish the Internal Genes of Human H1N1, H3N2, and H5N1 Influenza A Viruses // Journal of Clinical Microbiology. - 2000. - Vol. 38, № 7. - P. 2579-2583.

7 Major, D. A. Hygiene practices to prevent the spread of equine influenza by humans // Aust. Vet. J. - 2011. – № 89. - P. 124–125. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00765.x

8 Janet M., Daly J. Richard Newton, Jennifer A. Mumford Current perspectives on control of eguine influenza // Vet.Res. – 2004. 35. –P. 411-423.

9 Elton, D., and Bryant, N. Facing the threat of equine influenza. Equine Vet. J. – 2011. – № 43. - P. 250–258. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00357.x

10 Иванова Г.А.. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных. - М.: «Колос», 1972. - С. 175-178.

11 Chambers, T. M., and Reedy, S. E. Equine influenza diagnosis: sample collection and transport // Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1161. – P. 371–377.

12 Schweiz. Arch. Tierheilkd. Alexander, D. J., and Brown, I. H. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. //Rev. Sci. Tech. - 2000. - Vol.19. – P. 197–225. doi: 10.17236/sat00015

13 Нахмансон В.М., Бурба Л.Г. Дифференциальная диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. - М.: Росагропромиздат, 1990. С. 25 – 37.

14 Осидзе Д.Ф. Инфекционные болезни животных: справочник. - М.: Агропромиздат, 1987. С. 45 – 59.

15 Аграрные новости Казахстана // http://www.kazakh-zerno.kz/novosti/agrarnye-novosti-kazakhstana 17.08.19

16 Жуматов К.Х., Кыдырманов А.И., Карамендин К.О. и др. Изучение штаммов вируса гриппа А, выделенных от диких птиц в Центральном Казахстане в 2006 году // Мат. межд. науч. практ. конф. «Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития», посвященной 50-летию НИИПББ НЦБ МОН РК. 19-21 мая 2008 г. Алматы. – Алматы, 2008. - С. 113-115.

17 Yamanaka T., Tsujimura K., Kondo T., Matsumura T., Ishida H., Kiso M., et al. Infectivity and pathogenicity of canine H3N8 influenza A virus in horses. Influenza Other Respir // Viruses. – 2010. - Vol. 4. – P. 345–351.

18 Alves Beuttemmüller E., Woodward, A., Rash A., dos Santos Ferraz L. E., Fernandes Alfieri A., Alfieri, A. A. Characterisation of the epidemic strain of H3N8 equine influenza virus responsible for outbreaks in South America in 2012// Virol J. – 2016. - Vol. 13. – P.45.

19 Грипп лошадей (grippus eguarum) // http://www.webmvc.com/bolez/livestok/infect/ horse/grippus.php 19.08.19

20 GuoY., Wang M., Kawaoka Y., Gorman O., Ito T., Saito T., Webster R. CharacterizationofanewavianlikeinfluenzaAvirusfromhorsesinChina // Virology. - 1992. - Vol. 188(1). - P. 245 – 255.

21 Guo X., Liao M., Xin C. Sequence of HA gene of avian influenza A/Chicken/Guandong/SS/1994(H9N2) virus // Avian diseases. – 2003. - № 47. - P. 1118-1121.

22 Бочеренко В.А. Грипп лошадей. - Харьков: Харьковская государственная зооветеринарная академия, 2007.

23 Rezek. W. et al. Bull Vet inst // Pulawy. - 1995. – №39. – P. 2-77.

24 Gallagher M. et al. Isolation of immunogenic neuraminidases of human influenza viruses by a combination of genetic and biochemical procedures // J. of clinic. Microbiol. - 1984. – Vol. 20. – P. 89-93.

25 Mancini, Dalva Assunção Portari et al. Anti-human influenza protector antibody detected in horses as a zoonotic viruses // Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. – 2004. - Vol. 41, 6. - P. 379-383.

26 Karasin A.I., et al. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes // Virus Research. – 2002. – № 68. - P. 71–85.

27 Bryant N. A., Rash A. S., Woodward A. L., Medcalf E., Helwegen M., Wohlfender F. Isolation and characterisation of equine influenza viruses (H3N8) from Europe and North America from 2008 to 2009 // Vet. Microbiol. – 2011. - № 147. –P. 19–27. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.040

28 Xie T., Anderson B. D., Daramragchaa U., Chuluunbaatar M., and Gray G. C. A review of evidence that equine influenza viruses are zoonotic // Pathogens. - 2016. - Vol. 5. - P.50. doi: 10.3390/pathogens5030050

29 Cullinane A., Elton D., and Mumford J. Equine influenza – surveillance and control. Influenza Other Respir // Viruses. - 2010. - Vol. 4. – P. 339–344. doi: 10.1111/j.1750-2659.2010.00176.x

30 Daly J. M., and Murcia P. R. Strategic implementation of vaccines for control of equine influenza // Equine Vet. J. - 2018. - Vol. 50. – P. 153–154. doi: 10.1111/evj. 12794

31 Cooke G. Vaccination for equine influenza: the sports regulator's viewpoint // Equine Vet. J. – 2013. - Vol. 45. – P. 770–771. doi: 10.1111/evj.12151

32 Cullinane A., and Newton J. R. Equine influenza–a global perspective // Vet. Microbiol. - 2013. – Vol. 167. - P.205–214. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.029

33 Crouch C. F., Daly J., Henley W., Hannant D., Wilkins J., and Francis M. J. The use of a systemic prime/mucosal boost strategy with an equine influenza ISCOM vaccine to induce protective immunity in horses // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2005. - Vol. 108. – P. 345–355. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.06.009

34 Garrett D., Montesso F., Fougerolle S., Lopez-Alvarez M. R., Birand I., De Bock M. Refinement of the equine influenza model in the natural host: a meta-analysis to determine the benefits of individual nebulisation for experimental infection and vaccine evaluation in the face of decreased strain pathogenicity // Vet. Microbiol. – 2017. - Vol. 211. – P. 150–159. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.10.010

35 Joseph U., Su Y. C., Vijaykrishna D., and Smith G. J. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. Influenza Other Respir // Viruses. - 2017. - Vol. 11. – P. 74–84. doi: 10.1111/irv.12412

36 Payungporn S., Crawford P.C., Kouo T.S., Chen L.M., Pompey J., Castleman W.L., Dubovi E.J., Katz J.M., Donis R.O. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida // Emerg Infect Dis. – 2008. - 14(6). - P. 902-928.

