

*На правах рукописи*



**ФОМИНА Светлана Николаевна**

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИРУСА ЯЩУРА  
ТИПА АЗНЯ-1, ШТАММ №1987/АМУРСКИЙ/2005,  
И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ  
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ - СИСТЕМ**

16 00 03 «Ветеринарная микробиология,  
вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология»

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук



**Владимир – 2007**

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении  
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г Владимир

**Научный руководитель** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Михалишин Валерий Васильевич**

**Официальные оппоненты** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Мищенко Владимир Александрович**  
ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья  
животных», г Владимир,

доктор ветеринарных наук, старший  
научный сотрудник,  
**Коломыцев Алексей Александрович**  
ГНУ «Всероссийский научно-  
исследовательский институт ветеринарной  
вирусологии и микробиологии»  
(ВНИИВВиМ), г Покров Владимирской  
области

**Ведущая организация** ГНУ «Всероссийский научно-  
исследовательский и технологический  
институт биологической промышленности»  
(ВНИТИБП), г Щелково Московской  
области

Защита диссертации состоится « 15 » мая 2007 г в 10 часов на  
заседании диссертационного совета при ФГУ «Федеральный центр охраны  
здоровья животных» по адресу 600901, г Владимир, мкр Юрьевец, ФГУ  
«Федеральный центр охраны здоровья животных»

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный  
центр охраны здоровья животных»

Автореферат разослан « 13 » апреля 2006 г

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник

 Г М Семенова

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Ящур является одной из экономически важных болезней животных во всем мире, так как им болеют сельскохозяйственные и дикие животные многих видов (Бойко А А ,1971, Ререр Х , 1971, Бурдов А Н с соавт , 1990, Захаров В М , 2002, Leforban, 2003, Груздев К Н с соавт , 2005) Наряду с непосредственными убытками, причиненными вирусом ящура популяциям животных, ущерб складывается из введения торговых ограничений, которые относятся как к животным, так и к продуктам животного происхождения

Одним из основных методов профилактики ящура является систематическая иммунизация сельскохозяйственных животных инактивированными моно- и поливалентными вакцинами Непременным условием противоэпизоотической эффективности противоящурных вакцин является соответствие антигенных свойств производственного (вакцинного) штамма вируса ящура эпизоотическим штаммам вируса, которое определяется на основании систематического и всестороннего сравнительного изучения антигенных свойств штаммов вируса ящура В результате этой работы решается вопрос о необходимости подготовки нового производственного штамма вируса, или о применении вакцины из ранее используемого для изготовления производственного штамма В случае антигенного отличия эпизоотических штаммов от производственного штамма и наличия угрозы широкого распространения ящура из числа выделенных эпизоотических штаммов производится подготовка нового производственного штамма вируса ящура

Эпизоотии, вызванные вирусом ящура типа Азия-1, наблюдаются в странах Азии, Среднего и Ближнего Востока Вирус этого типа и в настоящее время представляет угрозу для этих регионов, так как вспышки ящура периодически возникают в различных государствах, в том числе и граничащих с нашей страной

Согласно новой редакции «Санитарного кодекса наземных животных МЭБ, 2006 г.» диагноз на ящур устанавливается в случае

- выделения вируса от животных или продуктов животного происхождения,
- выявления антигена вируса ящура или РНК вируса от животных с клиническими признаками ящура или при подозрении на ящур,
- выявления антител к структурным или неструктурным белкам вируса ящура, не связанных с вакцинацией, в случае клинического проявления ящура или при подозрении на ящур

Поэтому особое значение приобретает проблема диагностики и профилактики этой болезни. Опасность, которую представляет ящур, диктует необходимость постоянного совершенствования методов и средств его диагностики, изучения свойств вновь выделенных эпизоотических штаммов возбудителя, определения их эпизоотической опасности и степени соответствия производственным и ранее выделенным штаммам.

Долгие годы методами идентификации вируса ящура были реакции связывания комплемента (РСК) и вируснейтрализация (РН). В качестве биологического метода использовали выделение вируса в лабораторных тест-системах. Совершенно уникальными возможностями обладают некоторые новые методы, такие как, иммуноферментный анализ (ИФА). Для него характерна высокая чувствительность, простота постановки и быстрота получения результата. По специфичности результаты ИФА согласуются с общепринятыми вирусологическими и серологическими методами, а по чувствительности имеют явные преимущества. ИФА позволяет получить больше информации об антигенной структуре вирусов в отличие от традиционных серологических реакций.

В связи с тем, что на Дальнем Востоке России в 2005 г. был зарегистрирован ящур типа Азия-1, который экзотичен для России и занесен из Китая, возникла необходимость изучения штамма вируса ящура типа Азия-1, который был выделен в 2005 г. от заболевших животных. Указанные

вопросы являются актуальными, что и послужило главной целью проведения наших исследований

**Цель и задачи исследований.** Главной целью наших исследований было изучение иммунобиологических свойств вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 и усовершенствование диагностического набора для выявления и идентификации вируса ящура методом иммуноферментного анализа

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи

- изучить иммунобиологические свойства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенного на территории Российской Федерации в 2005 г ,
- подготовить предложения по использованию штамма вируса ящура №1987/Амурский/2005 для изготовления диагностических и вакцинных препаратов,
- получить диагностические препараты на актуальные эпизоотические штаммы вируса ящура для иммуноферментного анализа,
- усовершенствовать набор для идентификации в ИФА производственных и эпизоотических штаммов вируса ящура типов А, О, Азия-1,

#### **Научная новизна.**

Научная новизна состоит в том, что в результате проведенных исследований

Изучены иммунобиологические свойства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенного на территории Российской Федерации в 2005 году, который значительно отличается от вакцинных и ранее изученных эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1;

Изучены основные биологические свойства антигена вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005, используемого для изготовления инактивированной вакцины,

