

MPHTI: 34.25.23; 34.25.39; 68.41.53

С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ^{1*}, Т.Б. САБЫРЖАН¹, Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹,
Н.Н. АХМЕТСАДЫКОВ², М.Н. АХМЕТЖАНОВА², Ж.М. БАТАНОВА²,
Е.Я. ХАН¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. КЫДЫРМАНОВ¹

¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

² Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматинская область, Казахстан

*e-mail: nuralibekovs@mail.ru

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА А В ПОПУЛЯЦИИ ЛОШАДЕЙ ЮЖНОГО КАЗАХСТАНА

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.13

Аннотация

В статье описываются подтипы вируса гриппа, вызывающие инфекции среди лошадей, приводится историческая справка об эпизоотиях лошадиного гриппа А, приведены данные о зарегистрированных случаях на территории Казахстана. Описаны данные по серологическому исследованию распространенности гриппа А среди лошадей Туркестанской области.

Ключевые слова: вирус гриппа, эпизоотия, серология, лошади, грипп лошадей.

Грипп лошадей – острое, высококонтагиозное респираторное заболевание семейства лошадиных (Equidae). Возбудители гриппа лошадей – два подтипа вируса: Influenza A/equine2 (H3N8) и Influenza A/equine1 (H7N7) [1, 2]. Вирус гриппа лошадей (ВГЛ) впервые выделен и описан в 1956 г. во время крупной эпизоотии в Чехословакии [3]. Прототипный вирус А/лошадь/Прага/56 имел антигенную формулу H7N7; последняя вспышка, вызванная этим возбудителем, зарегистрирована в 1979 г. В 1963 г. другой, антигенно отличающийся вариант вируса гриппа, подтипа H3N8, вызвал крупную эпизоотию в США [4, 5]. Прототипный вирус А/лошадь/Майями/63 попал в восприимчивую популяцию животных вместе с импортированными лошадьми из Аргентины [6]. Вирусы гриппа (ВГ), циркулирующие в настоящее время среди лошадей во всем мире, относятся к подтипу H3N8 [1]. Инфекция гриппа лошадей, вызываемая подтипом H7N7, в настоящее время не регистрируется [2]. В 1987 г. вирусы гриппа подтипа Influenza A/equine2 (H3N8) разделены на две самостоятельные эволюционные линии, которые циркулируют в настоящее время: Европейский тип и Американский тип [1, 7]. Второе разделение произошло в начале 2000-х годов, когда возникли представленные до настоящего времени, так называемые Флоридские клады 1 и 2 [8].

Ситуация по ВГЛ в мире остается напряженной: по данным МЭБ широкомасштабные эпизоотии зарегистрированы в Европе (Италия, Эстония) в 2020 г. В 2018–2019 гг. выявлено 299 очагов заболеваний гриппом лошадей в Африке (Нигерия, Сенегал). В 2018 г. вспышки так же зарегистрированы в Латинской Америке (Колумбия, Эквадор) [9].

Грипп лошадей в Республике Казахстан – актуальная проблема в области ветеринарии. Так, в 2007 г. её эпизоотии были зарегистрированы в Южно-Казахстанской, Жамбылской, Алматинской, Карагандинской и Восточно-Казахстанской областях. В августе 2007 г. в коневодческих хозяйствах Алматинской области в ходе массовых респираторных заболеваний и гибели лошадей выделено пять изолятов вируса подтипа H3N8 [10].

Вспышки ВГЛ в РК также отмечались на территории Жамбылской, Костанайской и Южно-Казахстанской областей в 2012 г. [7, 11].

В 2020 г. была зарегистрирована массовая вспышка респираторного заболевания среди непарнокопытных на юге и юго-востоке Казахстана. Клинические признаки характеризовались наличием сильного кашля животных, наиболее тяжелые случаи

наблюдались у ослов (некоторые с летальным исходом). В ходе вирусологического исследования был изолирован вирус гриппа А/Н3N8 от пораженных лошадей и ослов [12]. Данная статья посвящена серологическому анализу степени распространенности гриппа А среди лошадей Туркестанской области.