37 Balasuriya U. B., Lee P. Y., Tiwari A., Skillman A., Nam B., Chambers T. M. Rapid detection of equine influenza virus H3N8 subtype by insulated isothermal RT-PCR (iiRT-PCR) assay using the POCKITTM nucleic acid analyzer // J. Virol. Methods. – 2014. - Vol. 207. – P.66–72. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.06.016

38 Chambers T. M., Quinlivan M., Sturgill T., Cullinane A., Horohov D. W., Zamarin D. Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: pilot studies of safety and efficacy in horses // Equine Vet. J. – 2009. - Vol. 41. – P. 87–92. doi: 10.2746/042516408X371937

39 Bayry J. Emerging viral diseases of livestock in the developing world // Indian J. Virol. – 2013. - Vol. 24. – P. 291–294. doi: 10.1007/s13337-013-0164-x

40 Tu J., Zhou H., Jiang, T., Li C., Zhang A., Guo X. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China // Arch. Virol. – 2009. - Vol. 154. – P. 887–890. doi: 10.1007/s00705-009-0381-1

41 Aymard-Henry M. Bull. Wld. Hlth. Org. - 1973. – Vol. 48. – P. 199-202.

42 Holland R. E. Equine Influenza. Art. – 2003. -No: 4584. Available online at: www. thehorse.com

43 Daly J. M., MacRae S., Newton J. R., Wattrang E., and Elton, D. M. Equine influenza: a review of an unpredictable virus // Vet. J. – 2011. - Vol. 189. – P. 7–14. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.06.026

44 Crispe E., Finlaison D. S., Hurt A. C., and Kirkland P. D. Infection of dogs with equine influenza virus: evidence for transmission from horses during the Australian outbreak // Aust. Vet. J. - 2011. - Vol. 89. – P. 27–28. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00734.x

45 Janet M. Daly, Anthony S. Blunden, Shona MacRae, Jodi Miller, Samantha J. Bowman, Jolanta Kolodziejek, Norbert Nowotny, Ken C, Smith. Transmission of Equine Influenza Virus to English Foxhounds // EID J. – 2008. – Vol. 14, № 3. - P. 461-464.

46 Back H., Berndtsson L. T., Gröndahl G., Ståhl K., Pringle J., and Zohari S. The first reported Florida clade 1 virus in the Nordic countries, isolated from a Swedish outbreak of equine influenza in 2011 // Vet. Microbiol. – 2016. - Vol. 184. – P. 1–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.12.010

47 Bernardino P. N., Mapes S. M., Corbin R., and Pusterla N. Pyrosequencing as a fast and reliable tool to determine clade affiliation for equine influenza A virus // J. Vet. Diagn. Invest. - 2016. - Vol. 28. – P. 323–326. doi: 10.1177/1040638716638123

48 Bogerd H. P., Skalsky R. L., Kennedy E. M., Furuse Y., Whisnant A. W., Flores O. Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs // J. Virol. – 2014. - Vol. 88. – P. 8065–8076. doi: 10.1128/JVI.00985-14

49 Cowled B., Ward M. P., Hamilton S., and Garner G. The equine influenza epidemic in Australia: Spatial and temporal descriptive analyses of a large propagating epidemic // Prev. Vet. Med. – 2009. - Vol. 92. – P. 60–70. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.08.006

50 Baz M., Paskel M., Matsuoka Y., Zengel J., Cheng X., Treanor, J. J. A live attenuated equine H3N8 influenza vaccine is highly immunogenic and efficacious in mice and ferrets // J. Virol. – 2015. - Vol. 89. - P. 1652–1659.

51 Chambers T. M., Holland R. E., Tudor L. R., Townsend H. G. G., Cook A., Bogdan J. A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge // Equine Vet. J. – 2001. - Vol. 33. – P. 630–636.

52 Chambers T. M. Cross reactivity of existing influenza vaccine with a new strain of equine influenza virus from China // Vet. Rec. – 1992. - Vol. 31. – P. 388. doi: 10.1136/vr.131.17.388

53 Elton D., and Cullinane A. Equine influenza: antigenic drift and implications for vaccines // Equine Vet. J. – 2013. - Vol. 45. – P. 768–769. doi: 10.1111/evj.12148

54 Aeschbacher S., Santschi E., Gerber V., Stalder H. P., and Zanoni R. G. Development of a real-time RT-PCR for detection of equine influenza virus // Schweiz Arch Tierheilkd. – 2015. - Vol. 21. - P. 191-201.

55 Archetti I., Horsfall F.L. Persistent antigenic variation of influenza A virus after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum // J.exp. Med. – 1950. – Vol. 92. – P. 441-62.

56 Arthur R. J. and Suann C. J. Biosecurity and vaccination strategies to minimise the effect of an equine influenza outbreak on racing and breeding // Aust. Vet. J. – 2011. - Vol.89. – P. 109–113. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00764.

57 Bryant N. A., Rash A. S., Russell C. A., Ross J., Cooke A., Bowman S. Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007 // Vet. Microbiol. – 2009. - Vol.138. – P. 41–52. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.004.

58 Feng K. H., Gonzalez G., Deng L., Yu H., Tse V. L., Huang L. Equine and canine influenza H3N8 viruses show minimal biological differences despite phylogenetic divergence // J. Virol. - 2015. - Vol. 89. – P. 6860–6873. doi: 10.1128/JVI.00521-15.

59 Bolfa P., Jeon I., Loftis A., Leslie T., Marchi S., Sithole F. Detection of West Nile Virus and other common equine viruses in three locations from the Leeward Islands, West Indies // Acta Trop. -2017. - Vol. 174. – P. 24–28. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.06.023.

60 Barba M. and Daly J. M. The influenza NS1 protein: what do we know in equine influenza virus pathogenesis? // Pathogens. – 2016. - Vol. 5. – P. 57. doi: 10.3390/pathogens5030057.

61 Kawaoka Y., et al. Influence of host species on the evolution of the nonstructural (NS) gene of influenza A viruses // Virus Research. – 1998. – Vol. 55. – P. 143–156.

62 Bryant N. A., Paillot R., Rash, A. S., Medcalf E., Montesso F., Ross J. Comparison of two modern vaccines and previous influenza infection against challenge with an equine influenza virus from the Australian 2007 outbreak // Vet. Res. - 2010. - Vol. 41. – P. 1–15. doi: 10.1051/vetres/2009067.

63 Balasuriya U. B. Type A influenza virus detection from horses by realtime RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR. Anim. // Influenza Virus. – 2014. - Vol. 1161. – P. 393–402. doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_34.

64 Chambers T. M., Holland R. E. Jr., and Lai, A. C. K. Equine influenza–current veterinary perspectives, part 2. // Equine Pract. – 1995. - Vol. 17. – P. 26–30.

65 Chambers T. M. A brief introduction to equine influenza and equine influenza viruses, in Animal Influenza Virus // Methods in Molecular Biology. - 2014. – P. 365–370.

66 Daly J. M., Newton, J. R., and Mumford J. A. Current perspectives on control of equine influenza // Vet. Res. - 2004. - Vol. 35. – P. 411–423. doi: 10.1051/vetres:2004023

67 Favaro P. F., Fernandes W. R., Reischak D., Brandão P. E., Silva S. O. S., and Richtzenhain L. J. Evolution of equine influenza viruses (H3N8) during a Brazilian outbreak, 2015 // Braz. J. Microbiol. - 2018. - Vol. 49. – P. 336–346. doi: 10.1016/j.bjm.2017.07.003.

68 Burnell F. J., Holmes M. A., Roiko A. H., Lowe J. B., Heil G. L., White S. K. Little evidence of human infection with equine influenza during the 2007 epizootic, Queensland, Australia // J. Clin. Virol. – 2014. - Vol. 59. – P. 100–103. doi: 10.1016/j.jcv.2013.11.011

69 Barb L., Madic J., Turk N., and Daly J. Vaccine failure caused an outbreak of equine influenza in Croatia // Vet. Microbiol. – 2009. - Vol. 133. – P. 164 – 171. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.009.