Показаны антигенные взаимоотношения между производственными и эпизоотическими штаммами вируса ящура типа Азия-1,

Получены штаммоспецифические компоненты для иммуноферментного анализа и реакции связывания комплемента на штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005

Усовершенствован диагностический набор для определения антигена вируса ящура иммуноферментным анализом;

Определены оптимальные варианты постановки ИФА при выявлении и идентификации штаммов вируса ящура,

Изучена диагностическая ценность ИФА в сравнении с другими серологическими реакциями, используемыми в лабораторной диагностике вируса ящура

**Практическая ценность работы.** Изученный штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 депонирован в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» и рекомендован для изготовления диагностических препаратов и противоящурной вакцины против этого типа вируса ящура

Получены диагностические препараты с использованием изученного штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005

Усовершенствован и внедрен в производство набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом, ТУ 9388-138-00495527-2005 от 30 06 2006 г.

**Апробация результатов работы.** Результаты исследований по теме диссертации апробированы на научных конференциях «Золотое кольцо России» - 4-й региональной конференции, посвященной проблеме профилактики и лечения домашних животных и птицы. – Владимир, 2001, международной научной конференции, посвященной 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» г Владимир, 2003г., 2-й международной научно-практической конференции

«Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики, как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных», г Ставрополь, 2003г, 6-ом международном конгрессе ветеринарной вирусологии «Эволюция и персистенция вируса», прошедшем в г Сант-Мало во Франции в 2003 году, международной научной конференции молодых ученых «Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных», г Владимир, 2004

«Набор для выявления антигена вируса ящура в пробах материала иммуноферментным анализом» был представлен на выставке продукции ФГУ «ВНИИЗЖ», при проведении Всероссийского научно-практического семинара-совещания ветеринарных специалистов «Эпизоотологический мониторинг, профилактика и меры борьбы с болезнями КРС и свиней», 2005г, г Владимир

Основные положения диссертации были доложены на заседаниях ученого совета ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Адаптационные свойства эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Результаты комплексного изучения антигенного родства штамма вируса ящура Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Получение штаммоспецифических диагностических препаратов на основе штамма Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Результаты практического применения эпизоотического штамма вируса ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/2005
- Диагностический набор для определения антигена вируса ящура методом иммуноферментного анализа и его практическое применение

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 135 страницах, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, список

используемой литературы, практические предложения и приложения. Список литературы включает 157 источников, из них 63 источников иностранных авторов. Работа иллюстрирована 20 таблицами, 3 рисунками. В приложении к диссертации имеется 4 документа, подтверждающих результаты исследований и их внедрение.

*Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории «Ящура и везикулярных болезней», лаборатории «Биотехнологии», лаборатории «Диагностики особо опасных болезней животных», Отделу биологического и технологического контроля, научной библиотеке ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» за практическую помощь при выполнении и оформлении диссертации.*

## 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и методы

**Штаммы вируса ящура.** В исследованиях использовались штаммы вируса ящура А<sub>22</sub> №550, О<sub>1</sub> №194, Азия-1 №48, Азия-1 №1737/Грузия/2000, Азия-1 №1730/Иран58/99, Азия-1 №1731/Таиланд2/95, Азия-1 /Ирак1/73, Азия-1 №1960/Таджикистан/2004, Азия-1/Шамир 3/89, Азия-1/Пакистан1/54.

Впервые выделенный в Российской Федерации штамм вируса ящура типа Азия-1 №1987/Амурский/2005.

**Вакцины.** Вакцины, используемые в данной работе, включали инактивированные сорбированные коммерческие и экспериментальные сыворотки, изготовленные ФГУП «Щелковский биокомбинат» и ФГУ «ВНИИЗЖ», а также инактивированные эмульсионные вакцины производства фирмы «Вауер АГ» (Германия).

**Животные.** В опытах использовался крупный рогатый скот 8 – 10 месячного возраста, черно-пестрой породы, массой 250 – 295 кг. Все животные были получены из благополучных по инфекционным болезням хозяйств Владимирской области.



Для получения штаммоспецифических сывороток, проверки иммуногенности производственной и экспериментальной вакцин, адаптации и титрования вируса ящура использовали клинически здоровых морских свинок массой 400-450 г и кроликов, массой не менее 2,5-3,0 кг.

**Культуры клеток.** В качестве чувствительной тест-системы для титрования вирусов, их репродукции и постановки реакции нейтрализации использовались монослойные культуры перевиваемых клеток почки новорожденного сирийского хомячка (БНК-21), почки сибирского горного козерога (ПСГК-30) и почки свиньи (IB-RS-2), а также культура первично - трипсинизированных клеток почки поросят (СП)

**Оборудование.** В опытах использовались. спектрофотометр - ридер «Униплан» (Россия), CO<sub>2</sub> -инкубатор «Sanyo» (Япония), ламинарный шкаф «Babcock-BSH» (ГДР), инвертированный микроскоп «Olimpus» (Япония)

**Адаптация эпизоотических изолятов вируса ящура к культуре клеток и лабораторным животным.** Адаптацию вируса к культуре клеток и лабораторным животным проводили общепринятым методом.

Вирус считали адаптированным к организму морских свинок, если первичные афты образовывались через 20-26 часов, а генерализация процесса наступала через 48 часов, инфекционная активность не менее 4,5 lg ИД<sub>50</sub>.