Материалы и методы

Материалы в виде сывороток крови собраны от 98 голов лошадей в различных коневодческих хозяйствах Туркестанской области в июне 2022 г. Исследования на животных проводились в соответствии с протоколом одобренным местным комитетом по этике научно-производственного центра микробиологии и вирусологии.

Пробы крови для исследований отбирались с помощью вакуумных пробирок системы BD Vacutainer® из яремной вены (*venae jugulares*) лошадей. Место инъекции предварительно дезинфицировали 70%-ным этанолом. Для забора крови использовали иглы размерами 18G×50 мм.

Образцы крови центрифугировали (15 мин при 3000 оборотов/мин), полученную плазму переносили в криоустойчивые полипропиленовые пробирки и транспортировали в жидком азоте (-196°C).

Для обнаружения антител к вирусу гриппа сыворотки лошадей протестированы в иммуноферментном анализе (ИФА) с набором, блокирующим нуклеопротеид вируса гриппа А (IDEXX InfluenzaA Ab Test Kit, США). Все этапы работы выполнили согласно инструкции изготовителя. Образцы сывороток предварительно были разведены 1:10 в входящем в набор буфере для разбавления. Анализ результатов выполнен с применением микропланшетного ридера (Infinite 200 PRO, Tecan, Швейцария) с длиной волны 650 нм. Полученные результаты оценивались путем расчёта отношения значения оптической плотности (ОП) образца к значению ОП отрицательного контроля. Пробы сывороток с оптической плотностью меньше 0,6 считались положительными.

Далее пробы сывороток, положительные в ИФА на наличие IgG к NP белку вируса гриппа А, дополнительно исследовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) для идентификации антител (антигемагглютинов) к подтипам гемагглютининов (НА) [13]. Анализ РТГА проводили на микротитровальных планшетах с использованием 0,5% взвеси куриных эритроцитов и 4 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) доступных вирусных антигенов: А/свинья/Алматы/87/2014 (H1N1), А/озерная чайка/Атырау/2010 (H1N2), А/утка/Калифорния/72 (H3N8), А/фламинго/Актау/6570/2015 (H5N1), А/FPV/Росток/34 (H7N7), А/лебедь-кликун/Сорбулак/7994/2019 (H9N2), А/шилохвость/Северный Казахстан/6401/2014 (H10N7). Реакция сопровождалась контролем антигена, эритроцитов и испытуемых сывороток. Серопозитивными в РТГА считали сыворотки крови, ингибирующие гемагглютинирующую активность референсных и казахстанских вариантов вирусов гриппа А с различными подтипами НА в титрах 1:20 и более.

Результаты и обсуждение

Проведены серологические исследования в ИФА 98 сывороток лошадей, собранных в 2022 году на присутствие антител к вирусам гриппа А.

Результаты анализа сывороток приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты иммуноферментного анализа сывороток

Район сбора сывороток	Количество исследованных сывороток	Количество положительных сывороток на ИФА	РТГА+
1	2	3	4
Арысь	10	5	0

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Байдибек би	30	1	1
Казыгурт	10	2	2
Отырар	10	6	6
Рыскулова	10	2	2
Сарыагаш	18	3	3
Толе би	10	1	1

Как видно из таблицы, в сыворотках крови лошадей, собранных в 2022 г., антитела к NP-белку вируса гриппа А обнаружены в 20 из 98 образцов (20,4%), что указывает на интенсивную экспозицию вирусом гриппа лошадей Туркестанской области: в Арысе и в Отырарском районе процент положительных проб составлял 50% и 60%, соответственно.

В РТГА осуществлена дифференциация подтипов антигемагглютининов ИФА-положительных на NP-белок ВГ А сывороток лошадей с помощью набора антигенов к семи различным подтипам вируса А.

Способность к гемагглютинации сывороток до $\frac{1}{2}$ гомологичного титра нейтрализовалась референсным вариантом вируса Н3 (таблица 2).

Таблица 2 - Наличие специфических антигемагглютининов к вирусам гриппа А в сыворотках крови лошадей, собранных в Туркестанской области в 2022 г.