70 Daly J.M., Blunden A. S., Macrae S., Miller J., Bowman S. J., Kolodziejek J. Transmission of equine influenza virus to English foxhounds // Emerg. Infect. Dis. – 2008. - Vol.14. – P. 461–464. doi: 10.3201/eid1403.070643.

71 Chambers T. M., and Balasuriya U. B. R. Equine influenza virus, in Molecular Detection of Animal Viral Pathogens // Boca Raton, FL: CRC Press. - 2016. – P. 383–392.

72 Larson K. R., Heil G. L., Chambers T. M., Capuanod A., White S. K., and Gray G. C. Serological evidence of equine influenza infections among persons with horse exposure, Iowa // J. Clin. Virol. – 2015. - Vol. 67. - P. 78–83. doi: 10.1016/j.jcv.2015.04.009.

73 Galvin P., Gildea S., Nelly M., Quinlivan M., Arkins S., Walsh C. The evaluation of three diagnostic tests for the detection of equine influenza nucleoprotein in nasal swabs // Influenza Other Respir Viruses. – 2014. - Vol. 8. – P. 376–383. doi: 10.1111/irv.12235.

74 Chambers T. M., Shortridge K. F., Li P. H., Powell D. G., and Watkins K. L. Rapid diagnosis of equine influenza by the directigen FLU-A enzyme immunoassay // Vet. Rec. – 1994. - Vol. 7. – P. 135, 275–279. doi: 10.1136/vr.135.12.275.

75 Bera B. C., Virmani N., Shanmugasundaram K., Vaid R. K., Singh B. K., Gulati B. R. Genetic analysis of the neuraminidase (NA) gene of equine influenza virus (H3N8) from epizootic of 2008–2009 in India // Indian J. Virol. – 2013. - Vol. 24. – P. 256–264. doi: 10.1007/s13337-013-0137-0.

76 Burashev E.D., Sultankulova K.T., Strochkov V.M., Sandybaev N.T., Sansyzbay A.R. Sequencing m gene of equine influenza virus A/Equine/Otar/764/07 strain isolated in terrain of the Kazakhstan // European Science and Technology. – 2014. - Vol. 1. – P. 74–78.

77 Wrigley N.G. The size and shape of influenza virus neuraminidase // Virol., - 1973. – Vol. 51. – P. 525-529.

78 Diaz-Mendez A., Viel L., Hewson J., Doig P., Carman S., Chambers T. Surveillance of equine respiratory viruses in Ontario // Can. J. Vet. Res. – 2010. - Vol. 74. – P. 271–278.

79 Bountouri M., Fragkiadaki E., Ntafis V., Kanellos T., and Xylouri E. Phylogenetic and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from Greece (2003 and 2007): evidence for reassortment between evolutionary lineages // Virol. J. – 2011. - Vol. 8. – P.350. doi: 10.1186/1743-422X-8-350.

80 Fougerolle S., Legrand L., Lecouturier F., Sailleau C., Paillot R., Hans A. Genetic evolution of equine influenza virus strains (H3N8) isolated in France from 1967 to 2015 and the implications of several potential pathogenic factors // Virology. – 2017. - Vol. 505. – P. 210–217. doi: 10.1016/j.virol.2017.02.003.

81 Qi T., Guo W., Huang W. Q., Li H. M., Zhao L. P., Dai L. L. Genetic evolution of equine influenza viruses isolated in China // Arch. Virol. – 2010. - Vol. 155. – P. 1425–1432. doi: 10.1007/s00705-010-0724-y

82 Crawford P. C., Dubovi E. J., Castleman W. L., Stephenson I., Gibbs E. P., Chen L. Transmission of equine influenza virus to dogs // Science. – 2005. - Vol. 310. – P. 482–485. doi: 10.1126/science.1117950.

83 Dhama K., Mahendran M., Gupta P. K., and Rai A. DNA Vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives // Vet. Res. Commun. – 2008. - Vol. 32. – P. 341–356. doi: 10.1007/s11259-008-9040-3.

84 Sack A., Daramragchaa U., Chuluunbaatar M., Gonchigoo B., Bazartseren B., Tsogbadrakh N. Low prevalence of enzootic equine influenza virus among horses in Mongolia // Pathogens. - 2017. - Vol. 6. – P. 61. doi: 10.3390/pathogens6040061.

85 Ito M., Nagai M., Hayakawa Y., Komae H., Murakami N., Yotsuya S. Genetic analyses of an H3N8 influenza virus isolate, causative strain of the outbreak of equine influenza at the Kanazawa Racecourse in Japan in 2007 // J. Vet. Med. Sci. – 2008. - Vol. 70. – P. 899–906. doi: 10.1292/jvms.70.899.

86 Khurelbaatar N., Krueger W. S., Heil G. L., Darmaa B., Ulziimaa D., Tserennorov D. Sparse evidence for equine or avian influenza virus infections among Mongolian adults with animal exposures. Influenza Other Respir // Viruses. – 2013. - Vol. 7. – P.1246–1250. doi: 10.1111/irv.12148.

87 Khurelbaatar N., Krueger W. S., Heil G. L., Darmaa B., Ulziimaa D., Tserennorov D. Little evidence of avian or equine influenza virus infection among a cohort of Mongolian adults with animal exposures, 2010–2011 // PLoS ONE. - 2014. - Vol. 9. – P. 85616. doi: 10.1371/journal.pone.0085616.

88 Yondon M., Heil G. L., Burks J. P., Zayat B., Waltzek T. B., Jamiyan B. O. Isolation and characterization of H3N8 equine influenza A virus associated with the 2011 epizootic in Mongolia. Influenza Other Respir // Viruses. – 2013. - Vol. 7. – P. 659–665. doi: 10.1111/irv.12069.

89 Yondon M., Zayat B., Nelson M. I., Heil G. L., Anderson B. D., Lin, X. Equine influenza A (H3N8) virus isolated from Bactrian camel, Mongolia // Emerg. Infect. Dis. – 2014. - Vol. 20. – P. 2144–2147. doi: 10.3201/eid2012.140435.

90 Na W., Yeom M., Yuk H., Moon H., Kang B., and Song D. Influenza virus vaccine for neglected hosts: horses and dogs // Clin. Exp. Vaccine Res. – 2016. - Vol. 5. – P. 117–124. doi: 10.7774/cevr.2016.5.2.117.

91 Pecoraro H. L., Bennett S., Garretson K., Quintana A. M., Lunn K. F., Landolt G. A. Comparison of the infectivity and transmission of contemporary canine and equine H3N8 influenza viruses in dogs // Vet.Med. Int. - 2013. - P. 874521. doi: 10.1155/2013/874521.

92 Foord A. J., Selleck P., Colling A., Klippel J., Middleton D., and Heine H. G. Real-time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with *A/equine/Sydney/2007 (H3N8)* // Vet. Microbiol. – 2009. - Vol. 137. – P. 1–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.006.