Первичную и перевиваемые культуры клеток инокулировали 10% суспензией в дозе 0,1 мл В последующих пассажах для заражения использовали культуральные суспензии Вирус считали адаптированным к культуре клеток, если он вызывал выраженное ЦПД, через 18-24 часа после инфицирования

**Выделение вируса ящура.** Выделение вируса ящура с использованием чувствительных культур клеток осуществляли согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура» утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10 11 2002

**Реакция связывания комплемента.** При выполнении данной работы идентификацию штаммов вируса ящура, определение комплемент-

связывающей активности и специфичности полученных антигенов и сывороток проводили путем постановки РСК в соответствии с ГОСТ 25384 «Методы лабораторной диагностики ящура»

Изучение антигенного родства методом РСК выполняли согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002

**Реакция нейтрализации.** Реакция ставилась на планшетах фирмы «Costar» микрометодом согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002г

**Иммуноферментный анализ.** Выделение вируса ящура в патологического материала методом ИФА выполняли согласно «Временному наставлению по применению набора для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным анализом», разработанному в ФГУ «ВНИИЗЖ» и утвержденному Департаментом ветеринарии МСХ РФ 22.04.2002.

Выявление и определение уровня антител к вирусу ящура в сыворотке крови осуществлялось с помощью «Набора для выявления антител к вирусу ящура иммуноферментным анализом» производства ФГУ «ВНИИЗЖ» согласно «Методическим указаниям по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура», утвержденным Департаментом ветеринарии МСХ РФ 10.11.2002г, коммерческих наборов, полученных из ВСЛ (Пирбрайт, Великобритания)

**Определение иммуногенной активности противоящурных вакцин.** Иммуногенные свойства противоящурных вакцин определяли на основании ТУ 9384-007-00495527-200 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)» от 02.02.2000г

## **2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Изучение иммунобиологических свойств штамма вируса ящура Азия-1 типа №1987/Амурский/2005**

До 2005 года ящур, вызванный вирусом ящура типа Азия-1, не регистрировался на территории Российской Федерации. Однако, в 2005 году ситуация значительно осложнилась, в связи с заносом экзотического для страны, вируса ящура типа Азия-1 в Амурскую область, Хабаровский и Приморский края, Читинскую область.

Первый очаг ящура типа Азия-1 был зарегистрирован в июне 2005 года в с. Буссе Свободненского района Амурской области. В связи с наличием на территории РФ единственного очага ящура типа Азия-1, с учетом действующего законодательства и рекомендаций МЭБ, 18-19 июня 2005 г. все животные в данном неблагополучном пункте были отчуждены и уничтожены.

Однако, во второй половине августа 2005 года новые очаги ящура типа Азия-1 были зарегистрированы почти одновременно еще в двух регионах в Хабаровском и Приморском краях в населенных пунктах, расположенных на границе с Китаем. В это же время поступило сообщение о возникновении ящура и в Монголии.

В Хабаровском крае ящур был установлен в Бикинском и Вяземском районах. Более широкое распространение ящур типа Азия-1 получил в Приморском крае. Всего в 9 неблагополучных по ящуру пунктах Приморского края заболело более 1000 голов КРС.

В декабре 2005г. в Дальневосточном федеральном округе было выявлено два новых неблагополучных по ящуру пункта в двух районах, граничащих с Китаем. Единичные случаи заболевания регистрировали в с. Куприяново Михайловского района Амурской области и в с. Котиково Вяземского района Хабаровского края. В 2006 г. были отмечены вспышки ящура типа Азия-1 в с. Средняя Борзя Калганского района Читинской области и в с. Куропатино

Тамбовского района Амурской области, расположенных вблизи границы Китая

Следует отметить, что исследования, проведенные А В Щербаковым с соавт (2006), показывают, что данные вспышки ящура вызваны вирусом, аналогичным штамму Азия-1 №1987/Амурский/20005

### **Биологические свойства вируса ящура штамма Азия-1 №1987/Амурский/20005**

Из вирусосодержащих материалов (афты), полученных от больного КРС из эпизоотического очага, готовили 10% суспензию материала, которую использовали для заражения клеточных культур СП, ПСГК-30, ВНК-21, IB-RS-2. Культивирование вируса проводили в плоских стеклянных сосудах (матрасах) емкостью 50 и 1500 см<sup>3</sup>

Вирус считали адаптированным, если 90-100% ЦПД в монослое культуры клеток наступало через 18-26 часов после заражения. Полученные результаты представлены в таблице 1

Таблица 1

#### **Биологические свойства эпизоотического штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005.**

Система репродукции вируса	Кол-во пассажей	Время проявления биологической активности, часы	Характеристика адаптированного материала				
			Активность в РСК	Титр вируса, lg 1 ЦД50/мл	Содержание, мкг/мл		
					ОВБ	146S	146 S +75S
СП	3	18-24	1 4	6,0±0 25	-	-	-
ПСГК-30	3	18-20	1 4	6,33±0 25	0,54	0,2	0,29
IB-RS-2	3	18-20	1 8	7 66±0,25	1,4	0,47	1,0
ВНК-21	3	18-20	1 12	8,25±0,25	0,79	0,4	0,68
Морские свинки	6	21-24	-	5,5±0,25	-	-	-

Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу ящура типа Азия-1 №1987 /Амурский/2005 проводили на морских свинках путем

введения вирусосодержащей суспензией в плантарную поверхность задних лапок методом туннелирования. Вирус считали адаптированным к морским свинкам, если в течение 2-3 последовательных пассажей он вызывал у 95% морских свинок образование первичных афт через 18-26 часов, а генерализацию не позднее 5 суток после заражения (таб. 1)

Результаты показывают, что изолят Азия-1 №1987 /Амурский/2005 адаптирован на третьем пассаже, вызывая 100% ЦПД через 18 часов после инокуляции культуры клеток. Комплементсвязывающая активность в РСК составила 1:8 – 1:12. Наибольшее накопление вируса происходит в культуре клеток ВНК-21 и IB-RS-2 в титрах  $7,66-8,25 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$

Кроме того, данный штамм был адаптирован к культурам клеток СП и ПСГК-30. Активность в РСК составила 1:4, вирус накапливается в титрах  $6,33-7,66 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$

У морских свинок полное созревание афт с большим количеством афтозной жидкости на месте введения наблюдали через 21-28 часов после введения вируса на уровне 5-6 пассажа.

