

ГОЧМУРАДОВ БИХЛАС МУРАДОВИЧ

**Усовершенствование тест-систем на основе
иммуноферментного анализа для контроля иммуногенной
активности противоящурной вакцины**

4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Научный руководитель: **Михалишин Дмитрий Валерьевич,**
доктор ветеринарных наук.

Официальные оппоненты: **Ефимова Марина Анатольевна,**
доктор биологических наук, заместитель
директора по научной работе и
инновационному развитию Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань;

Ельников Василий Викторович,
кандидат ветеринарных наук, заместитель
директора по производству Федерального
казенного предприятия «Щелковский
биокомбинат» г. Щелково, Московской обл.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Всероссийский научно-
исследовательский и технологический институт
биологической промышленности», г. Щелково,
Московской обл.

Защита состоится «__» _____ 2025 года в _____ часов на заседании
диссертационного совета 36.1.002.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); г. Владимир, мкр. Юрьевец.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ». Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.artiah.ru

Автореферат разослан _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ящур – высококонтагиозная вирусная болезнь парнокопытных животных, способная вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб сельскому хозяйству различных стран. Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae*. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия 1, SAT 1, SAT 2 и SAT 3 (Бурдов А.Н. и др., 1990).

Для стран, свободных от ящура, сохраняется опасность заноса болезни из неблагополучных регионов. Так, государства Азии и Ближнего Востока активно развивают индустрию туризма и имеют торгово-экономические связи с Россией, вследствие этого всегда существует риск заноса заболевания на территорию РФ (Фомина С.Н., 2022). Кроме того, ящур создает существенные барьеры для международной торговли животными и продуктами животноводства (Knight-Jones T.J., 2013, Мищенко В.А., 2016).

Вакцинация является основным методом борьбы с ящуром. Поскольку возбудитель этого заболевания является РНК-содержащим вирусом, он имеет очень высокую частоту мутаций из-за отсутствия механизма восстановления вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Исходя из этого, происходит его быстрая эволюция, приводящая к постоянно возникающим новым генетическим и антигенным вариантам вируса, которые могут преодолевать иммунитет вакцинированных животных и вызывать вспышки. Это значительно осложняет борьбу с заболеванием и определяет необходимость постоянного мониторинга разнообразия вируса ящура в природе и современной разработки новых вакцинных препаратов, адаптированных к появляющимся генетическим линиям вируса (Fry E.E., 2005; Михалишин Д.В., 2021).

В соответствии с рекомендациями Всемирной организации по охране здоровья животных (ВОЗЖ, 2018) для определения иммунного статуса животных применяют реакцию нейтрализации (РН) и жидкофазный блокирующий вариант иммуноферментного анализа (ЖБ ИФА). Реакция нейтрализации вируса считается чувствительным и специфичным методом, однако проведение анализа имеет ряд следующих ограничений: 1) большая продолжительность времени постановки реакции (не менее 3 суток), 2) высокая стоимость процедуры, связанная с применением чувствительной клеточной линии и необходимостью применения СО₂-инкубатора, 3) предполагает использование не инаktivированного вируса ящура, который является биологическим агентом II группы патогенности.

В свою очередь, ЖБ ИФА обладает многими преимуществами, включая экспрессность, высокую специфичность и чувствительность, пригодность для крупномасштабного скрининга полевых образцов и отсутствие требований к

специальным лабораторным условиям, например, культуре клеток или асептических условий чистых помещений. Поэтому, для определения титра антител у вакцинированных животных целесообразно применять ИФА (Hamblin C., 1986; Ma L.N., 2011).

В современной диагностике ящура особое место занимает ЖБ ИФА, который ВОЗЖ рекомендует как один из основных методов контроля иммуногенности противоящурных вакцин. Суть метода заключается в том, что антитела из сыворотки крови вакцинированных животных конкурируют с детектирующими антителами за связывание с вирусным антигеном непосредственно в жидкой фазе. Такой подход имеет важное преимущество, а именно, он позволяет выявлять те антитела, которые специфичны к иммуногенным эпитопам вируса ящура. Благодаря этому результаты анализа хорошо коррелируют с результатами РН и реальной защитой животных от заболевания.

Применение гетерологичных штаммов и компонентов, полученных на их основе в тест-системе ИФА, часто приводит к занижению значений титра антител в сыворотках крови животных, что может негативно сказаться на объективной оценке качества вакцины.

В последние годы активно циркулирующие изоляты и штаммы вируса ящура генотипа O/SEA/Mya-98 имеют существенные отличия от других линий серотипа O, что подтверждается анализом нуклеотидной и аминокислотной последовательности высоко варибельного пептида вируса ящура VP₁. Для изолятов вируса ящура серотипа A также характерно генетическое разнообразие. Очень распространенным в странах Азии является генотип A/ASIA/Sea-97. При этом ранее созданные тест-системы на основе ИФА по результатам исследований оказались менее чувствительными и специфичными по отношению к вирусу ящура генотипов O/SEA/Mya-98 (штамм «O №2212/Приморский/2014») и A/ASIA/Sea-97 (штамм «A №2155/Забайкальский/2013»), выявляя антитела к указанным штаммам не более, чем на 50% (Кременчугская С.Р., 2021).

В связи с этим возникает необходимость разработки тест-систем на основе ЖБ ИФА с использованием гомологичных антигенов актуальных штаммов вируса ящура, что позволит оценить поствакцинальный иммунитет с целью получения достоверных результатов.

Степень разработанности темы. Традиционно иммуногенную активность вакцинных препаратов оценивали путем определения титра вируснейтрализующих антител в сыворотках вакцинированных животных, что требовало использования культур клеток и работы с живым вирусом (Дудников А.И. и др., 2005; А.Н. Бурдов и др., 1990).

Начиная с 80-х годов XX века, активно разрабатывался метод иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу ящура. Зарубежные исследователи Hamblin C. с соавторами (1986) предложили блокирующий вариант ИФА (LP-ELISA) для выявления антител к вирусу ящура и показали его преимущества в сравнении с реакцией нейтрализации. Позднее Kitching R.P. (1988) продемонстрировал возможность использования ИФА для подбора оптимальных вакцинных штаммов вируса ящура. Robiolo B. с соавторами (1995, 2006), предложили методику оценки эффективности противоящурных вакцин с помощью ИФА в жидкой фазе как альтернативу контрольному заражению.

В последние годы, согласно руководству ФАО и ВОЗЖ (Феррари Д. и др., 2019), значительное внимание уделяется поствакцинальному мониторингу и стандартизации методов оценки эффективности вакцинации против ящура. Tamil Selvan R.P. и соавторы (2016) изучали взаимосвязь между титрами нейтрализующих антител и результатами блокирующего ИФА.

Филогенетический анализ изолятов вируса ящура проводили также российские ученые (Щербаков А.В. и др., 2006, 2014; Тимина А.М. и др., 2017).