93 Galvin P., Gildea S., Arkins S., Walsh C., and Cullinane A. The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA) // Influenza Other Respir Viruses. – 2013. - Vol. 7. – P. 73–80. doi: 10.1111/irv.12195.

94 Gupta A. K., Anita A., and Vandanajay B. Detection of equine influenza viral genome by RT-PCR and RNA-DNA hybridization // Indian J. Biotech. – 2003. - Vol. 2. – P. 214–219.

95 Lee E., Kim E. J., Shin Y. K. and Song J. Y. Design and testing of multiplex RT-PCR primers for the rapid detection of influenza A virus genomic segments: application to equine influenza virus // J. Virol.Methods. – 2016. - Vol. 228. – P. 114 –122. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.012.

96 Perdue M.L., Garcia M., Senne D., Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses // Virus Research. – 1997. - Vol. 49. - P. 173-186.

97 Kirkland P. D., Finlaison D. S., Crispe E., and Hurt A. C. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia // Emerg. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 16. – P. 699–702. doi: 10.3201/eid1604.091489.

98 Kawaoka Y., Bean W. J., and Webster R. G. Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses. // Virology. - 2010. - Vol.169. –P. 283–292. doi: 10.1016/0042-6822(89)90153-0

99 Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Khan E., Daulbayeva K., Asanova S., et al. Continuing evolution of equine influenza virus in Central Asia, 2007–2012 // Arch. Virol. - 2014. Vol.159. – P. 2321–2327. doi: 10.1007/s00705-014-2078-3

100 Бурашев Е.Д., Султанкулова К.Т., Кожабергенов Н.С., Садикалиева С.О., Орынбаев М.Б., Сандыбаев Н.Т., Зайцев В.Л. Морфометрия и некоторые физические характеристики вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан // Вестник КазНУ. Серия экологическая. - 2018. - № 1(54). – С. 62-68.

101 Khan A., Mushtaq M. H., Ahmad M. U. D., Nazir J., Farooqi S. H., and Khan A. Molecular epidemiology of a novel re-assorted epidemic strain of equine influenza virus in Pakistan in 2015–16 // Virus Res. – 2017. - Vol. 240. – P. 56–63. doi: 10.1016/j.virusres.2017.07.022.

102 NRCE Annual Report.National Research Central on Equines, Annual Report 2009–2010. 21 pp. Available online at: %20Annual%20Report%202009-10.pdf OIE. Equine Influenza. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. - Paris: Office International Des Epizooties. - 2010. – P. 871–883. http://nrce.gov.in/downloads/NRCE.

103 Yang H., Xiao Y., Meng F., Sun F., Chen M., Cheng Z., et al. Emergence of H3N8 equine influenza virus in donkeys in China in 2017 // Vet. Microbiol. - 2018. - Vol. 214. – P. 1–6. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.033.

104 Mumford J. A., and Wood J. Conference report on WHO/OIE meeting: consultation on newly emerging strains of equine influenza // Vaccine. - 1993. - Vol. 11. - P. 1172–1175. doi: 10.1016/0264-410X(93)90092-C.

105 Галактионов В.Г. Иммунология. - М., 2004. - С. 528.

106 Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Assanzhanova N., Sansyzbay A. Duration of the protective immune response after prime and booster vaccination of yearlings with a live modified cold-adapted viral vaccine against equine influenza // Vaccine. – 2014. – Vol. 32 (25). – P. 2965-2971.

107 Diallo I., Read A. J., and Kirkland P. D. Positive results in a real-time PCR for type A influenza associated with the use of an inactivated vaccine // Aust. Vet. J. – 2011. - Vol. 89. – P.145–146. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00746.x.

108 Feng K. H., Sun M., Iketani S., Holmes E. C., and Parrish C. R. Comparing the functions of equine and canine influenza H3N8 virus PA-X proteins: suppression of reporter gene expression and modulation of global host gene expression // Virology. - 2016. - Vol. 496. – P. 138–146. doi: 10.1016/j.virol.2016.06.001.

109 Dominguez M., Münstermann S., Murray G., and Timoney P. Highhealth, high-performance horses: risk mitigation strategies for OIE-listed diseases // Rev. Sci. Tech. - 2015. - Vol. 34. – P. 837–848. doi: 10.20506/rst.34.3.2399.

110 Purzycka M., Rozek W., and Zmudzinski J. F. Global distribution of equine influenza // Med. Weter. - 2004. - Vol. 60. P. 256.

111 Newton J. R., and Mumford J. A. Equine influenza, in Infectious Diseases of Livestock // Oxford: Oxford University Press. - 2005. - Vol. 1. – P.766–774.

112 Lai A. C., Chambers T. M., Holland R. E. Jr., Morley P. S., Haines D. M., Townsend H. G., et al. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the western hemisphere // Arch. Virol. – 2001. - Vol.146. – P. 1063–1074. doi: 10.1007/s007050170106.

113 Rodriguez L., Reedy S., Nogales A., Murcia R.P., Chambers T., Martinez-Sobrido L. Development of a novel equine influenza virus live-attenuated vaccine // Virology. – 2018. – Vol. 516. – P. 76-85.

114 Slater J., Borchers K., Chambers T., Cullinane, A., Duggan, V., Elton, D., Legrand L., Paillot R., Fortier G. Report of the international equine influenza roundtable expert meeting at le touquet, Normandy // Equine Vet. J. – 2014.− Vol. 46.− P. 645-650.

115 Gildea S., Fitzpatrick D.A., Cullinane A. Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010-2012) // Influenza Other Resp. Viruses. – 2013. – Vol. 7. – P. 61-72.

116 Kirkland P. D., and Delbridge G. Use of a blocking ELISA for antibodies to equine influenza virus as a test to distinguish between naturally infected and vaccinated horses: proof of concept studies // Aust. Vet. J. – 2011. - Vol.89. – P. 45–46. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00743.x.

117 Minke J.M., Toulemonde C.E., Coupier H., Guigal P.M., Dinic S., Sindle T., Jessett D., Black L., Bublot M., Pardo M.C., Audonnet J.C. Efficacy of a canarypox-vectored recombinant vaccine expressing the haemagglutinin gene of equine influenza H3N8 virus in the protection of ponies from viral challenge // Am. J. Vet. Res. – 2007. – Vol. 68. – P. 213-219.

118 Daly J. M., Lai A. C., Binns M. M., Chambers T. M., Barrandeguy M., and Mumford J. A. Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses // J. Gen. Virol. – 1996. - Vol. 77. – P. 661–671. doi: 10.1099/0022-1317-77-4-661.

119 Kohlmeier J.E., Woodland D.L. Immunity to respiratory viruses // Annu Rev. Immunol. − 2009. – Vol. 27. – P. 61-82.

120 Kirkland P. D., and Delbridge G. Use of a blocking ELISA for antibodies to equine influenza virus as a test to distinguish between naturally infected and vaccinated horses: proof of concept studies // Aust. Vet. J. – 2011. - Vol. 89. – P. 45–46. doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00743.x.

121 Gildea S., Fitzpatrick D.A., Cullinane A. Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010-2012) // Influenza Other Resp. Viruses. – 2013. – Vol. 7. – P. 61-72.

