



УДК 619:616.98:578.835.2:615.371

КОНТРОЛЬ ИММУНОГЕННОСТИ ПРОТИВОЯЩУРНЫХ ВАКЦИН ФГБУ «ВНИИЗЖ» НА ОТСУТСТВИЕ ИНДУКЦИИ АНТИТЕЛ К НЕСТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА

Д. А. Лозовой¹, Д. В. Михалишин², В. А. Стариков³, М. И. Доронин⁴, А. С. Шарыпов⁵

¹ Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: lozovoy@arriah.ru

² Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: michalishin_dv@arriah.ru

³ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ Младший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: doronin@arriah.ru

⁵ Ведущий ветеринарный врач, аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: sharipov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследований противоящурных вакцин на способность стимулировать в организме крупного рогатого скота выработку антител к неструктурным белкам вируса ящура в различные сроки после вакцинации. Для изготовления вакцин использовали культуральный вирус ящура типов А, О, Азия-1, САТ-2, репродуцированный в суспензионной культуре клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17). Антиген вируса ящура инактивировали раствором аминэтилэтиленимина с последующей очисткой суспензии. Готовили не очищенный от неструктурных белков вируса ящура препарат для моделирования наличия в вакцине неструктурных белков вируса ящура. Исследования сывороток крови крупного рогатого скота до и после иммунизации проводили с помощью тест-систем ИФА, по наличию антител, специфичных к ЗАВС полипротеину. Введение животным неочищенного препарата индуцировало образование антител, специфичных к неструктурным белкам вируса, у 87,5% голов на 30-е сут, 75% – на 44-е сут и 62,5% – на 132-е сут после третьей иммунизации. Установлено: все тестируемые производственные вакцины ФГБУ «ВНИИЗЖ» против ящура не вызывали образования антител к неструктурным протеинам вируса ящура, что свидетельствует об их полном удалении из вирусосодержащей суспензии.

Ключевые слова: антитела, неструктурные белки вируса ящура, противоящурная вакцина, клеточный детрит, иммуноферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание парнокопытных животных, которое относится к категории трансграничных инфекций. Возбудитель принадлежит к порядку *Picornavirales*, семейству *Picornaviridae*, роду *Aphthovirus*. Характерной особенностью вируса ящура является наличие 7 типов (О, А, С, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3) и множества подтипов с различными антигенными характеристиками [1, 8]. Геном вируса кодирует 4 структурных и 8 неструктурных белков, вызывающих у животных выработку антител.

Поддержание эффективности функционирования буферной зоны Российской Федерации против ящура предполагает систематическую вакцинацию и регулярные мониторинговые исследования с целью контроля иммунного фона, а также выявления возможного скрытого перенесения заболевания и вирусносительства среди животных [4]. У вакцинированных животных должны обнаруживаться антитела только к структурным белкам. Это одно из основных требований МЭБ (ОIE), предъявляемых к современным противоящур-

ным вакцинам. Оно достигается очисткой вируса от основной массы неструктурных протеинов, которые ассоциированы с клеточным дебрисом [5, 7].

Важным инструментом контроля болезни является детекция антител к неструктурным белкам вируса ящура. Без данного анализа невозможна серодиагностика заболевания в регионах, где проводится профилактическая вакцинация. Иммунизированные и инфицированные вирусом ящура животные вырабатывают антитела к его структурным белкам. Животные, инфицированные вирусом ящура, индуцируют поликлональные антитела к структурным белкам и антитела к неструктурным протеинам. Поэтому таких животных от вакцинированных можно отличить по наличию антител к неструктурным белкам. Для выявления неструктурных полипептидов вируса ящура широко применяют ИФА-тест [3, 6, 9]. Данный метод основан на способности обнаруживать антитела к неструктурным белкам (ЗАВС полипротеину) вируса ящура и тем самым позволяет дифференцировать иммунизированных животных от реконвалесцентов, а также выявлять бессимптомных вирусоносителей среди вакцинированного поголовья [5, 9]. Антитела к неструктурным белкам обнаруживаются на 19-е сут после инфицирования и сохраняются в организме на протяжении года [2, 7].

Цель данного исследования – подтвердить отсутствие неструктурных белков в составе вакцин против ящура, производимых ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. В работе использовали суспензионную перевиваемую клеточную линию из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17).

Вирус. Для изготовления вакцин использовали культуральный вирус ящура типов А, О, Азия-1, САТ-2, репродуцированный в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17.

Инактивация. Инактивацию антигена вируса ящура проводили с помощью раствора аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ) с последующей очисткой суспензии от балластных белков при помощи флокулянта.

Определение компонентного состава инактивированного вируса ящура. Для определения концентрации вирусспецифического белка, а также 146S, 75S и 12S структурных компонентов использовали количественный вариант реакции связывания комплемента (РСК) [2].

Вакцины. В работе применяли следующие вакцины:

- 1) эмульсионная трехвалентная вакцина против ящура типов А, О и Азия-1 (коммерческая);
- 2) сорбированная универсальная моновалентная вакцина против ящура типа А (коммерческая);
- 3) сорбированная поливалентная вакцина против ящура типов А, О, Азия-1, САТ-2 (коммерческая);
- 4) сорбированная бивалентная вакцина против ящура типов А и О (коммерческая);
- 5) сорбированная моновалентная вакцина против ящура типа Азия-1 (неочищенная, экспериментальная).

Для моделирования ситуации наличия в вакцине неструктурных белков вируса ящура изготовили препараты без очистки от неструктурных белков.

Животные. В исследовании использовали крупный рогатый скот (КРС) голштино-фризской породы, мас-

сой 250–300 кг, в возрасте 9–12 месяцев, в количестве 40 голов.