Paton D.Y., Valacher Y.F. и др., (2005) в составе международной группы исследователей изучали принципы селекции вакцинных штаммов вируса ящура, что имеет прямое отношение к оценке эффективности вакцин. Михалишин Д.В. (2021) при разработке технологии изготовления эмульсионной вакцины против ящура также затрагивал вопросы контроля иммуногенности препарата.

В России исследования по усовершенствованию методов контроля иммунного ответа на противоящурные вакцины проводились в ФГБУ «ВНИИЗЖ». Дудникова Е.К. (1997) внедрила тест-систему ИФА на основе жидкофазного блокирующего варианта для выявления противоящурных антител в сыворотке крови животных.

Значительный вклад в развитие методов контроля иммунного ответа к вирусу ящура внесли исследования специалистов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Камалова Н.Е. (2010) разработала методы экспресс-диагностики для идентификации и серологического мониторинга по ящуру. Кременчугская С.Р. (2018), Луговская Н.Н. и др. (2017) изучили особенности гуморального иммунитета у животных, а также провели валидацию методики определения уровня противоящурных антител.

Цель и задачи научных исследований. Основной целью наших исследований было усовершенствование тест-систем на основе жидкофазного блокирующего варианта ИФА для выявления антител к структурным белкам вируса ящура и контроля качества вакцин против ящура.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. определить влияние методов очистки и инактивации на сохранность 146S частиц вирусосодержащей суспензии;
2. разработать схему подготовки антигенов вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014» для получения детекторных и сенсibiliзирующих антител;
3. оптимизировать схемы и методы изготовления иммуноспецифических компонентов тест-системы на основе ЖБ ИФА и произвести выбор рабочих концентраций антигена, детекторных и сенсibiliзирующих антител;
4. разработать тест-системы из актуальных штаммов для определения уровня антител к вирусу ящура в сыворотках крови вакцинированных животных и оценки иммуногенности вакцин против ящура;
5. провести валидацию разработанных тест-систем на основе ЖБ ИФА;
6. провести сравнительную оценку чувствительности и специфичности разработанных тест-систем в сопоставлении с коммерческими аналогами и реакцией нейтрализации;
7. исследовать сыворотки крови в реакции нейтрализации и ЖБ ИФА от животных, вакцинированных различными способами с результатами контрольного заражения.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований:

- разработаны тест-системы на основе ЖБ ИФА для оценки иммуногенности вакцины против ящура;
- оптимизированы схемы и методы получения иммуноспецифических компонентов тест-систем на основе ЖБ ИФА и произведен выбор концентраций антигена, детекторных и сенсibiliзирующих антител;
- изучен гуморальный иммунитет с применением разработанных тест-систем ЖБ ИФА у вакцинированных животных после введения препаратов с различными адъювантами и способами введения;
- проведена сравнительная оценка уровней гуморального иммунитета в РН и с помощью разработанной тест-системы ЖБ ИФА с результатами контрольного заражения;
- определено влияние адъювантов на индукцию гуморального иммунитета у привитых животных с помощью ЖБ ИФА.

Научная новизна исследований подтверждена получением 5 патентов РФ на изобретения №№ 2787714, 2796393, 2798510, 2812211, 2815540.

Теоретическая и практическая значимость работы. Усовершенствованы и внедрены в практику тест-системы ЖБ ИФА, которые позволяют эффективно, за короткий промежуток времени оценить иммуногенность противоящурных вакцин,

проводить мониторинговые исследования по оценке иммунного статуса привитых животных.

В результате проведенных исследований разработаны нормативные документы:

- «Методические рекомендации по определению флокулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида)» (2022 г.);
- «Методические рекомендации по концентрированию антигена вируса ящура с помощью тангенциальной фильтрационной установки» (2024 г.);
- СТО 00495527-0407-2022 «Набор для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе» (2022 г.);
- «Промышленный регламент на производство набора для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе ПР-ЛПЯ-017/01».

Методология и методы исследований. В работе использованы вирусологические, серологические и иммунологические методы исследований с использованием клеточных линий, лабораторных и естественно восприимчивых к ящуру животных и статистические методы.

Основные положения выносимые на защиту:

- методология получения и стандартизация иммуногенного антигена для разработки диагностических тест систем;
- оптимизация аналитических параметров тест-систем на основе ЖБ ИФА и их валидация;
- сравнительный анализ гуморального иммунного ответа в зависимости от адьюванта и способа введения вакцин;
- верификация диагностической ценности ЖБ ИФА в сравнении с РН классическим методом оценки иммунитета;
- результаты сравнительной оценки гуморального иммунитета методами РН и ЖБ ИФА с результатами контрольного заражения.

Личный вклад соискателя. Основной объем экспериментальных данных, представленных в диссертации, и анализ полученных результатов выполнен автором самостоятельно. За консультативную и методическую помощь автор выражает благодарность д.в.н. Михалишину Д.В., к.в.н. Борисову А.В., д.б.н. Доронину М.И., к.б.н., Луговской Н.Н., к.б.н., Гусевой М.Н. и др. сотрудникам лаборатории профилактики ящура.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2021-2023 гг., на Международной научно-практической конференции «Вакцины нового поколения для профилактики особо опасных болезней сельскохозяйственных животных» (Москва, 2023 г.)

Публикации. По основным материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, из них четыре – статьи в рецензируемых изданиях и пять патентов на изобретения РФ.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы

Штаммы вируса ящура. В работе использовали депонированные во Всероссийской государственной коллекции экзотических типов вирусов ящура и других патогенов животных (ГКШМ) ФГБУ «ВНИИЗЖ штаммы, которые используются в производстве вакцин для профилактики ящура: «А №2155/Забайкальский/2013», «О №2212/Приморский/2014».

Вакцины. В исследовании применяли вакцины культуральные инаktivированные эмульсионные бивалентные из штаммов, указанных выше, с масляными адъювантами Montanide ISA-206 VG, Montanide ISA-207 VG, Montanide ISA-50 VG, «ВНИИЗЖ». Для работы также применяли вакцину против ящура «АРРИАХ-БАК» производственной серии №141022.

Исследуемые образцы сыворотки. Для проведения ИФА использовали сыворотки крови свиней, морских свинок и кроликов. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными ГОСТ 33215-2014.

Культура клеток. В работе использовали первично-трипсинизированную культуру клеток почки свиньи (СП), а также перевиваемые культуры клеток из почки сирийского хомячка (ВНК-21/SUSP/ARRIAN), почки сибирского горного козерога (ПСГК-30), почки свиньи (IB-RS-2) из коллекции ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Компоненты набора для проведения реакции. В работе применяли фосфатно-буферный раствор (ФБР), карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ); раствор, останавливающий реакцию («стоп»-раствор), коммерческий хромогенный субстрат ABTS («Biomedical»), коммерческий препарат конъюгата иммуноглобулинов антиморской свинки с пероксидазой («Abscam»).

2.2 Методы

Количественное определение 146S компонента вирусного белка. Определение количества 146S компонента осуществляли иммунохимическим методом, разработанным ранее (Бондаренко А.Ф., 1987, Лозовой Д.А. и др., 2017).