122 Collins P. J., Vachieri S. G., Haire L. F., Ogrodowicz R. W., Martin S. R., Walker P. A., et al. Recent evolution of equine influenza and the origin of canine influenza // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2014. - Vol. 111. – P. 11175–11180. doi: 10.1073/pnas.1406606111.

123 Eckert E.A. Properties of an Antigenic Glycoprotein isolated from influenza Virus Hemagglutinin // J. of Virol. - 1973. – Vol. 11. – P. 183-192.

124 Burashev Y., Sultankulova K., Orynbayev M., Savitskaya I., Sandybayev N., Sansyzbay A. Comparative analysis of hemagglutinin gene from equine influenza

viruses isolated on the territory of the Republic of Kazakhstan in 2007 and 2012. Symposium on EuroAsian Biodiversity. 23-27 May 2016. - Antalya, TURKIYE, 2016.

125 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Sansyzbay A., Sandybayev N., Nurabayev S., Savitskaya I., Rock D.L., Tulman E. Complete genome sequencing of two equine influenza A (H3N8) virus strains isolated in Kazakhstan // Genome Announcements. - 2018. - Vol. 6. - P. 1-2.

126 OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition, OIE Headquarters. – 2017. http://www.oie.int. 15.08.18.

127 Cullinane A., Elton D., Mumford J. Equine influenza – surveillance and control // Influenza Other Respir Viruses. – 2010. – Vol. 4. – P. 339-344.

128 Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Assanzhanova N., Kozhamkulov Y., Inkarbekov D., Sansyzbay A. The safety and immunogenicity of a novel cold-adapted modified-live equine influenza virus vaccine // Aust. Vet. J. – 2014. – Vol. 92. – P. 450-457.

129 Изучение возможности использования культуры клеток MDCK для производства живой гриппозной вакцины // http://abstractsgamma.com/882. 04.07.18.

130 Протеолитическая активация вирусов. Многофакторность размножения вирусов // http://meduniver.com/Medical/Microbiology/915.html. 12.07.18.

131 Ашмарин И.П., Воробъев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. - М., 1959. – С. 28-56.

132 Morley P.S., Townsend H.G., Bogdan J.R., Haines D.M. Efficacy of a commercial vaccine for preventing disease caused by influenza virus infection in horses // J. Am. Vet. Med. Assoc. – 1999. – Vol. 215. – P. 61-66.

133 Gerber H. “Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza,” in Proceedings of the 2nd International Conference on Equine Infectious DiseasesSchafer W. Vergleichende sero-immunologische untersuchungen uber die viren der influenza unf klassichen geflugelpest // Z. Naturforsch. – 1970. – P. 81-91.

134 Mumford J.A., Wood J. Establishing an acceptable threshold for equine influenza vaccines // Dev. Biol. Stand. – 1992. – Vol. 79. – P. 137-146.

135 Гринин А.С., Титов И.Н. Очистка, концентрирование и фракционирование вирусов животных. - М., 1971. - С. 11.

136 Townsend H.G., Penner S.J., Watts T.C., Cook A., Bogdan J., Haines D.M., Griffin S., Chambers T., Holland R.E., Whitaker-Dowling P., Youngner J.S., Sebring R.W. Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials // Equine Vet. J. – 2001. – Vol. 33. – P. 637-643.

137 Heldens J.G.M., Pouwels H.G.W., van Loon A.A.W.M. Efficacy and duration of immunity of a combined equine influenza and equine herpesvirus vaccine against challenge with an American-like equine influenza virus (A/equi-2/Kentucky/95) // Vet. J. – 2004. – Vol. 167. – P. 150-157.

138 Heldens J.G., Patel J.R., Chanter N., Ten Thij G.J., Gravendijck M., Schijns V.E., Langen A., Schetters T.P. Veterinary vaccine development from an industrial perspective // Vet. J. – 2008. – Vol. 178. – P. 7-20.

139 Савельев И.В. Курс общей физики. – М.: Наука, 1998. – Т. 4. – С. 14-27.

140 Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. - М.: Мир, 1975. – С. 28-55.

141 Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование: практическое пособие. - М.: Наука, 1981. - С. 228.

142 Иоффе Б.В. Рефрактометрические методы химии. - Л.: Химия. – 1974. – С. 45-52.

143 Newton J.R., Lakhani K.H., Wood J.L.N., Baker D.J. Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine // Prev. Vet. Med. – 2000. – Vol. 46. – P. 129-141.

144 Dowling P.W., Youngner J.S. Cold-adapted equine influenza viruses. Patent No. US 7,438,919 B2. – USA. – 2008.

145 Chambers T.M., Holland R.E., Tudor L.R., Townsend H.G., Cook A., Bogdan J., Lunn D.P., Hussey S., Whitaker-Dowling P., Youngner J.S., Sebring R.W., Penner S.J., Stiegler G.L. A new modified live equine influenza virus vaccine: phenotypic stability, restricted spread and efficacy against heterologous virus challenge // Equine Vet. J. – 2001. – Vol. 33 (7). – P. 630–636.

146 Wilson W.D. Equine influenza // Vet. Clin. North. Am. Equine Pract. – 1993. – Vol. 9. – P. 257-282.

147 Breathnach C.C., Rudersdorf R., Lunn D.P. Use of recombinant modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2004. – Vol. 98. – P. 127-136.

148 Adams A.A., Sturgill T.L., Breathnach C.C., Chambers T.M., Siger L., Minke J.M., Horohov D.W. Humoral and cell-mediated immune responses of old horses following recombinant canarypox virus vaccination and subsequent challenge infection // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2011. – Vol. 139. – P. 128-140.

149 Fesenko E.E., Kireyev D.E., Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Grebennikova T.V. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus Influenza Other Respi. // Viruses. – 2007. – Vol.1. – P.121-129.

150 Sultankulova K.T., Chervyakova O.V., Kozhabergenov N.S., Shorayeva K.A., Strochkov V.M., Orynbayev M.B., Sandybayev N.T., Sansyzbay A.R., Vasin A.V. Comparative Evaluation of Effectiveness of IAV chip DNA Microarray in Influenza A Diagnosis // Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal. – 2014. – P. 254-265.

151 Schena M. Genome analysis with gene expression microarrays // Bioassays. – 1996. – Vol. 18. – P .427-431.

152 Kessler N., Ferraris O., Palmer K., Marsh W., Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses // J. Clin. Microbiol. –2004. – Vol.42. – P.2173-2185.

153 Бурашев Е.Д, Орынбаев М.Б, Сансызбай А.Р, Копеев С.К. Выделение и идентификация вируса гриппа лошадей, циркулирующих на территории РК // Вестник СемГу имени Шакарима. – 2014. – № 3. – С. 118-122.

154 Gahan, J., Garvey, M., Gildea, S., Gür, E., Kagankaya, A., and Cullinane, A. Whole-genome sequencing and antigenic analysis of the first equine influenza virus

identified in Turkey. Influenza Other Respir. // Viruses, 2017. - Vol. 12. – P. 374–385. doi: 10.1111/irv.12485

155 Факторы, влияющие на размножение вирусов. Размножение вирусов в культуре // http://meduniver.com/Medical/Microbiology/910.html. 28.07.18.