### **Изучение антигенного родства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005**

Антигенное родство исследуемого эпизоотического штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 с другими штаммами вируса ящура данного типа изучали в РСК по 100% гемолизу с вычислением «R» по формуле Архетти и Хорсвала. Данные исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории ящура и везикулярных болезней ФГУ «ВНИИЗЖ» к в. н. В. К. Спириным, к в. н. А. И. Егоровой, ветеринарным врачом Т. Ф. Кошецын.

Результаты изучения двустороннего антигенного родства вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 с производственными и эпизоотическими штаммами этого типа, выделенными ранее, представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Антигенный спектр штамма вируса ящура серологического типа****Азия-1 №1987/Амурский/2005 по данным РСК**

Сравниваемые штаммы		Показатели антигенного родства штаммов		
		$r_1$	$r_2$	R%
Азия-1 №48	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,16	0,42	26
Азия-1 №1737/Грузия/2000	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,08	0,22	13
Азия-1 №1730/Иран 58/99	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,07	0,64	23
Азия-1 №1731/Таиланд 2/95	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,22	0,80	42
Азия-1 №1960/Таджикистан/2004	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,28	0,56	40
Азия-1/Шамир 3/89	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,20	0,15	17
Азия-1 /Пакистан 1/54	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,23	0,14	18
Азия-1 /Иран 1/73	Азия-1 №1987/Амурский/2005	0,18	0,60	33

Анализируя данные таблицы 2, следует отметить, что согласно критериям Бруксби (1968) эпизоотический штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 отличается от всех исследованных штаммов вируса ящура типа Азия-1 и значительно отличается от вакцинных штаммов Азия-1 №48 и Азия-1 Шамир 3/89 (R% составило 26% и 17% соответственно) Кроме того, он отличается от ранее выделенных эпизоотических изолятов вируса ящура типа Азия-1.

В связи с тем, что, по данным Всемирной справочной лаборатории, вакцина из штамма Азия-1 /Шамир 3/89 имеет широкий антигенный спектр, нами было проведено определение антигенного родства эпизоотического штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 и этого вакцинного штамма в РН В нашей работе использовались сыворотки крови молодняка КРС, отобранной на 21 сутки после иммунизации двумя сериями моновалентной эмульсионной инактивированной вакцины против ящура типа Азия-1 /Шамир 3/89 и одной серией инактивированной эмульсионной вакциной против ящура типов «А<sub>22</sub>, О, Азия-1» фирмы «Bayer AG»

Вначале сыворотки крови вакцинированных животных исследовались индивидуально в РН и ИФА для определения титра вируснейтрализующих противоящурных антител. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Степень антигенного родства ( $r_1$ ) вируса Азия-1 1987 по отношению к штамму Азия-1 Shamir 3/89**

№№  животных	Наименование вакцины				трехвалентная из штаммов А <sub>22</sub> , О, Азия-1	
	Вакцина из штамма Азия-1 /Шамир 3/89					
	моновалентная №1		моновалентная №2		РН	ИФА
	РН	ИФА	РН	ИФА		
1	0,25	0,26	0,17	0,24	0,35	0,23
2	0,20	0,24	0,28	0,25	0,4	0,25
3	0,25	0,25	0,20	0,20	0,3	0,25
4	0,30	0,2	0,15	0,19	0,36	0,24
5	0,22	0,25	0,22	0,25	0,32	0,21

Некоторые исследователи (Rweymamu М М, 1984, Шажко Ж А, 1986, Мищенко В А, 1988, Paton D J, 2005) считают, что использование индивидуальных проб сывороток крови при определении антигенного родства может стать причиной диагностических ошибок. Поэтому необходимо использовать пул сывороток.

Исходя из этого, каждую группу сывороток (таблица 3) объединяли в пул для нивелирования индивидуальных различий. В пулы входили сыворотки, имеющие приблизительно одинаковые титры антител. Каждую смесь сывороток исследовали в РН с вирусом ящура следующих штаммов: вируса ящура Азия-1/Шамир 3/89, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 №1987/Амурский/2005.

Параллельно с РН сыворотки были исследованы в жидкофазном блокирующем варианте ИФА. В реакции использовались инактивированные

концентрированные антигены штаммов вируса ящура Азия-1 /Шамир 3/89, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 №1987/Амурский/2005

Результаты данных исследований представлены в таблице 4

Таблица 4

**Степень антигенного родства ( $r_1$ ) штаммов вируса ящура Азия-1**

№ пула иммунных сывороток к вирусу ящура штамм Азия-1 /Шамир 3/89	Азия-1 №1987/Амурский/2005		Азия-1 Иран 58/99	
	РН	ИФА	РН	ИФА
1 пул	0,25	0,25	0,7	0,5
2 пул	0,18	0,25	0,5	0,5
3 пул	0,35	0,25	0,7	0,5

В результате проведенных опытов установлено значение антигенного родства –  $r_1$ , равное 0,25 в ИФА для штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005, что по критериям D J Paton (2005) свидетельствует о значительном отличии эпизоотического изолята от вакцинного штамма, следовательно вакцина, изготовленная из штамма Азия-1 Шамир 3/89, не будет защищать от полевого изолята Азия-1 №1987/Амурский/2005

Полученные данные исследования совпадают с результатами опытов осуществленными в лаборатории диагностики особо опасных болезней животных ФГУ «ВНИИЗЖ», А В Щербаков с соавт (2006) Результаты филогенетического анализа показали, что изоляты вируса ящура, выделенные в Амурской области, Хабаровском и Приморском краях, значительно отличаются от вакцинного штамма, а также от эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1, выделенных до 2005г



## Изучение иммунобиологических свойств вируса ящура Азия-1

### №1987/Амурский/2005 на морских свинках

При сравнительной оценке иммуногенной активности использовалась экспериментальная моновалентная инактивированная сорбированная вакцина из штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005. Иммуногенную активность данной вакцины сравнивали с моновалентной сорбированной вакциной из штамма Азия-1 Иран 58/99.