Инаktivация вируса. Инаktivацию вирусов ящура проводили с помощью 0,03% раствора аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ) и 0,003 М бинарного этиленимина (БЭИ) при pH 7,2-7,8 в течение 12 часов при температуре $37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Ультрацентрифугирование проводили в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. Полученный вируссодержащий материал в объёме по 15 мл наслаивали на градиент сахарозы с концентрациями 20, 30, 40 и 50%.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Фракционированный антиген анализировали спектрофотометрически при длине волны 260 нм и электрофоретически в 12 %-ном полиакриламидном геле при постоянном напряжении 200V, как описано ранее (Laemli, 1970).

Изготовление эмульсионных вакцин. Для изготовления моновалентных эмульсионных вакцин использовали инаktivированный концентрированный антиген и масляные адъюванты, представленные выше.

Получение иммуноспецифических компонентов. Для получения сенсibilизирующих и детекторных антител применяли антигены вируса ящура указанных выше штаммов, репродуцированного в суспензионной культуре клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (BHK-21/SUSP/ARRIAN).

Реакция нейтрализации. РН вируса ящура проводили в культуре клеток СП по общепринятой методике с двукратным разведением сыворотки и постоянной дозой вируса (100 ТЦД₅₀).

Расчет позитивно-негативного порога (ПНП). Для учета результатов реакции ЖБ ИФА проводили по формуле: $ПНП = P_{\text{сред}} + 2SD$ (Snyder D.B., 1982).

Статистический анализ. Статистический анализ производили с помощью интернет-ресурсов, в том числе, MedCalc's Diagnostic test evaluation calculator (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php), Kappa Calculator (<https://www.easycalculation.com/statistics/cohens-kappa-index.php>).

Диагностические наборы. Для исследования использовали «Набор для определения противоящурных антител в сыворотке животных в ИФА» (серотипы А, О) (производство ФГБУ «ВНИИЗЖ»); набор «PrioCHECK» FMDV Type O, A (Нидерланды), согласно инструкции производителя.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На первом этапе исследования был проведен анализ эпизоотической ситуации по ящуру в азиатско-тихоокеанском регионе. Проанализированы данные по генетическому и серологическому соответствию штаммов и изолятов вируса ящура генотипов А/ASIA/SEA-97 и О/SEA/Mya-98, циркулирующих в Ю-В Азии, и выбраны актуальные для данного региона штаммы «А №2155/Забайкальский/2013» (генотип А/ASIA/SEA-97) и «О №2212/Приморский/2014» (генотип О/SEA/Mya-98) для изготовления вакцины и гомологичных к ним тест-систем ЖБ ИФА.

3.1 Разработка тест-систем на основе антигена вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014»

Особое внимание при получении иммуноспецифических компонентов для ЖБ ИФА с целью обнаружения антител к структурным белкам вируса ящура генотипов A/ASIA/SEA-97 и O/SEA/Mya-98 было уделено выделению 146S частиц из культуральной вирусосодержащей инактивированной суспензии. В диагностических тест-системах использование очищенного 146S компонента позволяет выявлять именно те антитела, которые обладают вируснейтрализующей активностью и коррелируют с защитой от инфекции. Таким образом, сохранение целостности 146S частиц в процессе получения вирусного антигена является критически важным фактором для разработки как эффективных вакцин, так и высокоспецифичных диагностических тест-систем.

3.1.1 Влияние очистки и инаktivации на сохранность 146S частиц вирусосодержащей суспензии

Проводили культивирование вируса ящура указанных выше штаммов в культиваторе стеклянном (КС-40), после чего провели опыты по инаktivации возбудителя заболевания с использованием БЭИ и АЭЭИ. Результаты данных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние времени инаktivации с помощью БЭИ и АЭЭИ на количество 146S компонента антигенов вируса ящура типов А и О

(n=3, M±m, p<0,05)

Тип вируса ящура	Режим инаktivации температура, 37°C		Концентрация 146S компонента (мкг/см ³) после		Уровень сохранности, 146S компонента, %
	название инаktivанта, концентрация	время воздействия, ч	репродукция	инаktivация	
А	0,003 М БЭИ	12	2,07±0,14	2,02±0,11	97,67±1,29%
О	0,003 М БЭИ	12	2,32±0,19	2,14±0,22	93,13±1,78%
А	0,03% АЭЭИ	12	2,07±0,14	1,96±0,14	97,15±2,85%
О	0,03% АЭЭИ	12	2,32±0,19	2,16±0,23	92,92±2,30%
А	0,003 М БЭИ	24	2,07±0,14	1,91±0,26	91,84±6,35%
О	0,003 М БЭИ	24	2,32±0,19	2,18±0,17	93,99±0,74%
А	0,03% АЭЭИ	24	2,07±0,14	1,84±0,08	89,03±2,16%
О	0,03% АЭЭИ	24	2,32±0,19	2,10±0,23	90,30±2,51%

Примечание: АЭЭИ - аминоэтилэтиленмин, БЭИ - бинарный этиленмин.

Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что после инаktivации БЭИ снижение количества 146S компонента в течении 12 часов инкубации вируса ящура типов О и А составило 7,76% и 2,42%, соответственно, а после инаktivации АЭЭИ – 6,90% и 5,31%, соответственно, по сравнению количеством 146S компонента до инаktivации.

Увеличение инкубационного периода с инактивантами до 24 часов с БЭИ снизило количество 146S компонента для типов О и А – на 6,03% и 7,73%, соответственно, а с АЭЭИ за это время для типа О – на 9,48 %, а для типа А – на 10,97%. Таким образом, для инактивации в дальнейшем решили применять БЭИ при концентрации 0,003М, температуре $37,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ и времени инкубации 12 ч.

Для очистки вируссодержащей суспензии от балластных белков и других примесей был выбран полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ, полисепт), который обладает выраженными флокулирующими свойствами.

В образцы инаktivированной вируссодержащей суспензии вносили ПГМГ в концентрации 0,005; 0,007; 0,010%, отстаивали в течение 72 часов при температуре 2-8 °С и определяли количество иммуногенных компонентов. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние полисепта на компонентный состав вируса ящура
($n=3$, $M \pm m$, $p < 0,05$)

Название флокулянта	Концентрация 146S компонента (мкг/см ³)			
	Исходная суспензия	После внесения флокулянта (%)		
		0,005	0,007	0,010
ПГМГ	$2,37 \pm 0,06$	$2,26 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,08$	$1,90 \pm 0,05$
	$3,05 \pm 0,04$	$2,91 \pm 0,09$	$2,87 \pm 0,09$	$2,44 \pm 0,06$
	$2,51 \pm 0,07$	$2,39 \pm 0,07$	$2,36 \pm 0,04$	$2,01 \pm 0,09$
	$2,58 \pm 0,06$	$2,46 \pm 0,04$	$2,43 \pm 0,05$	$2,06 \pm 0,07$
Среднее арифметическое значение/ Изменение по отношению к исходной суспензии	$2,63/(100\%)$	$2,51/(-4,6\%)$	$2,47/(-6\%)$	$2,10/(-20\%)$

Примечание: ПГМГ – полигексаметиленгуанидин (полисепт).