156 Rooney J.F., Wohlenberg C., Cremer K.J., Moss B., Notkins A.L. Immunization with a vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D: long-term protection and effect of revaccination // J. Virol. – 1988. – Vol. 62. – P. 1530-1534.

157 Kanesa-thasan N., Smucny J.J., Hoke C.H., Marks D.H., Konishi E., Kurane I., Tang D.B., Vaughn D.W., Mason P.W., Shope R.E. Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus-poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans // Vaccine. – 2000. – Vol. 19. – P. 483-491.

158 Lunn D.P., Soboll G., Schram B.R., Quass J., McGregor M.W., Drape R.J., Macklin M.D., McCabe D.E., Swain W.F., Olsen C.W. Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza virus hemagglutinin gene // Vaccine. – 1999. – Vol. 17. – P. 2245-2258.

159 Soboll G., Nelson K.M., Leuthner E.S., Clark R.J., Drape R., Macklin M.D., Swain W.F., Olsen C.W., Lunn D.P. Mucosal co-administration of cholera toxin and influenza virus hemagglutinin-DNA in ponies generates a local IgA response // Vaccine. – 2003. – Vol. 21. – P. 3081-3092.

160 Температурный режим культивирования вирусов // http://meduniver.com/Medical/ Microbiology/914.html. 14.09.18.

161 Paillot R., Hannant D., Kydd J.H., Daly J.M. Vaccination against equine influenza: Quid novi? // Vaccine. – 2006. – Vol. 24. – P. 4047-4061.

162 Maeda Y., Hatta M., Takada A., Watanabe T., Goto H., Neumann G., Kawaoka Y. Live bivalent vaccine for parainfluenza and influenza virus infections // J. Virol. – 2005. – Vol. 79. – P. 6674-6679.

163 Thorne H.V. Electrophoretic characterization and fractionation of Polyoma virus DNA // J. Mol.Biol. - 1967. - Vol.24. - P. 203-211.

164 Quinlivan M., Zamarin D., García-Sastre A., Cullinane A., Chambers T., Palese P. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein // J. Virol. – 2005. – Vol. 79. – P. 8431-8439

165 Табынов К.К., Асанжанова Н.Н., Рыскельдинова Ш.Ж., Кожамкулов Е.М., Инкарбеков Д.А., Кыдырбаев Ж. Комиссионные испытания технологии изготовления, физических и иммунобиологических характеристик новой живой холодоадаптированной вакцины против гриппа лошадей // Биотехнология. Теория и практика. – 2016. – № 1. – P. 33-40.

166 Chervyakova O.V., Strochkov V.M., Tailakova E.T., Sultankulova K.T., Sandybayev N.T., Sansyzbay A.R., Gorev N.E., Sergeeva M.V., Potapchuk M.V., Repko I.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I. Recombinant Strain A/HK/Otar/6:2/2010 (H3N8) for development of a live intranasal equine influenza vaccine // J. Equine Vet. Sci. – 2014. – Vol. 34. – P. 749-758.

167 Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Assanzhanova N., Sansyzbay A. Duration of the protective immune response after prime and booster vaccination of

yearlings with a live modified cold-adapted viral vaccine against equine influenza // Vaccine. – 2014. – Vol. 32 (25). – P. 2965-2971.

168 Ландсберг Г.С. Оптика. - М.: Наука, 1976. – С. 38-45.

169 Mumford J.A., Wood J. Establishing an acceptable threshold for equine influenza vaccines // Dev. Biol. Stand. – 1992. – Vol. 79. – P. 137-146.

170 Townsend H.G., Penner S.J., Watts T.C., Cook A., Bogdan J., Haines D.M., Griffin S., Chambers T., Holland R.E., Whitaker-Dowling P., Youngner J.S., Sebring R.W. Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials // Equine Vet. J. – 2001. – Vol. 33. – P. 637-643.

171 Heldens J.G.M., Pouwels H.G.W., van Loon A.A.W.M. Efficacy and duration of immunity of a combined equine influenza and equine herpesvirus vaccine against challenge with an American-like equine influenza virus (A/equi-2/Kentucky/95) // Vet. J. – 2004. – Vol. 167. – P. 150-157.

172 Lai A. C., Chambers T. M., Holland R. E. Jr., Morley P. S., Haines D. M., Townsend H. G., et al. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the western hemisphere // Arch. Virol. – 2001. - Vol.146. – P. 1063–1074. doi: 10.1007/s007050170106.

173 Perdue M.L., Garcia M., Senne D., Fraire M. Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses // Virus Research. – 1997. – Vol. 49. - P. 173-186.

174 Бурашев Е.Д., Султанкулова К.Т., Кожабергенов Н.С., Садикалиева С.О., Орынбаев М.Б., Сандыбаев Н.Т., Зайцев В.Л. Морфометрия и некоторые физические характеристики вируса гриппа лошадей, выделенных на территории Республики Казахстан // Вестник КазНУ. Серия экологическая. - 2018. - № 1(54). - С. 62 – 70.

175 Eckert E.A. Properties of an Antigenic Glycoprotein isolated from influenza Virus Hemagglutinin // J. of Virol., - 1973. – Vol. 11. – P. 183-192.

176 Бурашев Е.Д., Тленчиева Т.М., Султанкулова К.Т., Нурабаев С.Ш., Кожабергенов Н.С., Сандыбаев Н.Т., Строчков В.М. Подбор праймеров и секвенирование поверхностных антигенов НА и NA вируса гриппа лошадей // XIV Международная научно-практическая конференция «Научный форум: медицина, биология и химия». -2018. - № 6 (14). – С. 6 – 12.

177 Burashev Y.D., Sultankulova K.T., Strochkov V.M., Sansyzbay A.R., Sandybayev N.T., Orynbayev M.B. Phylogenetic analysis of surface HA gene, of equine influenza A/equine/LKZ/09/2012 (H3N8) virus strains // Вестник КазНУ, Серия экологическая. – 2018. - № 3(56). – С. 124 -131.

178 Auburn R.P., Kreil D.P. Robotic spotting of cDNA and oligonucleotide microarrays // Trends in Biotechnology. – 2005 – Vol. 7. – P. 374-379.

179 Causton H.C., Quackenbush J., Brazma A. A beginner's guide: Microarray gene expression data analysis // Blackwell Publishing. – 2003. – 160 p.

180 Kulyaisan T. Sultankulova, Nurlan S. Kozhabergenov, Vitaliy M. Strochkov, Yerbol D. Burashev, Kamshat A. Shorayeva, Olga V. Chervyakova, Nurkuisa M. Rametov, Nurlan T. Sandybayev, Abylay R. Sansyzbay and Mukhit B. Orynbayev. New oligonucleotide microarray for rapid diagnosis of avian viral diseases // Virology Journal. – 2017. – P. 6-11. DOI 10.1186/s12985-017-0738-0

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ
«БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК
ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ–
ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ»
республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

080409, Жамбыл облысы, Кордай ауданы,
Гвардейский к.т.к., тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»
республиканское государственное предприятие

080409, Жамбылская область, Кордайский район,
п.г.т. Гвардейский, тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

08 11 2012 ж.
№ 09-07/875

СПРАВКА
о депонировании штамма A/equine/Matybulak/10/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей

Авторы: Орынбаев М.Б., Сансызбай А.Р., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Омарова З., Калдыбаев Д.С., Султанкулова К.Т., Зайцев В.Л., Строчков В.М., Бурашев Е.Д. (РГП НИПББ КН МОН РК)

Штамм A/equine/Matybulak/10/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей, выделен в 2012 году из носоглоточных смывов больных лошадей из частных хозяйств с. Матыбулак, Жамбылского района, Алматинской области, путем последовательных пассажей на эмбрионах кур.