Название ИФА положительных сывороток лошадей	Антигены вируса гриппа А подтипов						
	H1N1	H1N2	H3N8	H5N1	H7N7	H9N2	H10 N7
Арысь / 3	40	–	–	–	–	–	–
Арысь / 6	40	–	–	–	–	–	–
Арысь / 7	40	–	–	–	–	–	–
Арысь / 10	40	–	–	–	–	–	–
Арысь / 20	40	–	–	–	–	–	–
Байдибек би / 4	–	–	160	–	–	–	–
Казыгурт / 17	–	–	640	–	–	–	–
Казыгурт / 41	–	–	640	–	–	–	–
Отырар / 8	–	–	640	–	–	–	–
Отырар / 10	–	–	640	–	–	–	–
Отырар / 11	–	–	640	–	–	–	–
Отырар / 13	–	–	320	–	–	–	–
Отырар / 15	–	–	640	–	–	–	–
Отырар / 17	–	–	640	–	–	–	–
Рыскулова / 20	–	–	640	–	–	–	–
Рыскулова / 27	–	–	640	–	–	–	–
Сарыагаш / 3	–	–	320	–	–	–	–
Сарыагаш / 5	–	–	640	–	–	–	–
Сарыагаш / 9	–	–	160	–	–	–	–
Толе би / 7	–	–	320	–	–	–	–

В результате исследований в РТГА антитела к вирусам гриппа А с подтипами НА: Н1, Н5, Н7, Н10 – в сыворотках не выявлены. Антигемагглютинины к вирусу А/лошадь/ЮКО/236/2012 (Н3N8) обнаружены в сыворотках лошадей всех административных районов, кроме г. Арысь, в титрах 1:160-1:640. Десять сывороток, показавших наивысший титр, собраны от животных Казыгуртского, Отырарского, Рыскуловского, Сарыагашского районов Туркестанской области.

Способность к гемагглютинации изолята А/свинья/Алматы/87/2014 (Н1N1) в титрах 1:40 нейтрализовалась пятью сыворотками, выделенными из г. Арысь Туркестанской

области. При этом, данные образцы не распознавались антисыворотками к подтипу А/озерная чайка/Атырау/4378/10 (H1N2). Следовательно, подавление НА вируса было вызвано не специфическим к H1 антигемагглютинином, а стерическим эффектом нейраминидазы вируса, которые взаимодействуют с антителами при постановке РТГА. В связи с этим, можно предположить, что у пяти вышеуказанных сывороток отсутствовали антигемагглютинины ко всем вирусам, взятым в эксперимент. Это свидетельствует о возможности инфицирования лошадей ВГ А подтипами H4, H6, H8, H12, либо об их заражении ранее неизвестными вариантами вируса гриппа.

За последние два года в Туркестанской области отсутствовали официальные сообщения о вспышках ВГЛ. У всех лошадей не наблюдалось признаков заболевания, отсутствовал кашель; болезнь проходила без сильных симптомов. Наличие антител к вирусу гриппа А/H3 в сыворотках лошадей указывает на вероятность инфицирования животных эпизоотически актуальным вариантом вируса. Далее, учитывая высокие титры антител к серотипу А/лошадь/ЮКО/236/2012 (H3N8), можно сделать вывод о недавней циркуляции вируса гриппа А в популяции лошадей Туркестанской области без выраженных респираторных симптомов.

Финансирование

Исследование финансируется Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (ПЦФ BR10764975 «Разработать и предложить для производства средства и методы диагностики, профилактики болезней, терапии инфицированных животных и обеззараживания почвенных сибиреязвенных очагов»).

Литература:

- 1 Lai A.C., Chambers T.M., Holland R.E., Jr Morley P.S., Haines D.M., Townsend H.G., & Barrandeguy M. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Archives of virology*, 2001, 146(6):1063-1074 (DOI: 10.1007/s007050170106).
- 2 Karamendin K., Kydyrmanov A., Sayatov M., Strochkov V., Sandybayev N., Sultankulova K., Retrospective Analysis of the Equine Influenza Virus A/Equine/Kirgizia/26/1974 (H7N7) Isolated in Central Asia. *Pathogens*, 2016, 5(3):55 (doi:10.3390/pathogens5030055).
- 3 Sovinová O., Tumová B., Pouska F. et al Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol*, 1958, 2(1):52-61.
- 4 Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1963, 143:587-90.
- 5 Жуматов К. Х., Саятов М. Х. Антигенный дрейф и молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа А/H3 диких птиц, млекопитающих животных и человека. *Вестник Национальной Академии наук РК*, 2013, 2:31-38.
- 6 Scholtens R.G., Steele J.H. U.S. epizootic of equine influenza, 1963. *Public Health Rep.* – *Washington*, 1964, 79(5):393-402.
- 7 Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Khan E., Daulbayeva K., Asanova S., Zhumatov K., Seidalina A., Sayatov M., Fereidouni S.R. Continuing evolution of equine influenza virus in Central Asia, 2007-2012. *Arch Virol.*, 2014, 159(9):2321-7 (doi: 10.1007/s00705-014-2078-3).
- 8 OIE. Conclusions and recommendations from the Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines. *Office International des Epizooties Bulletin*, 2008, 2:42-45.
- 9 OIE. 2020. <http://www.oie.int>
- 10 Кыдырманов А.И., Кумекбаева Ж.Ж., Карамендин К.О. и др. Изоляция вируса гриппа А (H3N8) от лошадей в Казахстане в 2007 г. *Ветеринария*, 2009, 1(5):52-54.
- 11 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Sansyzbay A., Sandybayev N., Nurabayev S., Savitskaya I., Rock D.L., Tulman E.R. Complete Genome Sequencing of Two Equine Influenza A(H3N8) Virus Strains Isolated in Kazakhstan. *Genome Announc*, 2018, 6(26):e00574-18 (doi: 10.1128/genomeA.00574-18).
- 12 Khan Y., Suleymenova S., Kassymbekov Y., Karamendin K., Daulbayeva K., Yessentureeva M. and Kydyrmanov A. Equine influenza outbreaks in Kazakhstan in 2020. *Equine veterinary Journal*, 2021, 53(S56):74 (https://doi.org/10.1111/evj.114_13495).

13 Pedersen JC. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol.*, 2014, 1161:11-25 (doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2).

С.Ш. НУРАЛИБЕКОВ^{1*}, Т.Б. САБЫРЖАН¹, Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹,
Н.Н. АХМЕТСАДЫКОВ², М.Н. АХМЕТЖАНОВА², Ж.М. БАТАНОВА²,
Е.Я. ХАН¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹, А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹

¹ Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан
² «Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Алматы облысы, Қазақстан
*e-mail: nuralibekovs@mail.ru

ОҢТҮСТІК ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ЖЫЛҚЫЛАР АРАСЫНДАҒЫ А ТҰМАУ ВИРУСЫ АЙНАЛЫМЫНА СЕРОЛОГИЯЛЫҚ МОНИТОРИНГ ЖҮРГІЗУ

Түйін

Мақалада жылқылар арасында жұқпалы ауру тудыратын тұмау вирусының типтармақтары сипатталған, жылқы тұмауының А эпизоотиясы туралы тарихи мәліметтер берілген және Қазақстанда тіркелген жағдайлар туралы деректер жарияланған. Түркістан облысындағы жылқылар арасында А тұмауының таралуын серологиялық зерттеу деректері сипатталған.

Кілтгі сөздер: тұмау вирусы, эпизоотия, серология, жылқы, жылқы тұмауы.

IRSTI: 34.25.23; 34.25.39; 68.41.53

S.Sh.NURALIBEKOV^{1*}, T.B. SABYRZHAN¹, Ye.T. KASSYMBEKOV¹,
N.N. AKHMETSADYKOV², M.N. AKHMETZHANOVA², Zh.M. BATANOVA²,
Ye.Ya. KHAN¹, K.O. KARAMENDIN¹, A.I. KYDYRMANOV¹

¹ Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan
² Research and production enterprise "Antigen", Almaty region, Kazakhstan
*e-mail: nuralibekovs@mail.ru

SEROLOGICAL MONITORING OF INFLUENZA A VIRUS CIRCULATION AMONG HORSES OF SOUTHERN KAZAKHSTAN

doi: 10.53729/MV-AS.2023.01.13

Abstract

The article describes the influenza A virus subtypes that cause equine influenza infections; provides a chronicles of equine influenza epizootics and demonstrates the data on registered cases in Kazakhstan. Data on a serological study of the prevalence of influenza A among horses of the Turkestan region are described.