Анализ результатов, представленных в таблице 2, показал, что увеличение концентрации полисепта при очистке вируссодержащей суспензии снижает количество иммуногенного компонента 146S. Использование для очистки 0,005%; 0,007%; 0,010% полисепта уменьшило количество 146S компонента на 4,6; 6,0 и 20,0%, соответственно, по сравнению с исходной вируссодержащей суспензией.

Таким образом, в дальнейшем полученную инаktivированную вируссодержащую суспензию очищали полисептом в концентрации 0,005%, так как при этой концентрации отмечали наименьшие потери по иммуногенным компонентам и удовлетворительную степень очистки суспензии.

3.1.2 Усовершенствование тест-системы ЖБ ИФА для определения вирусоспецифических антител после вакцинации

Полученную очищенную вирусосодержащую суспензию концентрировали методом ультрафильтрации в 10 раз по объему и повторно очищали с помощью 0,005% флокулянта с последующим центрифугированием. Далее концентрирование антигена проводили путем преципитации вирусного белка 8%-м полигликолем с добавлением 0,85% NaCl в течение 18-24 часов при температуре $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Смесь центрифугировали, осадок ресуспендировали в 10 раз в меньшем объеме ФБР, а затем дополнительно очищали хлороформом и центрифугированием (рисунок 1).

Выделение 146S антигена проводили ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (20-50% сахарозы в ФБР)

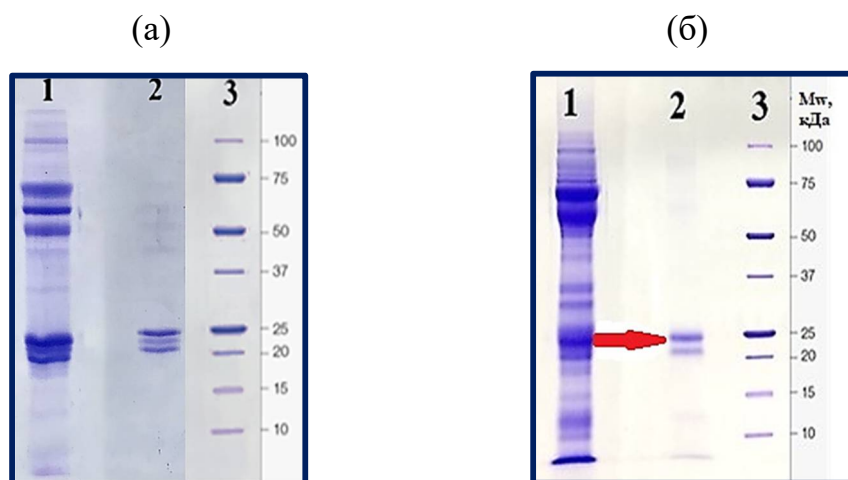


Рисунок 1 – Электрофореграмма для антигена вируса ящура серотипов А и О в 12% полиакриламидном геле

а) «А №2155/Забайкальский/2013» генотипа А/ASIA/SEA-97

б) «О №2212/ Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98

Примечание: целевой белок с молекулярным весом 25 кДа, 1 – до ультрацентрифугирования; 2 – после ультрацентрифугирования, 3 - маркер молекулярных весов для электрофореза белков.

Приготовленный таким образом антиген смешивали с масляным адъювантом ISA-51 VG 1:1 в равных частях. Для иммунизации животных использовалась представленная ниже схема.

Кроликам эмульсию вводили внутримышечно в область бедра в концентрации белка О №2212/Приморский/14 146S $C \approx 0,3 \text{ мг/см}^3$ и А №2155/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,25 \text{ мг/см}^3$ на одну иммунизацию в объеме 2 см^3 . Вакцинация проводилась дважды с интервалом 14 суток.

Морским свинкам эмульсию так же вводили внутримышечно в область бедра в концентрации белка О №2212/Приморский/14 146S $C \approx 0,15 \text{ мг/см}^3$ и А №2155/Забайкальский/2013 146S $C \approx 0,1 \text{ мг/см}^3$ на одну иммунизацию в объеме 1 см^3 . Вакцинация проводилась дважды с интервалом 14 суток.

После последней иммунизации, через 10 суток проводили обескровливание животных. Отобранные сыворотки проверяли на активность в РН.

3.1.3 Определение активности антигена, сенсibiliзирующих и детекторных антител к вирусу ящура

Для определения активности компонентов тест-системы на основе антигена вируса ящура штамма «О№2212/Приморский/2014» генотипа О/SEA/Mya-98 использовали следующие разведения: антигена - 1:2000, 1:3000, 1:3500, 1: 4000; детекторных антител - 1:3000, 1:4000, 1:4500, 1:5000; сенсibiliзирующих антител- 1: 7000, 1:8000, 1:9000, 1:10000. В качестве контрольных сывороток для анализа применяли сыворотки, специфичные к определенным штаммам вируса ящура с активностью в РН 1:256.

В ходе исследований доказано, что рабочие разведения антигена, сенсibiliзирующих и детекторных антител для типа О составили 1:3500, 1:9000, 1:4500, соответственно. Результаты выбора рабочих разведений на тип О, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Активность сенсibiliзирующих и детекторных антител и антигена вируса ящура штамма «О №2212/Приморский/2014»

(n=3)

Исследуемые сыворотки и разведение компонентов	Разведение антигена			
ДА – 1:4500 СА – 1:9000	1:2000	1:3000	1:3500	1:4000
S _{крс} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{свиней} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{сыворотка} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
АГ – 1:3500	Сенсibiliзирующие антитела			
ДА – 1:4500	1:7000	1:8000	1:9000	1:10000
S _{крс} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{свиней} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{сыворотка} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
АГ – 1:3500	Детекторные антитела			
СА – 1:9000	1:3000	1:4000	1:4500	1:5000
S _{крс} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{свиней} - О/Приморский/2014	1:32-1:45	1:128-1:181	1:256	≥1:512
S _{сыворотка} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: ДА - детекторные антитела, СА – сенсibiliзирующие антитела, АГ – антиген.

Для определения активности компонентов тест-системы штамма «А №2155/Забайкальский/2013» исследовали следующие разведения для антигена: 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1: 3500; для детекторных антител: 1:3000, 1:3500, 1:4000, 1:4500; для сенсibiliзирующих антител - 1: 7000, 1:8000, 1:9000, 1:10000,

конъюгата - 1:2000. В ходе лабораторных исследований при выборе рабочих разведений компонентов было доказано, что рабочие разведения антигена, сенсibiliзирующих и детекторных антител для типа А составили 1:3000, 1:9000, 1:4000, соответственно. Результаты выбора рабочих разведений представлены в таблице 4.