Штамм относится семейству Orthomyxoviridae, роду Influenzavirus типа А, подтипу H3N8 вируса гриппа лошадей и предполагается использовать для изучения биологических и молекулярно-генетических свойств, приготовления диагностических и профилактических препаратов.

Дата депонирования 30.10.2012 г. Штамму A/equine/Matybulak/10/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей присвоен регистрационный номер М-10-12/D Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (080409), Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский. тел.: (72636) 7-22-28; (72636) 7-11-57.

Генеральный директор
РГП НИИПББ КН МОН РК А.Р. Сансызбай

Заведующий лабораторией
«Коллекция микроорганизмов»
РГП НИИПББ КН МОН РК М.А. Мамбеталиев

009468

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ «БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ» республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

080409, Жамбыл облысы, Кордай ауданы, Гвардейский к.т.к., тел.: 8/72636/7-22-28, e-mail: ribsp@biosafety.kz

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН КОМИТЕТ НАУКИ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ» республиканское государственное предприятие

080409, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский, тел.: 8/72636/7-22-28, e-mail: ribsp@biosafety.kz

08 11 2012 ж.

№ 09-07/873

СПРАВКА

о депонировании штамма A/equine/LKZ/09/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей

Авторы: Орынбаев М.Б., Сансызбай А.Р., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Омарова З., Калдыбаев Д.С., Султанкулова К.Т., Строчков В.М., Бурашев Е.Д. (РГП НИПББ КН МОН РК)

Штамм A/equine/LKZ/09/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей, выделен в 2012 году из носоглоточных смывов больных лошадей из ТОО «ЛКЗ» Т. Рыскуловского района, Жамбылской области, путем последовательных пассажей на эмбрионах кур.

Штамм относится семейству Orthomyxoviridae, роду Influenzavirus типа А, подтипу H3N8 вируса гриппа лошадей и предполагается использовать для изучения биологических и молекулярно-генетических свойств, приготовления диагностических и профилактических препаратов.

Дата депонирования 30.10.2012 г. Штамму A/equine/LKZ/09/2012 (H3N8) вируса гриппа лошадей присвоен регистрационный номер М-8-12/D Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (080409), Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский. тел.: (72636) 7-22-28; (72636) 7-11-57.

Генеральный директор
РГП НИИПББ КН МОН РК А.Р. Сансызбай

Заведующий лабораторией
«Коллекция микроорганизмов»
РГП НИИПББ КН МОН РК М.А. Мамбеталиев

009469

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ
«БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК
ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ–
ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ»
республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

080409, Жамбыл облысы, Қордай ауданы,
Гвардейский к.т.к., тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»
республиканское государственное предприятие

080409, Жамбылская область, Кордайский район,
п.гт. Гвардейский, тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

09 11 2012 ж.
№ 09-07/872

СПРАВКА
о депонировании штамма A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8) вируса гриппа лошадей

Авторы: Орынбаев М.Б., Сансызбай А.Р., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Омарова З., Калдыбаев Д.С., Султанкулова К.Т., Зайцев В.Л., Бурашев Е.Д., Шалгинбаев Э.К. (РГП НИПББ КН МОН РК)

Штамм A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8) вируса гриппа лошадей, выделен в 2012 году из носоглоточных смывов больных лошадей в ТОО «Казак Тулпары» Костанайского района, Костанайской области, путем последовательных пассажей на эмбрионах кур.

Штамм относится семейству Orthomyxoviridae, роду Influenzavirus типа А, подтипу H3N8 вируса гриппа лошадей и предполагается использовать для изучения биологических и молекулярно-генетических свойств, приготовления диагностических и профилактических препаратов.

Дата депонирования 30.10.2012 г. Штамму A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8) вируса гриппа лошадей присвоен регистрационный номер М-7-12/D Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (080409), Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский. тел.: (72636) 7-22-28; (72636) 7-11-57.

Генеральный директор
РГП НИИПББ КН МОН РК А.Р. Сансызбай

Заведующий лабораторией
«Коллекция микроорганизмов»
РГП НИИПББ КН МОН РК М.А. Мамбеталиев

009470

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ
«БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАУІПСІЗДІК
ПРОБЛЕМАЛАРЫНЫҢ ҒЫЛЫМИ–
ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ»
республикалық мемлекеттік кәсіпорыны

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»
республиканское государственное предприятие

080409, Жамбыл облысы, Қордай ауданы,
Гвардейский к.т.к., тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

080409, Жамбылская область, Кордайский район,
п.гт. Гвардейский, тел.: 8/72636/7-22-28,
e-mail: ribsp@biosafety.kz

08 11 2012 ж.
№ 09-07/874

СПРАВКА
о депонировании штамма A/equine/Baizak/09/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей

Авторы: Орынбаев М.Б., Сансызбай А.Р., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Омарова З., Калдыбаев Д.С., Султанкулова К.Т., Строчков В.М., Бурашев Е.Д. (РГП НИПББ КН МОН РК)

Штамм A/equine/Baizak/09/2012(H3N8) вируса гриппа лошадей, выделен в 2012 году из носоглоточных смывов больных лошадей с. Улгили, Байзакского района, Жамбылской области, путем последовательных пассажей на эмбрионах кур.

Штамм относится семейству Orthomyxoviridae, роду Influenzavirus типа А, подтипу H3N8 вируса гриппа лошадей и предполагается использовать для изучения биологических и молекулярно-генетических свойств, приготовления диагностических и профилактических препаратов.