При определении иммуногенной активности каждого препарата использовали по 128 морских свинок и 4 группы морских свинок, по 6 животных в каждой, для контроля. Вакцины инокулировали в цельном виде и в разведении 1:3, 1:9 и 1:27, разведения делали на фосфатном буферном растворе. Каждое разведение вакцины вводили 8 морским свинкам, которых содержали в отдельных вольерах.

Вакцину вводили внутримышечно в объеме 2 см<sup>3</sup> в область правого и левого бедра по 1 см<sup>3</sup> одновременно.

Каждую вакцину исследовали на иммуногенную активность против вирусов ящура Азия-1 №48; Азия-1 /Иран 58/99, Азия-1 «Шамир» и Азия-1 №1987/Амурский/2005, адаптированных к организму морских свинок. Всем вакцинированным животным через 21 сутки после иммунизации и контрольным животным вводили вирус интрадермально в плантарную поверхность правой задней лапки в дозе 10<sup>4</sup> ГД<sub>50</sub>/0,1 см<sup>3</sup>. Учет результатов заражения проводили через 3, 5 и 7 суток и оценивали по генерализации ящурного процесса на передних и левой задней лапках. Генерализацией считали образование вторичных афт хотя бы на одной лапке, в которую не вводили вирус. Контроль вакцины считали действительным, если контрольные животные заболевали генерализованной формой ящура.

Результаты изучения иммуногенной активности моновалентных инактивированных противоящурных вакцин из штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 и штамма Азия-1 Иран 58/99, при контрольном

заражении гомологичными и гетерологичными вирусами морских свинок (МС) представлены в таблице 5

Таблица 5

**Перекрестное испытание на морских свинках иммуногенной активности  
вакцины из вируса ящура Азия-1 Иран 58/99 и вируса ящура Азия-1  
№1987/Амурский/2005**

Штаммы ВЯ Азия-1 для контрольного заражения	Вакцина из штамма вируса ящура Азия-1 Иран 58/99				Вакцина из штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005			
	ИмД <sub>50</sub>	г <sub>1</sub> по ИмД <sub>50</sub>	ПД <sub>50</sub>	г <sub>1</sub> по ПД <sub>50</sub>	ИмД <sub>50</sub>	г <sub>1</sub> по ИмД <sub>50</sub>	ПД <sub>50</sub>	г <sub>1</sub> по ПД <sub>50</sub>
№48	0,072	0,75	27,78	0,75	0,23	0,2	8,69	0,2
Иран 58/99	0,054	1	37,04	1	0,23	0,2	8,69	0,2
/Памир 3/89	0,063	0,86	31,75	0,86	0,065	0,69	30,76	0,69
№1987 /Амурский/2005	0,098	0,55	20,41	0,55	0,045	1	42,5	1

Примечание ИмД<sub>50</sub> – 50% иммунизирующая доза в прививном объеме для МС,  
ПД<sub>50</sub> – 50% протективная доза в прививном объеме для МС

Из приведенных в таблице 5 данных видно, что в прививном объеме вакцины из штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005 содержалось 42,5 ПД<sub>50</sub>МС к гомологичному штамму, а к гетерологичным - Азия-1 №48 - 8,69 ПД<sub>50</sub>МС, Азия-1 /Иран 58/99 – 8,69 ПД<sub>50</sub>МС, Азия-1 «Шамир» - 30,76 ПД<sub>50</sub>МС

В то же время количество ПД<sub>50</sub>МС в прививной дозе вакцины из штамма Азия-1 Иран 58/99 по отношению к гомологичному возбудителю составляет 37,04 ПД<sub>50</sub>МС, а к гетерологичным Азия-1 №48 – 27,78 ПД<sub>50</sub>МС, Азия-1 «Шамир» - 31,75 ПД<sub>50</sub>МС и Азия-1 №1987/Амурский/2005 – 20,41 ПД<sub>50</sub>МС соответственно

Проведенные исследования показывают, что штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 по иммунобиологическим свойствам отличается от штаммов Азия-1 №48, Азия-1 /Иран 58/99, Азия-1 «Шамир» ( $g_1 = 0,2, 0,2, 0,69$  соответственно)

Вакцина из штамма Азия-1 Иран 58/99 иммуногенна в отношении гетерологичных штаммов Азия-1 №48, Азия-1 «Шамир» и менее иммуногенна в отношении штамма Азия-1 №1987/Амурский/2005.

### **Результаты изучения иммунологических свойств инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов $O_1 - A_{22} - \text{Азия-1}$**

В связи с возникновением вспышек ящура типа Азия-1, вызванных отличающимся возбудителем (степень антигенного родства по данным РСК 26%), была изучена иммуногенность и протективная активность коммерческой инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов  $A_{22} - O_1 - \text{Азия-1}$  на крупном рогатом скоте

С этой целью были сформированы две партии животных по 17 голов в каждой. Каждая партия животных содержалась в отдельном боксе. Животных в каждой партии разделили на 4 группы, три группы по 5 животных и одна группа по 2 головы – контрольная группа.

Группы по 5 голов были иммунизированы в дозах 2,0 см<sup>3</sup>, 0,5 см<sup>3</sup>, 0,125 см<sup>3</sup>, контрольные животные не иммунизировались.

На 21 сутки после иммунизации одну партию животных заразили производственным штаммом вируса ящура, гомологичным возбудителю, используемому в вакцине. Вторая партия животных была заражена эпизоотическим вирусом (Азия-1 № 1987/Амурский/2005).