В разработанных тест-системах в основу качественного анализа результатов реакции ИФА заложен позитивно негативный порог (ПНП) в 50% PI. Расчёт производили по данным, полученным в ходе тестирования 126 образцов сыворотки крови от клинически здоровых КРС и свиней, не вакцинированных против ящура. Были получены среднее значение PI и стандартное отклонение от среднего (SD). Среднее значение PI по данной выборке образцов сыворотки крови (n=126) для тест-системы, полученной с использованием штамма «А №2155/Забайкальский/2013» составило 26,1%, SD – 11,56%. ПНП составил 49,22%. Для тест-системы, изготовленной с применением штамма «О №2212/Приморский/2014», среднее значение PI по данной выборке образцов сыворотки крови (n=126) составило 24,4%, SD – 12,68%, ПНП составило 49,76% для данной выборке образцов.

Таблица 4 – Активность сенсibiliзирующих и детекторных антител и антигена вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013»

(n=3)

Исследуемые сыворотки и разведение компонентов	Разведение антигена			
	1:1500	1:2000	1:3000	1:3500
ДА – 1:4000 СА – 1:9000				
S _{КРС} - А №2155/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{свиней} - А №2155/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{сыворотка} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
АГ – 1:3000 ДА – 1:4000	Сенсibiliзирующие антитела			
	1:7000	1:8000	1:9000	1:10000
S _{КРС} - А №2155/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{свиней} - А №2155/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{сыворотка} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32
АГ – 1:3000 СА – 1:9000	Детекторные антитела			
	1:3000	1:3500	1:4000	1:4500
S _{КРС} - А №2155/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{свиней} - А №2155/Забайкальский/2013	1:32-1:45	1:90-1:128	1:256	≥1:512
S _{сыворотка} - отрицательная	ОТР	ОТР	ОТР	1:16-1:32

Примечание: ДА - детекторные антитела, СА – сенсibiliзирующие антитела, АГ – антиген.

3.2 Определение диагностических характеристик тест-систем А №2155/Забайкальский/2013 и О №2212/Приморский/2014

Оценили разработанную тест-систему на серотип О на выборке из 498 животных и выявили, что из 498 образцов сывороток крови 492 определены в качестве положительные, а 6 - как отрицательные. Для исследования специфичности метода тестировали 232 отрицательные сыворотки крови животных. В результате исследования с помощью ИФА было выявлено, что из 232 отрицательных проб 231 проба определена как отрицательная.

Пользуясь представленными выше статистическими методами анализа, определили, что в 95%-ном доверительном интервале диагностическая чувствительность (DSe) составила 98,56-99,95%, диагностическая специфичность (DSp) - 98,42-100,00%, к критерий - 0,994, прогностичность отрицательного результата (NPV) - 96,68-99,78%, общая точность (DAc) - 99,02-99,97.

Аналогичное исследование проводили для разработанной тест-системы серотипа А. По результатам ЖБ ИФА определили, что из 349 образцов сывороток крови 341 определены в качестве положительных, а 8 - в качестве отрицательных. Для исследования специфичности метода тестировали 362 отрицательных сывороток крови животных. В результате исследования с помощью ИФА установили, что из 362 отрицательных проб 355 проб определены в качестве отрицательных.

Пользуясь представленными выше статистическими методами анализа, определили, что в 95%-ном доверительном интервале диагностическая чувствительность составила 98,67-99,99%, диагностическая специфичность - 98,03-100,00%, к критерий – 0,998, прогностичность отрицательного результата - 96,31-99,92%, общая точность - 99,08-100,00%.

Таким образом, предлагаемые тест-системы для выявления антител к структурным белкам вируса ящура штаммов «О №2212/Приморский/2014» и «А №2155/Забайкальский/2013 на основе жидкофазного блокирующего непрямого «сэндвич»-варианта ИФА являются специфичными и чувствительными, позволяющими проводить анализ сывороток крови животных с количественным определением значения титра антител.

3.3 Испытания тест-систем на основе штамма «О №2212/Приморский/2014» и штамма «А №2155/Забайкальский/2013»

Полученные антигены, сенсibiliзирующие и детекторные антитела подвергали лиофильной сушке для увеличения срока годности препаратов. Перед лиофилизацией к раствору добавляли сахарозу до конечной концентрации 5%.

Тест-системы на основе штаммов «О №2212/Приморский/2014» и «А №2155/Забайкальский/2013» получили коммерческое название «Набор для

определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе».

На следующем этапе были проведены исследования сывороток крови животных, иммунизированных экспериментальными образцами вакцинных препаратов, в ЖБ ИФА с использованием наборов фирмы PrioCHECK и ФГБУ «ВНИИЗЖ» на 14 сутки после вакцинации свиней массой 30-50 кг- 4-5 месячного возраста. В результате исследований сывороток крови свиней в одном разведении с наборами PrioCHECK на 14-е сутки после иммунизации было выявлено по типу А - 3 из 40 (7,5%) животных с защитными уровнями антител, а по типу О 18 из 40 (46,15%) от количества вакцинированных. С помощью набора ФГБУ «ВНИИЗЖ» было обнаружено 14 из 40 (35,9%) свиней с защитным уровнем антител против вируса типа А и 22 из 40 (55%) против вируса типа О. Используя набор ФГБУ «ВНИИЗЖ», выявили 59,97% животных, вакцинированных препаратами с эмульсией «В-М-В» с защитным уровнем антител против 30,58%, обнаруженных с помощью набора PrioCHECK. Результаты представлены на рисунке 2.

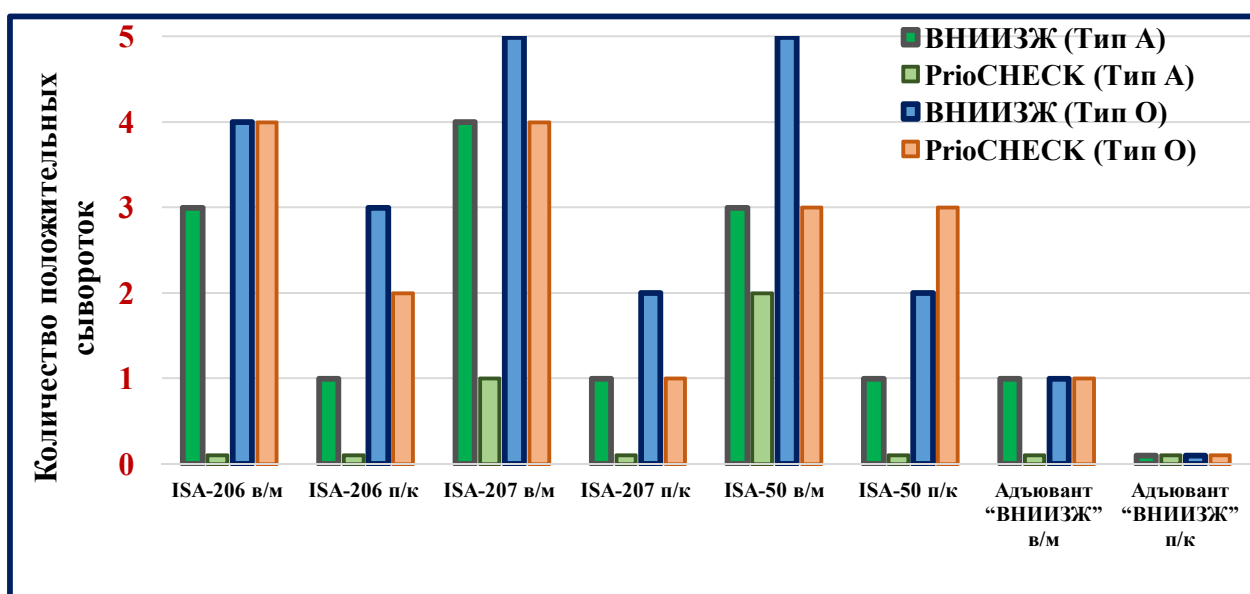


Рисунок 2 – Количество положительных сывороток крови свиней с защитным титрами определенными в ИФА, иммунизированных внутримышечно и подкожно эмульсионными вакцинами с различными адьювантами