Keywords: influenza virus, epizootic, serology, horses, equine influenza.

Equine influenza is an acute, highly contagious respiratory disease of the *Equidae* family. Equine influenza is caused by two subtypes of the virus: Influenza A/equine2 (H3N8) and Influenza A/equine1 (H7N7) [1, 2]. Equine influenza virus (EIV) was first isolated and described in 1956 during a major epizootic in Czechoslovakia [3]. The prototype virus A/Equine/Prague/56 had the antigenic formula H7N7; the last outbreak caused by this pathogen was registered in 1979. In 1963, another antigenically different variant of the H3N8 influenza virus caused a major epizootic in the United States [4, 5]. The prototype A/Equine/Miami/63 virus entered the susceptible animal population along with imported horses from Argentina [6]. Influenza viruses

(IV) currently circulating in horses worldwide are of the H3N8 subtype [1]. Equine influenza infection caused by the H7N7 subtype is not currently reported [2]. In 1987, influenza viruses of the Influenza A/equine2 (H3N8) subtype were divided into two independent evolutionary lineages that are currently circulating: the European type and the American type [1, 7]. The second separation occurred in the early 2000s, when the so-called Florida clades 1 and 2, presented to date, emerged [8].

The situation with EIV in the world remains intensive: according to the OIE, large-scale epizootics were registered in Europe (Italy, Estonia) in 2020. In 2018-2019, 299 outbreaks of equine influenza were identified in Africa (Nigeria, Senegal). In 2018, outbreaks were also registered in Latin America (Colombia, Ecuador) [9].

Equine influenza in the Republic of Kazakhstan remains an urgent problem in the field of veterinary medicine. So, in 2007, its epizootics were registered in South Kazakhstan, Zhambyl, Almaty, Karaganda and East Kazakhstan regions. In August 2007, five isolates of the H3N8 subtype virus were isolated in horse breeding farms in the Almaty region during mass respiratory diseases and death of horses [10].

Outbreaks of EIV in the Republic of Kazakhstan were also registered on the territory of Zhambyl, Kostanai and South Kazakhstan regions in 2012 [7, 11].

In 2020, a massive outbreak of a respiratory disease was registered among equids in the south and southeast of Kazakhstan. Clinical signs were characterized by the presence of severe coughing of animals, the most severe cases were observed in donkeys (some fatal). During virological study, influenza A/H3N8 virus was isolated from affected horses and donkeys [12]. This article is devoted to a serological analysis of the prevalence of influenza A among horses in the Turkestan region.

Materials and methods

Blood sera were collected from 98 horses in various locations of the Turkestan region, in June 2022. Animal studies were carried out in accordance with the protocol approved by the local ethics committee of the Research and Production Center for Microbiology and Virology.

Blood samples for analysis were taken using vacuum tubes of the BD Vacutainer® system from the jugular vein (*venae jugulares*) of horses. The injection site was preliminarily disinfected with 70% ethanol. For blood sampling, 18G × 50 mm needles were used.

Blood samples were centrifuged (15 min at 3000 rpm), the resulting plasma was transferred into cryoresistant polypropylene vials and transported in liquid nitrogen (-196°C).

To detect antibodies to the influenza virus, horse sera were tested in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a kit that blocks the influenza A virus nucleoprotein (IDEXX InfluenzaA Ab Test Kit, USA). All work steps were performed according to the manufacturer's instructions. Serum samples were previously diluted 1:10 in the dilution buffer included in the kit. The results were analyzed using a microplate reader (Infinite 200 PRO, Tecan, Switzerland) with a wavelength of 650 nm. The results obtained were evaluated by calculating the ratio of the optical density (OD) value of the sample to the OD value of the negative control. Optical density in sera, where values <0.6 were considered positive.