На восьмые сутки после контрольного заражения провели отбор проб крови от всех животных и убой животных с их последующим патологоанатомическим исследованием.

Результаты опытов по определению иммунологической активности коммерческой серии сорбированной противоящурной вакцины против гомологичного и гетерологичного штаммов вируса ящура Азия-1 приведены в таблице 6.

Таблица 6

**Иммунологическая активность коммерческой инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов О<sub>1</sub> – А<sub>22</sub> – Азия-1 против гомологичного и гетерологичного штаммов вируса ящура Азия-1**

Вирус ящура типа Азия-1 для контрольного заражения	Титры антител (log <sub>2</sub> ) в сыворотках крови КРС, привитых вакциной в дозе 2 0 см <sup>3</sup> к вирусу				Результаты контрольного заражения			ПД <sub>50</sub>
	Производствен- ный №48		Азия-1 № 1987 /Амурский/2005		Прививная доза вакцины (см <sup>3</sup> )			
	РН	ИФА	РН	ИФА	2 0	0 5	0 125	
Производствен- ный №48	7,6	7,0	5 3	5,0	4/5	4/5	3/5	10 56
Эпизоотический Азия-1 № 1987/ Амурский/2005	5,2	5,0	7 4	7,0	3/5	2/5	2/5	3 5

Примечание *числитель* – количество животных устоявших против прямого заражения штаммом вируса ящура Азия -1 №1987/ Амурский/2005,  
*знаменатель* – всего животных в группе

Представленные в таблице 6 данные свидетельствуют о том, что в прививной дозе вакцины содержалось 10,56 ПД<sub>50</sub> к производственному штамму вируса ящура и только 3,5 ПД<sub>50</sub> к эпизоотическому штамму вируса

На основании полученных данных нами была определена степень одностороннего антигенного родства по протективному действию инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов А<sub>22</sub> - О<sub>1</sub> – Азия-1 Результаты исследования степени антигенного родства представлены в таблице 7

Таблица 7

**Степень одностороннего антигенного родства производственного и эпизоотического штаммов вируса ящура типа Азия-1**

Вирус ящура для контрольного заражения	Г <sub>1</sub>				по ПД <sub>50</sub>
	производственный		Азия-1 № 1987/Амурский/2005		
	РН	ИФА	РН	ИФА	
производственный	1	1	0,23	0,25	0,33
Азия-1 № 1987/Амурский/2005	0,19	0,25	1	1	

Полученные данные, обобщенные в таблице 7 показывают, что штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 значительно отличается от ранее выявленных штаммов вируса ящура типа Азия-1

В завершении работы по изучению иммунобиологических свойств вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 были обобщили данные по степени антигенного соответствия ( $\gamma_1$ ) эпизоотического возбудителя с производственными штаммами вируса ящура типа Азия-1 – таблица 8

Таблица 8

**Антигенное соответствие эпизоотического возбудителя вируса  
ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 и производственных штаммов  
Азия-1 №48 и Азия-1 Шамир 3/89**

Метод определения	Азия-1 №48 / Азия-1 №1987/Амурский/2005	Азия-1 Шамир 3/89 / Азия-1 №1987 /Амурский/2005 /
РСК	0,16	0,20
РН с сыворотками морских свинок	0,18	0,19
РН с сыворотками КРС	0,19	0,18-0,25
ИФА с сыворотками КРС	0,25	0,25
По ИМД <sub>50</sub> МС	0,20	0,69
По ПИ <sub>50</sub> МС	0,20	0,69

Результаты таблицы 8 говорят о том, что исследуемый изолят значительно отличается от производственных штаммов вируса типа Азия-1

**Усовершенствование метода выявления антигена вируса ящура в ИФА**

Были проведены исследования по разработке чувствительного и специфичного двойного сэндвич варианта ИФА для выявления и прямого типирования вируса ящура в полевых образцах эпителиальной ткани, а также в материале, полученном от экспериментально зараженных животных

### Получение специфических реагентов для ИФА

**Получение антигена для ИФА.** Культуру клеток ВНК-21, выращенную в монослой, заражали вирусом ящура типов А<sub>22</sub>№550, О №194, Азия-1 №48, Азия-1 № 1987/Амурский/2005, адаптированным к указанным клеткам в течение 4-5 последовательных пассажей, из расчета 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/клетку и инкубировали при 37-38<sup>0</sup>С. После полной дегенерации монослоя, вызванной действием вируса, жидкость из матрасов сливали. Полученные вирусодержащие суспензии концентрировали с помощью 8% ПЭГ м м 6000. Приготовленный концентрат очищали от балластных примесей путем суспендирования в нем 10% хлороформа с последующим центрифугированием при 3000 g в течение 20 минут.

Концентрат (200 кратный) вируса ящура инактивировали АЭЭИ, который добавляли в вирусодержащую суспензию в концентрации 0,025 %. Инактивацию проводили при 26<sup>0</sup>С в течение 16-18 часов. Полученный инактивированный антиген проверяли на специфическую активность в ИФА и отсутствие остаточной вирулентности путем инокуляции в монослой культуры клеток СП. При отсутствии остаточной вирулентности с активностью в ИФА 1:100 и выше из антигена выделяли 146S компонент путем седimentирования в градиенте хлористого цезия-сахарозы.

**Получение антительных препаратов.** Иммуноглобулины, необходимые в качестве препаратов антител для создания твердофазного иммуносорбента и препарата для обнаружения антигена, выделяли из специфических сывороток крови кроликов и морских свинок.