Примечание: в соответствии с СТО на противоящурные вакцины ФГБУ «ВНИИЗЖ», защитными считаются титры антител $\geq 5,0 \log_2 SN_{50}$, в/м – внутримышечно, п/к – подкожно, ISA – обозначение масляного адьюванта с разным уровнем вязкости.

Способ введения вакцины оказывал влияние на индукцию вирусоспецифических антител. При внутримышечном введении препарата на 14 сутки после вакцинации у 25 из 40 (62,5%) свиней были определены защитные уровни антител с помощью набора ФГБУ «ВНИИЗЖ» и только у 15 из 40 (37,5%) свиней с тест-системой PrioCHECK. Подкожный способ инъекции показал более

низкий уровень вирусоспецифических антител при использовании наборов ФГБУ «ВНИИЗЖ» и PrioCHECK- 11 из 40 (27,5%) и 6 из 40 (15%), соответственно.

3.3.1 Сравнение результатов исследований гуморального иммунитета у вакцинированных эмульсионными противоящурными вакцинами животных с использованием метода ЖБ ИФА и реакции нейтрализации

Для работы приготовили эмульсионные вакцины с использованием масляных адъювантов Montanide ISA-50, ISA-206, ISA-207 и адъюванта «ВНИИЗЖ». Эмульсии готовили с инаktivированными и концентрированными ультрафильтрацией антигенами вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014». Изготовленными препаратами вакцинировали свиней массой 30-50 кг- 4-5 месячного возраста двукратно подкожно и внутримышечно с интервалом в 14 суток. Результаты, представленные на рисунке 3, показывают, что с помощью ЖБ ИФА защитные уровни вирусоспецифических антител были установлены во всех группах свиней, независимо от использованного адъюванта при внутримышечной инъекции вакцин. Чувствительность метода определения антител в ЖБ ИФА была выше, чем в реакции нейтрализации.

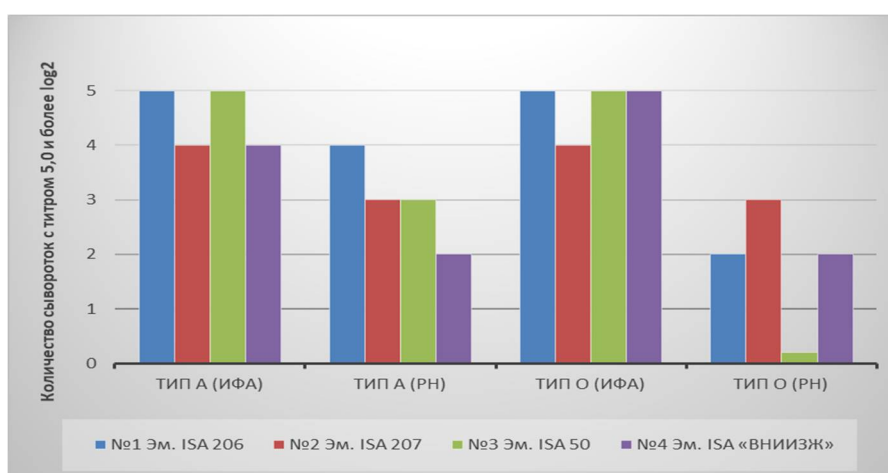


Рисунок 3 – Количественное соотношение животных, выявленных с защитным уровнем вирусоспецифических антител по результатам ЖБ ИФА и РН после внутримышечной иммунизации противоящурной вакциной с различными адъювантами

Группы животных, привитых внутримышечно эмульсионными вакцинами со сложным типом эмульсии «В-М-В» (адъюванты ISA-206 VG, ISA-207 VG) показали наилучшие уровни антител. Защитные титры 5,0 и более $\log_2$ SN₅₀ были определены у всех животных как против вируса типа А, так и против вируса типа О. Однако в РН защитные уровни вируснейтрализующих антител (ВНА) были установлены у 65% животных против типа А и 35% против типа О.

Иные результаты были получены, когда вакцинацию проводили подкожным способом. Результаты представлены на рисунке 4.

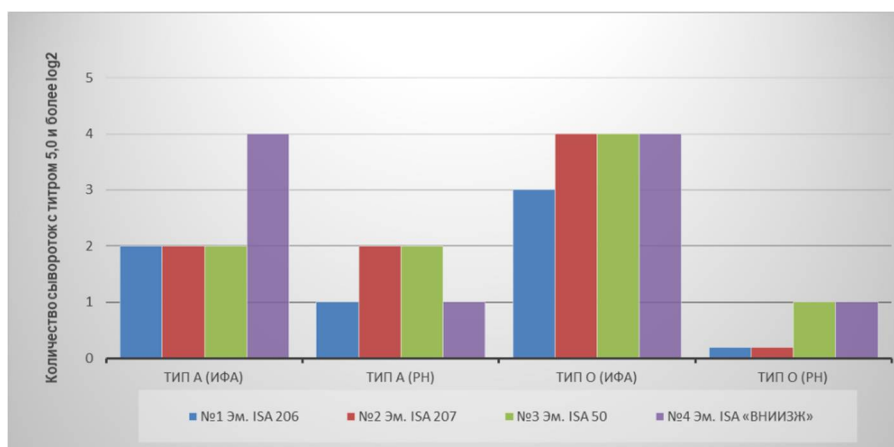


Рисунок 4 – Количественное соотношение животных, выявленных с защитным уровнем вирусоспецифических антител по результатам ЖБ ИФА и РН после подкожной иммунизации противоящурной вакциной с различными адьювантами

Анализ данных рисунка 5 показал, что защитные уровни специфических антител при подкожном введении были установлены в реакции ЖБ ИФА у 52% из группы особей против типа А и 74% из группы против типа О. У этих же свиней в РН установили защитные титры ВНА у 26% из группы вакцинированных животных против типа А и 10% из группы против типа О. Таким образом, лучшим способом введения является внутримышечный для всех препаратов, изготовленных с применением масляных адьювантов Montanide ISA-206 VG, ISA-207 VG и ISA-50 VG. При этом с использованием масляного адьюванта «ВНИИЗЖ» стимулирующая активность вакцины была одинаковой как при внутримышечном, так и при подкожном способах введения.