Further, serum samples positive in ELISA for the presence of IgG to the NP protein of the influenza A virus were additionally examined in the hemagglutination inhibition (HI) assay to identify antibodies (antihemagglutinins) to hemagglutinin (HA) subtypes [13]. HI analysis was performed on microtiter plates using 0.5% chicken erythrocyte suspension and 4 hemagglutination units (HAU) of available viral antigens: A/pig/Almaty/87/2014 (H1N1), A/black-headed gull/Atyrau/2010 (H1N2), A/duck/California/72 (H3N8), A/flamingo/Aktau/6570/2015 (H5N1), A/FPV/Rostock/34 (H7N7), A/whooper swan/Sorbulak/7994/2019 (H9N2), A/pintail/Northern Kazakhstan/6401/2014 (H10N7);. The reaction was accompanied by control of the antigen, erythrocytes and test sera. Seropositive in HI assay was considered sera that inhibited the hemagglutinating activity of reference and Kazakh variants of influenza A viruses with different HA subtypes in titers of 1:20 or more.

Results and discussion

Serological studies were carried out in ELISA of 98 horse sera collected in 2022 for the presence of antibodies to influenza A viruses.

The results of the analysis of sera are shown in table 1.

Table 1 - Results of enzyme-linked immunosorbent assay of sera

Serum collection area	Number of tested sera	Number of positive sera for ELISA	HI assay +
Arys	10	5	0
Baidibek bi	30	1	1
Kazygurt	10	2	2
Otyrar	10	6	6
Ryskulov	10	2	2
Saryagash	18	3	3
Tole bi	10	1	1

As can be seen from the table, in the blood sera of horses collected in 2022, antibodies to the NP protein of the influenza A virus were found in 20 of 98 samples (20.4%), which indicates an intense exposure to the equine influenza virus in the Turkestan region: in Arys and in Otyrar district, the percentage of positive samples was 50% and 60%, respectively.

In HI assay, differentiation of subtypes of antihemagglutinins was carried out by ELISA-positive for NP-protein HA of horse sera using a set of antigens to seven different subtypes of Influenza A virus.

The ability to hemagglutinate sera up to 1/2 of the homologous titer was neutralized by the reference variant of the H3 virus (Table 2).

Table 2 - Presence of specific antihemagglutinins to influenza A viruses in horse blood sera collected in the Turkestan region in 2022

Name of ELISA positive horse sera	Antigens of influenza A virus subtypes						
	H1N1	H1N2	H3N8	H5N1	H7N7	H9N2	H10N7
Arys / 3	40	–	–	–	–	–	–
Arys / 6	40	–	–	–	–	–	–
Arys / 7	40	–	–	–	–	–	–
Arys / 10	40	–	–	–	–	–	–
Arys / 20	40	–	–	–	–	–	–
Baidibek bi / 4	–	–	160	–	–	–	–
Kazygurt / 17	–	–	640	–	–	–	–
Kazygurt / 41	–	–	640	–	–	–	–
Otyrar / 8	–	–	640	–	–	–	–
Otyrar / 10	–	–	640	–	–	–	–
Otyrar / 11	–	–	640	–	–	–	–
Otyrar / 13	–	–	320	–	–	–	–
Otyrar / 15	–	–	640	–	–	–	–
Otyrar / 17	–	–	640	–	–	–	–
Ryskulov / 20	–	–	640	–	–	–	–
Ryskulov / 27	–	–	640	–	–	–	–
Saryagash / 3	–	–	320	–	–	–	–
Saryagash / 5	–	–	640	–	–	–	–
Saryagash / 9	–	–	160	–	–	–	–
Tole bi / 7	–	–	320	–	–	–	–

As a result of the study in HI assay, antibodies to influenza A viruses with subtypes HA H1, H5, H7, H10 were not detected in sera. Antihemagglutinins to the A/equine/South Kazakhstan/236/2012 (H3N8) virus were found in the sera of horses from all administrative districts, except for the town of Arys, in titres of 1:160-1:640. Ten sera, which displayed the highest titer, were collected from animals of the Kazygurt, Otyrar, Ryskulov, Saryagash regions of the Turkestan region.

The ability to hemagglutinate isolate A/swine/Almaty/87/2014 (H1N1) in credits 1:40 was neutralized by five sera isolated from the city of Arys, Turkestan region. At the same time, these samples were not recognized by antisera to subtype A/black-headed gull/Atyrau/4378/10 (H1N2). Therefore, the inhibition of the HA virus was not caused by H1-specific antihemagglutinin, probably by the hindrance of the virus neuraminidase, which interacts with antibodies during HI assay. In this regard, it can be assumed that the five above-mentioned sera lacked antihemagglutinins to all viruses taken in the experiment. This indicates the possibility of infection of horses with influenza A virus subtypes H4, H6, H8, and H12, or previously unknown variants of the influenza virus.