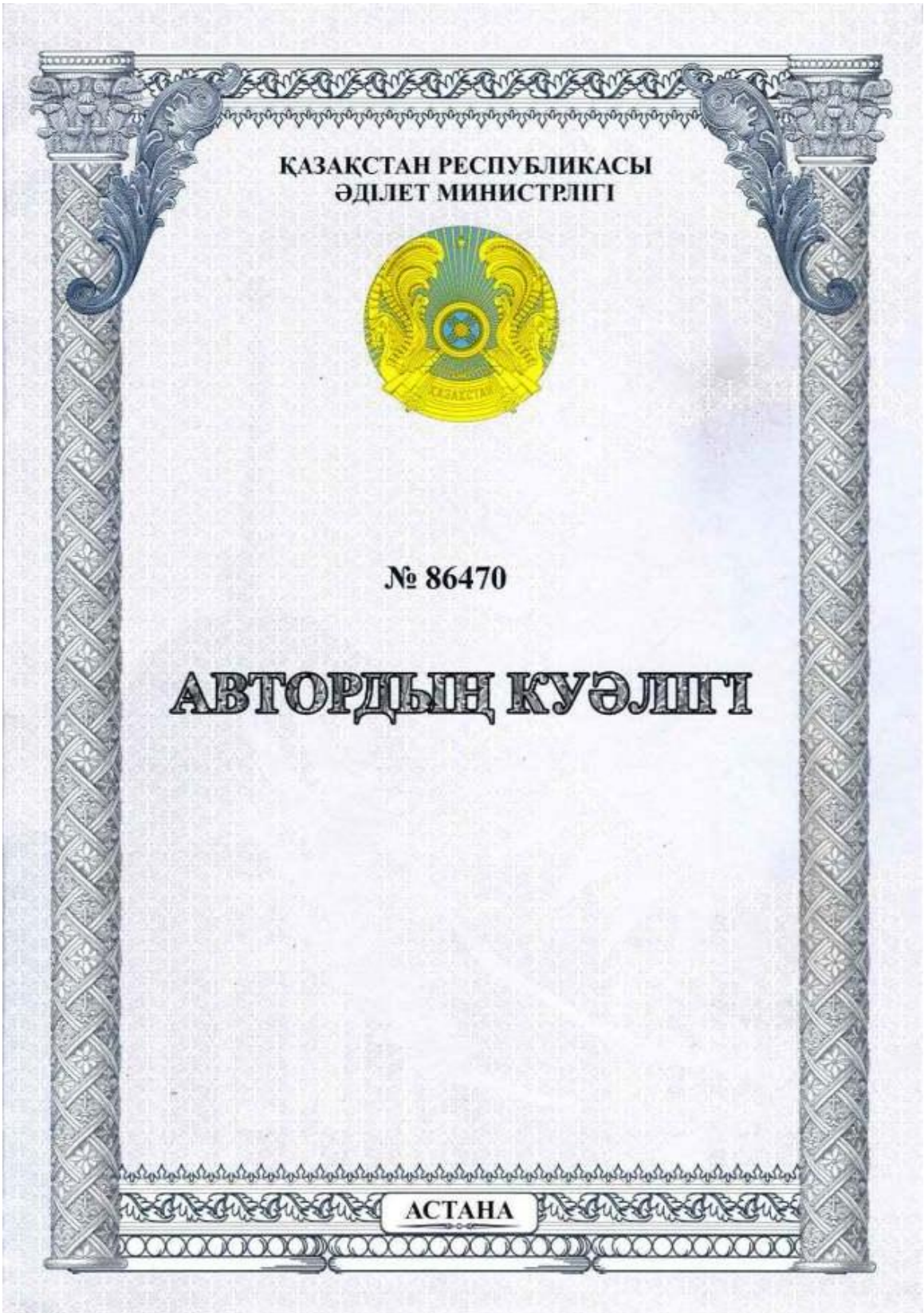
Дата депонирования 30.10.2012 г. Штамму A/equine/Baizak/09/2012 (H3N8) вируса гриппа лошадей присвоен регистрационный номер М-9-12/D Коллекции микроорганизмов Республиканского государственного предприятия «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (080409), Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский. тел.: (72636) 7-22-28; (72636) 7-11-57.

Генеральный директор
РГП НИИПББ КН МОН РК А.Р. Сансызбай

Заведующий лабораторией
«Коллекция микроорганизмов»
РГП НИИПББ КН МОН РК М.А. Мамбеталиев

009471

ПРИЛОЖЕНИЕ Б



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ

№ 86470

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что **Бурашев Ербол Досанович**

и **Орынбаев Мухит Бармакулы; Сансызбай Абылай Рысбайулы; Керимбаев Аслан Амангельдиевич; Копеев Сырым Калдыбаевич; Омарова Замира Даулетовна; Калдыбаев Даулет Серикович; Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна; Строчков Виталий Михайлович**

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 29521

(54) Штамм A/equine/Baizak/09/2012 (H3N8) M-9-11/D вируса гриппа лошадей, семейства Orthomyxoviridae рода Influenzavirus типа A подтипа H3N8, предназначенный для приготовления отечественных иммунобиологических препаратов против гриппа A/H3N8

(73) ***Патентообладатель:*** **Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан**

(21) 2014/0113.1

(22) 03.02.2014

Заместитель министра юстиции Республики Казахстан **Э. Азимова**

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



№ 86670

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

АСТАНА

Бурашев Ербол Досанович

және Орынбаев Мухит Бармакулы; Сансызбай Абылай Рысбайулы; Керимбаев Аслан Амангельдиевич; Копеев Сырым Калдыбаевич; Омарова Замира Даулетовна; Калдыбаев Даулет Серикович; Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна; Строчков Виталий Михайлович

өнертабыс авторы(лары) болып табылатындығы осымен куәландырылады

(11) 29522

(54) Orthomyxoviridae тұқымдастығының Influenzavirus туысының А типінің H3N8 тип тармағына жататын, A/H3N8 жылқы тұмауына қарсы отандық иммунды-биологиялық препараттарды әзірлеу үшін ариалған вирусының A/equine/Kostanai/09/2012 (H3N8) M-7-12/D штаммы

(73) *Патент иеленушісі:* Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің "Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорны

ЮСТИЦИЯ

(21) 2014/0114.1

(22) 03.02.2014

Қазақстан Республикасы
Әділет министрінің орынбасары

Э. Әзімова

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



№ 86679

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что **Бурашев Ербол Досанович**

и Орынбаев Мухит Бармакулы; Сансызбай Абылай Рысбайулы; Керимбаев Аслан Амангельдиевич; Копеев Сырым Калдыбаевич; Омарова Замира Даулетовна; Калдыбаев Даулет Серикович; Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна; Строчков Виталий Михайлович

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 29523

(54) Штамм A/equine/LKZ/09/2012 (H3N8) M-8-12/D вируса гриппа лошадей, семейства Orthomyxoviridae рода Influenzavirus типа А подтипа H3N8, предназначенный для приготовления отечественных иммунобиологических препаратов против гриппа A/H3N8

(73) ***Патентообладатель:*** **Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан**

(21) 2014/0115.1

(22) 03.02.2014

Заместитель министра юстиции Республики Казахстан **Э. Азимова**

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



№ 86688

АВТОРДЫҢ КУӘЛІГІ

АСТАНА

Настоящим удостоверяется, что **Бурашев Ербол Досанович**

и **Орынбаев Мухит Бармакулы; Сансызбай Абылай Рысбайулы; Керимбаев Аслан Амангельдиевич; Копеев Сырым Калдыбаевич; Омарова Замира Даулетовна; Каллыбаев Даулет Серикович; Султанкулова Куляйсан Турлыбаевна; Строчков Виталий Михайлович**

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 29524

(54) Штамм A/equine/Matybulak/10/2012 (H3N8) M-10-12/D вируса гриппа лошадей, семейства Orthomyxoviridae рода Influenzavirus типа A подтипа H3N8, предназначенный для приготовления отечественных иммунобиологических препаратов против гриппа A/H3N8

(73) ***Патентообладатель:*** **Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан**

(21) 2014/0116.1

(22) 03.02.2014

Заместитель министра юстиции Республики Казахстан  **Э. Азимова**