3.3.2 Изучение иммуногенной активности вакцины производственной серии на свиньях

Сравнили результаты по оценке гуморального и протективного иммунитета при внутримышечном и подкожном введении противоящурной культуральной инактивированной эмульсионной вакцины производственной серии № 141022 в дозе 2,0 см³. Результаты исследований в РН и ИФА представлены в таблицах 5 и 6.

Анализ данных таблицы 5 показал, что средние значения титров вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотках крови свиней группы «А», привитых цельной вакциной внутримышечно, через 21 СПВ при определении в РН составили $5,58 \pm 0,65 \log_2 \text{SN}_{50}$, и все животные имели защитные уровни ($\geq 5,0 \log_2 \text{SN}_{50}$). У животных, привитых вакциной в разведениях 1/5 и 1/25, защитный уровень ВНА в реакции нейтрализации не обнаружили, тогда как в ИФА три и две головы, соответственно, имели защитный уровень антител.

Таблица 5 – Иммуногенная активность вакцины производственной серии № 141022 после контрольного заражения вирусом ящура штамма «А №2155 /Забайкальский /2013»

Разведение вакцины	Способ введения	Кол-во защищенных животных по результатам РН на 21 СПВ	Кол-во защищенных животных по результатам ИФА на 21 СПВ	Результаты контрольного заражения вирусом ящура		
				кол-во защищенных животных из общего количества	ПД ₅₀ по ИФА	ПД ₅₀
без разведения	в/м (группа А)	5/5	4/5	5/5	8,10	11,18
1/5		1/5	2/5	3/5		
1/25		0/5	3/5	2/5		
без разведения	п/к (группа В)	5/5	5/5	5/5	8,10	11,18
1/5		2/5	2/5	2/5		
1/25		0/5	2/5	3/5		
Контроль				0/2		

Примечание: числитель - количество животных с защитным уровнем антител, знаменатель - общее количество животных в опыте, СПВ – суток после вакцинации, ПД₅₀ – количество протективных доз в 2см³.

Титр специфических антител, определенных методом ЖБ ИФА, в группе животных, привитых внутримышечно цельной вакциной, через 21 СПВ составлял $\geq 5,0 \log_2 \text{SN}_{50}$. Иммуногенная активность равнялась 11,18 ПД₅₀ в 2,0 см³ препарата.

Средние значения титров ВНА в сыворотках крови свиней группы «В», привитых цельной вакциной подкожно, через 21 СПВ в РН составили $6,05 \pm 0,75 \log_2 \text{SN}_{50}$, все животные имели защитный уровень антител против вируса ящура типа А.

В образцах сывороток крови от животных, привитых разведенной вакциной в 5 и 25 раз, при исследовании в РН не было обнаружено защитного уровня антител. По результатам ИФА при введении вакцины в цельном виде имели защитный титр 5 голов из 5, а при инокуляции данным образцом вакцинного препарата в разведениях 1/5 и 1/25 – 2 из 5 и 3 из 5, соответственно.

На 21 СПВ проводили контрольное заражение гомологичным штаммом вируса ящура типа А и при этом в группе свиней, иммунизированных цельной вакциной, все пять животных были защищены от процесса генерализации, а в группах, получивших дозы 0,4 и 0,08 см³ вакцины, были защищены как при внутримышечном, так и при подкожном способах введения препарата по 3 и 2 подсвинка, соответственно. Иммуногенная активность вакцины по валентности типа А составила 11,18 ПД₅₀ в 2,0 см³ препарата.

При использовании формулы Кербера для расчета иммуногенности с учетом значений защитных титров вирусоспецифических антител, определенных в ЖБ ИФА, ПД₅₀ при внутримышечном и при подкожном введениях, составили по 8,1 ПД₅₀ в прививной дозе.

Результаты контрольного заражения, представленные в таблице 6, показывают, что средние значения титров ВНА в сыворотках крови свиней группы «А», привитых цельной вакциной внутримышечно, через 21 СПВ составили $6,00 \pm 0,65 \log_2 \text{ SN50}$. По результатам ЖБ ИФА, через 21 СПВ защитный титр вирусоспецифических антител имели пять исследованных животных из пяти вакцинированных.

Животные, которые были иммунизированы внутримышечно в объеме $0,4 \text{ см}^3$ и $0,08 \text{ см}^3$, имели титры ВНА в РН через 21 СПВ $4,95 \pm 0,66 \log_2 \text{ SN50}$ и $3,15 \pm 0,54 \log_2 \text{ SN50}$, соответственно. Три из пяти вакцинированных животных дозой $0,4 \text{ см}^3$ имели защитный уровень ВНА.

Результаты, полученные в ЖБ ИФА, показали, что через 21 СПВ все пять голов животных, иммунизированных полной дозой вакцины ($2,0 \text{ см}^3$), имели защитный титр вирусоспецифических антител. При введении $0,4 \text{ см}^3$ защита отмечалась у четырех голов, а при инокуляции в дозе $0,08 \text{ см}^3$ – у двух голов.

Таблица 6 – Иммуногенная активность вакцины производственной серии № 141022 после контрольного заражения вирусом ящура штамма «О №2212/Приморский /2014»

Разведение вакцины	Способ введения	Кол-во защищенных животных по результатам РН на 21 СПВ	Кол-во защищенных животных по результатам ИФА на 21 СПВ	Результаты контрольного заражения вирусом ящура		
				количество защищенных животных из общего количества	ПД ₅₀ по ИФА	ПД ₅₀
без разведения	в/м (группа А)	5/5	5/5	5/5	21,28	29,30
1/5		3/5	4/5	5/5		
1/25		0/5	3/5	3/5		
без разведения	п/к (группа В)	5/5	5/5	5/5	21,30	21,30
1/5		0/5	5/5	5/5		
1/25		0/5	2/5	2/5		
Контроль				0/2		

Примечание: числитель - количество животных с защитным уровнем антител, знаменатель - общее количество животных в опыте, СПВ – суток после вакцинации, ПД₅₀ – количество протективных доз в 2 см^3

При контрольном заражении гомологичным вирусом ящура типа О были защищены от генерализации по пять голов животных, получивших полную дозу и объем $0,4 \text{ см}^3$ препарата, и две головы, иммунизированные в объеме $0,08 \text{ см}^3$. Иммуногенная активность против вируса ящура типа О составила 29,30 ПД₅₀ при внутримышечном введении и 21,28 ПД₅₀ при подкожном способе введения. Иммуногенная активность, рассчитанная по значениям ЖБ ИФА, была равна при внутримышечном введении 21,28 ПД₅₀ и при подкожной инъекции – 29,30 ПД₅₀.

4. Заключение

4.1 Итоги исследований

1. Установлено, что режим инактивации вируса ящура типов А и О в течение 24 часов с помощью 0,003 М БЭИ при pH 7,2-7,8 и температуре $37,0 \pm 0,1$ °C снижает количество 146S компонента на 8,16% и 6,01%, соответственно. В то же время при аналогичных условиях инактивации с 0,03% АЭЭИ происходит снижение 146S компонента для типа О на 9,7 %, а для типа А на 10,97%.