**Получение улавливающих антител (антитела для сенсibilизации планшет)** В качестве доноров использовали кроликов, которых иммунизировали концентрированным, инактивированным 146S компонентом вируса ящура типов А<sub>22</sub>№550, О №194, Азия-1 №48, Азия-1 № 1987/Амурский/2005 содержащими 100-130 мкг/мл вирусспецифического

белка Животных иммунизировали трехкратно Через 14 дней после последней иммунизации животных тотально обескровливали

Специфическую активность улавливающих антител определяли с помощью непрямого варианта ИФА

**Получение детекторных антител.** Морских свинок иммунизировали препаратами 146S компонента вируса ящура типов А<sub>22</sub>№550, О №194, Азия-1 №48, Азия-1 №1987/Амурский/2005 содержащих 20-40 мкг вирусспецифического белка при двукратной схеме иммунизации

Активность улавливающих антител определяли с помощью непрямого варианта ИФА

Определение специфичности каждого компонента проводили в сэндвич варианте ИФА с антигенами всех типов, которые используются для комплектования набора (А<sub>22</sub>№550, О №194, Азия-1 №48, Азия-1 №1987/Амурский/2005) Используемые препараты антигенов и антител использовали в рабочих титрах В качестве отрицательных контролей использовались гетерологичные антигены вируса ящура и суспензия культуры клеток ВНК-21 Результаты опытов по определению оптимальных концентраций для улавливающих, детекторных антител представлены в таблице 9

Таблица 9

**Активность специфических диагностических компонентов в ИФА**

Тип антигена	Антитела для сенсibilизации планшет	Детекторные антитела	Антиген
А <sub>22</sub> №550	1·10000	1 5000	1·150
О <sub>1</sub> №194	1 3000	1 1000	1 100
Азия-1 №48	1 5000	1.3000	1 400
Азия-1 №1987	1 6000	1·2000	1 100

Антитела для сенсibilизации планшет, детекторные антитела и антигены обладали специфической активностью. В качестве конъюгата использовались диагностические антитела против Ig G (H+L) морской свинки, конъюгированные пероксидазой (антивидовой конъюгат) производства НИИЭМ им Н.Ф. Гамалеи РАМН (г Москва). Этот препарат оказался эффективным при введении в разрабатываемую тест-систему, стабилен при длительном хранении и удобен для стандартизации.

В качестве субстрата применяли пероксидазный субстрат АБТС производства фирмы «Sigma» (США).

### **Оптимизация условий постановки ИФА**

В результате проведенных исследований определен ряд параметров для оптимизации постановки ИФА с целью использования его для контроля вирусосодержащего сырья. Установлено, что иммобилизацию улавливающих антител необходимо проводить в течение 16-18 часов при 4°C в 0,1 карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,5-9,6. Для последующих стадий ИФА использовали фосфатно-буферный раствор pH 7,4-7,6 с добавлением 0,01% Твин-20. Время инкубирования на всех этапах реакции - 1 час при температуре 37°C.

В качестве блокирующего раствора использовали 10% эмбриональную сыворотку КРС.

### **Сравнительная оценка сэндвич-варианта ИФА и РСК**

Для изучения зависимости между результатами определения чувствительности ИФА и РСК были исследованы 14 проб, содержащих антигены вируса ящура антигены, полученные в культуральной системе (ВНК-21 и СП), суспензии афт КРС, лапинизированный вирус. В качестве отрицательного контроля использовали биологические системы, в которых культивировался вирус – культуральные суспензии ВНК-21 и СП.



В ходе опыта были получены данные, показывающие, что результаты ИФА соответствуют данным, полученным в РСК при исследовании данных проб. Результаты исследований проб антигенов вируса ящура типов А<sub>22</sub> №550, О №194, Азия-1 №48 и контрольных образцов культур клеток методом иммуноферментного анализа приведены в таблице 10

Таблица 10

**Результаты проверки набора для выявления антигена вируса ящура  
в пробах материала иммуноферментным анализом**

	Наименование антигена	Тип диагностической системы					
		А <sub>22</sub>		О <sub>1</sub>		Азия-1	
		РСК	ИФА	РСК	ИФА	РСК	ИФА
1	А <sub>22</sub> №550 10% культ. суспензия	+	+	-	-	-	-
2	А <sub>22</sub> №550 146S компоненты	+	+	-	-	-	-
3	А <sub>22</sub> №550 33% суспензия афт КРС	+	+	-	-	-	-
4	А <sub>22</sub> №550 конц. культуральная сусп.	+	+	-	-	-	-
5	О <sub>1</sub> №194 10% культур. суспензия	-	-	+	+	-	-
6	О <sub>1</sub> №194 146S компоненты	-	-	+	+	-	-
7	О <sub>1</sub> №194 лапинизированный	-	-	+	+	-	-
8	О <sub>1</sub> №194 33% суспензия афт КРС	-	-	+	+	-	-
9	Азия-1 №48 10% культ. суспензия	-	-	-	-	+	+
10	Азия-1 №48 146S компоненты	-	-	-	-	+	+
11	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
12	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
13	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
14	Азия-1 №48 33% сусп. афт КРС	-	-	-	-	+	+
15	суспензия КК ВНК-21	-	-	-	-	-	-
16	суспензия КК С11	-	-	-	-	-	-

Представленные данные в таблице 10 показывают, что результаты, полученные с помощью ИФА соответствуют данным, полученным в РСК. На основании полученных результатов нами были проведены расчеты чувствительности и специфичности диагностического набора. Расчет проводили по методу «латинского квадрата» описанного Дудниковым С.А., 2005. Согласно расчетам чувствительность и специфичность данного набора составляет 100%.