Over the past two years, there have been no official reports of EIV outbreaks in the Turkestan region. Any of the horses showed signs of disease, and no cough; the disease course characterized without severe symptoms. The presence of antibodies to the A/H3 influenza virus in the horse sera indicates the likelihood of infection of animals with an epizootic strain of the virus. Further, taking into account the highest titers of antibodies to the serotype A/equine/South Kazakhstan/236/2012 (H3N8), we can assume that the influenza A virus has recently circulated in the horse population of the Turkestan region without expression of severe respiratory symptoms.

Funding

The study is funded by the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (PCF BR10764975 “To develop and propose for production means and methods for diagnosing, preventing diseases, treating infected animals and decontaminating soil anthrax foci”).

References:

- 1 Lai A.C., Chambers T.M., Holland R.E., Jr Morley P.S., Haines D.M., Townsend H.G., & Barrandeguy M. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the Western Hemisphere. *Archives of virology*, 2001, 146(6):1063-1074 (DOI: 10.1007/s007050170106).
- 2 Karamendin K., Kydyrmanov A., Sayatov M., Strochkov V., Sandybayev N., Sultankulova K., Retrospective Analysis of the Equine Influenza Virus A/Equine/Kirgizia/26/1974 (H7N7) Isolated in Central Asia. *Pathogens*, 2016, 5(3):55 (doi:10.3390/pathogens5030055).
- 3 Sovinová O., Tumorá B., Pouska F. et al Isolation of a virus causing respiratory disease in horses. *Acta Virol.*, 1958, 2(1):52-61.
- 4 Waddell G.H., Teigland M.B., Sigel M.M. A new influenza virus associated with equine respiratory disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1963, 143:587-90.
- 5 Zhumatov K. H., Sayatov M. H. Antigennyj drejf i molekulyarno-geneticheskaya izmenchivost' virusov grippa A/H3 dikih ptic, mlekopitayushchih zhivotnyh i cheloveka. *Vestnik Nacional'noj Akademii nauk RK*, 2013, 2:31-38.
- 6 Scholtens R.G., Steele J.H. U.S. epizootic of equine influenza, 1963. *Public Health Rep. – Washington*, 1964, 79(5):393-402.
- 7 Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Khan E., Daulbayeva K., Asanova S., Zhumatov K., Seidalina A., Sayatov M., Fereidouni S.R. Continuing evolution of equine influenza virus in Central Asia, 2007-2012. *Arch Virol.*, 2014, 159(9):2321-7 (doi: 10.1007/s00705-014-2078-3).
- 8 OIE. Conclusions and recommendations from the Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccines. *Office International des Epizooties Bulletin*, 2008, 2:42-45.
- 9 Equine influenza. OIE 2020. Access mode: <http://www.oie.int> (Accessed: 12/20/2022).
- 10 Kydyrmanov A.I., Kumekbaeva Zh.Zh., Karamendin K.O. i dr. Izolyaciya virusa grippa A (H3N8) ot loshadej v Kazahstane v 2007 g. *Veterinariya*, 2009, 1(5):52-54.
- 11 Burashev Y., Strochkov V., Sultankulova K., Orynbayev M., Sansyrbay A., Sandybayev N., Nurabayev S., Savitskaya I., Rock D.L., Tulman E.R. Complete Genome Sequencing of Two Equine

Influenza A(H3N8) Virus Strains Isolated in Kazakhstan. *Genome Announc*, 2018, 6(26):e00574-18 (doi: 10.1128/genomeA.00574-18).

12 Khan Y., Suleymenova S., Kassymbekov Y., Karamendin K., Daulbayeva K., Yessentureeva M. and Kydyrmanov A. Equine influenza outbreaks in Kazakhstan in 2020. *Equine veterinary Journal*, 2021, 53(S56):74 (https://doi.org/10.1111/evj.114_13495).

13 Pedersen JC. Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. *Methods Mol Biol.*, 2014, 1161:11-25 (doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2).