2. Установлено, что полигексаметиленгуанидин гидрохлорид в концентрациях 0,005, 0,007, 0,01% при очистке культуральной вирусосодержащей суспензии снижает количество 146S компонента на 4,6; 6,0 и 20,0 %, соответственно.

3. Разработана эффективная схема подготовки антигена для иммунизации животных, включающая ультрафильтрацию, очистку флокулянтами и преципитацию полиэтиленгликолем, позволяющая получить с максимальным сохранением 146S компонента высокоиммуногенный материал, необходимый для индукции специфических антител высокой авидности к ключевым эпитопам вируса ящура.

4. Установлено, что в разработанных тест-системах оптимальные рабочие разведения антигена вируса ящура штамма «А №2155/Забайкальский/2013» сенсibilизирующих и детекторных антител составили 1:3000, 1:9000, 1:4000, а для штамма «О №2212/Приморский/2014» – 1:3500, 1:9000, 1:4500, соответственно.

5. Разработаны тест-системы на основе ЖБ ИФА с применением антигена вируса ящура штаммов «А №2155/Забайкальский/2013» и «О №2212/Приморский/2014» и создан набор для определения гуморального иммунитета у вакцинированных животных и контроля эффективности вакцин против ящура.

6. Определены валидационные характеристики тест-систем на основе полученных иммуноспецифических компонентов вируса ящура типов А и О в 95 %-ном доверительном интервале, а именно, для типа А диагностическая чувствительность – 98,55%, диагностическая специфичность – 97,63%, для типа О диагностическая чувствительность – 98,44%, диагностическая специфичность – 97,53%.

7. Тест-система ФГБУ «ВНИИЗЖ» по сравнению с набором PrioСНЕК показала более высокую диагностическую чувствительность, так как выявляла через 14 дней после вакцинации по типу А – 35,9% и по типу О – 51,28% животных с защитным уровнем вирусоспецифических антител от количества вакцинированных животных, тогда как в тест-системе PrioСНЕК – 4,7% животных были с защитным уровнем вирусоспецифических антител по типу А и 46,15% – по типу О.

8. В экспериментах по оценке гуморального и протективного иммунитета у свиней, привитых эмульсионными противоящурными вакцинами, было показано, что уровни титров антител, определенных в реакции нейтрализации и ЖБ ИФА, коррелировали с результатами контрольного заражения и не зависели от способа введения вакцины и применяемого адъюванта.

4.2 Практические предложения

Разработаны и внедрены в лабораторную практику:

- «Методические рекомендации по определению флоккулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида)»;
- «Набор для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе», СТО 00495527-0407-2022;
- «Методические рекомендации по концентрированию антигена вируса ящура с помощью тангенциальной фильтрационной установки».
- «Промышленный регламент на производство набора для определения антител к структурным белкам вируса ящура в иммуноферментном анализе ПР-ЛПЯ-017/01».

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Использование результатов данной работы и дальнейшее совершенствование диагностических систем необходимо при проведении мониторинговых исследований, определении эффективности вакцинопрофилактики и контроле качества культуральных инактивированных противоящурных вакцин.

5. Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Гусева М.Н., **Гочмурадов Ы.М.** и др. Определение критериев для исследования флоккулирующих свойств полисепта (полигексаметиленгуанидин гидрохлорида) //Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11. – №. 3. – С. 254-261.
2. Доронин М.И. **Гочмурадов Ы.М.** и др. Определение титра антител против вируса ящура штамма А№ 2269/ВНИИЗЖ/2015 генотипа А/ASIA/G-VII с помощью жидкофазного блокирующего непрямого варианта ИФА //Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2022. – №. 3 (55). – С. 75-83.
3. Инактивация вируса ящура для изготовления вакцин / Д.В. Михалишин, В.В. Михалишин, **Ы.М. Гочмурадов**, Ю.С. Елькина // Ветеринария сегодня. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 164-170. – DOI 10.29326/2304-196X-2023-12-2-164-170. – EDN OSNPJE.
4. Никифоров В. В. Доронин М. И., Фомина С.Н., **Ы.М. Гочмурадов** др., Молекулярно-эпизоотологические исследования свойств вируса ящура серотипа SAT-2 и разработка средств специфической профилактики // Материалы конференции ... Вакцины нового поколения для профилактики особо опасных болезней сельскохозяйственных животных. – 2023. – С. 14-21.
5. Луговская Н.Н., **Ы.М. Гочмурадов** и др. Изучение серотипоспецифичности диагностических тест-систем для выявления антител к структурным белкам вируса ящура иммуноферментным анализом //Ветеринария сегодня. – 2024. – Т. 13. – №. 1. – С. 44-56.
6. Патент № 2787714 «Тест-система на основе жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА для определения титра антител против вируса ящура штамма А N2269/ВНИИЗЖ/2015 генотипа А/ASIA/G-VII в сыворотках крови животных после иммунизации»: Н.Н. Луговская, М.И. Доронин, Д.В. Михалишин, **Ы.М. Гочмурадов**, и др., заявл. 28.03.2022: опубл. 11.01.2023, бюл. № 2.

7. Патент № 2812211 «Тест-система для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма "Азия-1 N 2356/14/2018" с помощью жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА»: М.И. Доронин, **Ы.М. Гочмурадов**, Н. Н. Луговская и др., заявл. 03.07.2023: опубл. 25.01.2024 бюл. № 3.

8. Патент № 2815540 «Тест-система для определения титра антител против структурных белков вируса ящура штамма "О N2212/Приморский/2014" генотипа О/SEA/Муа-98 в сыворотках крови животных на основе жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА»: Н.Н. Луговская, М.И. Доронин, Д.В. Михалишин, **Ы.М. Гочмурадов**, заявл. 11.05.2023: опубл. 18.03.2024, бюл. № 8.

9. Патент № 2796393 «Способ быстрого количественного определения уровня гуморального иммунитета животных к штамму О N2311/Забайкальский/2016 генотипа О/ME-SA/Ind-2001 вируса ящура после вакцинации с помощью жидкофазного "сэндвич"-варианта ИФА»: Луговская Н.Н., Доронин М.И., Михалишин Д.В., **Гочмурадов Ы.М.**, заявл. 18.05.2022: опубл. 23.05.2023, бюл. № 15.

10. Патент № 2798510 «Тест-система для количественного определения уровня гуморального иммунитета животных против антигена вируса ящура А N 2205/G-IV генотипа А/AFRICA/G-IV с помощью жидкофазного блокирующего непрямого "сэндвич"-варианта ИФА»: Доронин М.И., Луговская Н.Н., Михалишин Д.В., **Гочмурадов Ы.М.**, заявл. 22.08.2022: опубл. 23.06.2023 бюл. № 18.

Подписано в печать __. __. 20__ г.

Формат 60х90 1/16. Усл. печ. л. 1 Тираж 80 экз.

Отпечатано на полиграфической базе

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»