### 3. ВЫВОДЫ

1 Изучены иммунобиологические свойства штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, выделенного на территории Российской Федерации в 2005 году, который отличается от вакцинных и ранее изученных эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1 ( $R\%$  от 13 до 42), что необходимо учитывать при разработке мер профилактики ящура в России

2 Установлено, что вирус ящура Азия-1 штамм №1987/Амурский/2005 адаптируется к культуре клеток ВНК-21, IB-RS-2 и ПСГК-30 в течение трех пассажей. Наибольшее накопление вируса происходит в культуре клеток IB-RS-2, в титре  $7,66 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$  (в количестве  $1 \text{ мкг}/\text{cm}^3$  146S +75S компонентов)

3 В опытах на морских свинках установлено, что в прививной дозе инактивированной вакцины из штамма вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 содержится  $42,5 \text{ ПД}_{50}$  к гомологичному возбудителю и  $8,69 \text{ ПД}_{50}$  к вирусу Азия-1 №48 и Азия-1 Иран 58/99, а к Азия-1 /Шамир 3/89 –  $37,04 \text{ ПД}_{50}$ . В прививной дозе препарата из вируса Азия-1 Иран 58/99 содержалось  $37,04 \text{ ПД}_{50}$  к гомологичному и  $20,41 \text{ ПД}_{50}$  к Азия-1 №1987/Амурский/2005

4 В опытах на КРС установлено, что в прививной дозе коммерческой инактивированной сорбированной вакцины против ящура типов А22, О<sub>1</sub>, Азия-1 №48 содержалось  $10,56 \text{ ПД}_{50}$  против гомологичного возбудителя и  $3,5 \text{ ПД}_{50}$  к вирусу Азия-1 №1987/Амурский/2005

5 Штамм Азия-1 №1987/Амурский/2005 депонирован в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» и рекомендован для изготовления диагностических и вакцинных препаратов, как отличающийся по антигенным, иммуногенным и протективным свойствам от производственных и ранее выделенных эпизоотических штаммов

6 Получены диагностические препараты (антиген, гипериммунные сыворотки, улавливающие и детекторные антитела) для РСК и ИФА на вирус ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005

7 Оптимизированы параметры постановки ИФА с целью использования его при выявлении и идентификации вируса ящура в патологическом материале, полученном от больных животных

8 Усовершенствован диагностический набор, основанный на иммуноферментном анализе, для выявления и идентификации антигена вируса ящура в афтозном материале и суспензиях патологического материала

#### **4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Для практического использования предлагаются следующие материалы, полученные при выполнении диссертационной работы

1 Штамм вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005, пригодный для получения диагностикумов и вакцин, депонированный в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

2 Специфические диагностические поликлональные антитела против вируса ящура Азия-1 №1987/Амурский/2005 для использования в РСК и ИФА

3 Набор для выявления антигена вируса ящура иммуноферментным методом (ТУ 0388-138-00495527-2005 от 30 06 2006г )

### 5. Список опубликованных работ по материалам диссертации

1. Иммунобиологические свойства эпизоотического штамма №1737 Азия /Грузия/2000 вируса ящура / В.К Спирин, Т А Фомина, Н Е Камалова, **С.Н. Фомина**, А К Караулов // Золотое кольцо России : Матер 4 региональн конф , посвящен пробл профилактики и лечения домашних жив-х и птицы – Владимир, 2001. – С 51-52
- 2 Стандартизация методов выявления противоящурных антител в соответствии с требованиями МЭБ / Н Е Камалова, **С.Н. Фомина**, С Р Кременчугская, Т А Фомина, Т Н Лезова, Л А Быкова // Актуальн пробл инфекц патологии жив-х матер Междунар. науч конф , посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» – Владимир, 2003 – С 35-38
- 3 Результаты изучения иммунобиологических свойств эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в Закавказье / Т А Фомина, В К Спирин, А В Щербаков, А И Егорова, В В Дрыгин, С.Р Кременчугская, **С.Н. Фомина** // Актуальн пробл инфекцион патологии жив-х: матер Междунар науч конф , посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» – Владимир, 2003 – С. 32-34
- 4 Результаты эпизоотологического и серологического мониторинга по ящуру в России в 2002г / В М Захаров, А М. Рахманов, Т А Фомина, В Н Герасимов, Н Е Камалова, С Р Кременчугская, А К Караулов, Д М Муминов, В В Никифоров, В Г Патрикеев, **С.Н. Фомина** // Актуальн вопр зоотехн науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья с.-х жив-х: матер 2-й Междунар науч -практ конф – Ставрополь, 2003 – С 313-317
- 5 Foot-and-mouth disease virus type Asia-1 in Transcaucasia diagnosis and immunobiological properties / Т.А. Fomina, V.M Zakharov, V K Spirin, N.E Kamalova, A V Scherbakov, S.R Kremenchugskaya, **S.N. Fomina** // 6<sup>th</sup> Int Congr. Vet. Virol Virus Persistence and Evolution Proc – Saint-Malo, France, 2003. – P. 120

6 Получение рекомбинантного неструктурного 3А белка вируса ящура и его использование для дифференциации постинфекционных и поствакцинальных антител в непрямом варианте твердофазного ИФА / С.Н. Фомина, А С Яковлева, А В Щербаков, Т А Фомина, Н Е Камалова // Пробл мониторинг и генодиагност инфекцион бол ж- ных Матер Междунар научн конф молодых ученых, 24-26 марта 2004 г – Владимир, 2004 – С 67-68

7 Современные методы контроля иммуногенности противоящурных вакцин и оценки иммунитета / Н Е Камалова, С Р Кременчугская, В М Захаров, В И Диев, В Ю Кулаков, С.Н. Фомина, М В Жильцова // Сб науч тр ВГНКИ – М, 2005 – Т 66 – С 39-45

8 Разработка и применение иммуноферментной тест-системы для определения антител к неструктурным белкам вируса ящура /А В Щербаков, А С Яковлева, А В Каньшина, Н В Вавилова, С.Н. Фомина, С Р Кременчугская, Н С Мудрак // Тр Федерального центра охраны здоровья животных – Владимир, 2006 – Т 4 – С 26-39

9 Фомина С Н Комплексное изучение антигенного родства штаммов вируса ящура типа Азия-1 / С.Н. Фомина //Вет патология – 2006 - №4 – С 34-37