Иммунизация животных. Все животные были разделены соответственно на 5 групп по 8 голов КРС, которых иммунизировали вышеуказанными вакцинами. Инъекции осуществляли в дозе 2 см³ подкожно сорбированными вакцинами и внутримышечно – эмульсионным препаратом. Все животные были подвергнуты трехкратной иммунизации с интервалом 21–30 сут согласно требованиям МЭБ (ОIE) [8].

Тестирование сывороток крови КРС. Исследования сывороток крови КРС проводили до иммунизации, далее через 21 сут после первой иммунизации, через 27 сут после второй иммунизации, через 30, 44 и 134 сут после третьей иммунизации с использованием трех коммерческих тест-систем ИФА:

- 1) «Набор для определения антител к неструктурным белкам вируса ящура иммуноферментным методом в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия);
- 2) «PrioCHECK® FMDV NS ELISA for *in vitro* detection of antibodies against Foot and Mouth Disease Virus in serum of cattle, sheep and pigs» (Prionics Lelystad B. V., Нидерланды);
- 3) «FMDV ZABC-TRAPPING ELISA» (IZSLER Biotechnology Laboratory, Италия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В опыте использовали 4 коммерческие вакцины против ящура типов А, О, Азия-1, САТ-2 производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» и 1 экспериментальную, которая содержала неструктурные белки вируса ящура, ассоциированные с детритом клеток линии ВНК-21/2-17. От привитых животных отбирали кровь для исследования сывороток на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура, которую исследовали с помощью 3 коммерческих диагностических тест-систем методом ИФА.

Для контроля коммерческой эмульсионной противоящурной вакцины типов А, О, Азия-1 на чистоту (контроль на антитела против неструктурных белков) была сформирована группа № 1 из 8 голов КРС в возрасте 9–12 месяцев.

Животных вакцинировали внутримышечно в дозе 2 см³ трехкратно, с интервалом 21–30 сут, согласно «Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals», 2012.

С целью определения антител к неструктурным белкам вируса ящура сыворотки крови отбирали до вакцинации, через 21 сут после первой иммунизации, через 27 сут после второй иммунизации и через 30 сут после третьей. Результаты исследований представлены в таблице.

Как следует из таблицы, при тестировании коммерческой эмульсионной трехвалентной вакцины против ящура типов А, О и Азия-1 в сыворотках крови животных контрольной группы № 1 до вакцинации, а также через 21 сут после первой иммунизации, через 27 сут после второй и через 30 сут после третьей иммунизации не были выявлены антитела к неструктурным белкам вируса ящура во всех тест-системах ИФА.

Животные в группах № 2, 3 и 4, иммунизированные трехкратно коммерческими препаратами, выпускаемыми ФГБУ «ВНИИЗЖ», на протяжении всего опыта не индуцировали в организме антител к неструктурным

Исследование сывороток крови КРС на наличие антител к неструктурным белкам вируса ящура методом ИФА (n = 8)

Номер группы	Название вакцины	Кратность иммунизации	Время отбора сыворотки крови	Результаты исследования проб сывороток крови с применением тест-систем (количество иммунизированных животных в группе / количество животных с наличием антител к неструктурным белкам вируса ящура)		
				ВНИИЗЖ	Prionics	IZSLER
1	Эмульсионная трехвалентная вакцина против ящура типов А, О, Азия-1	–	До иммунизации	8/0	8/0	8/0
		1	Через 21 сут после 1-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		2	Через 27 сут после 2-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		3	Через 30 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
2	Сорбированная универсальная моновалентная вакцина против ящура типа А	–	До иммунизации	8/0	8/0	8/0
		1	Через 21 сут после 1-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		2	Через 27 сут после 2-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		3	Через 30 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
			Через 44 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
Через 132 сут после 3-й иммунизации	8/0		8/0	8/0		
3	Сорбированная поливалентная вакцина против ящура типов А, О, Азия-1, САТ-2	–	До иммунизации	8/0	8/0	8/0
		1	Через 21 сут после 1-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		2	Через 27 сут после 2-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		3	Через 30 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
			Через 44 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
Через 132 сут после 3-й иммунизации	8/0		8/0	8/0		
4	Сорбированная бивалентная вакцина против ящура типов А и О	–	До иммунизации	8/0	8/0	8/0
		1	Через 21 сут после 1-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		2	Через 27 сут после 2-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
		3	Через 30 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
			Через 44 сут после 3-й иммунизации	8/0	8/0	8/0
Через 132 сут после 3-й иммунизации	8/0		8/0	8/0		
5	Сорбированная моновалентная вакцина против ящура типа Азия-1 (неочищенный антиген)	–	До иммунизации	8/0	8/0	8/0
		1	Через 21 сут после 1-й иммунизации	8/7	8/7	8/7
		2	Через 27 сут после 2-й иммунизации	8/7	8/7	8/7
		3	Через 30 сут после 3-й иммунизации	8/7	8/7	8/7
			Через 44 сут после 3-й иммунизации	8/6	8/6	8/6
Через 132 сут после 3-й иммунизации	8/5		8/5	8/5		

Номер группы: 1 – контрольная; 2, 3, 4 – коммерческие; 5 – экспериментальная.

белкам вируса ящура. Исследование проводили тремя коммерческими ИФА-наборами. Это дает основание утверждать, что в коммерческой вакцине ФГБУ «ВНИИЗЖ» неструктурные белки вируса отсутствуют.

В группе № 5 КРС в количестве 8 голов трехкратно инокулировали экспериментальной сорбированной моновалентной вакциной против ящура типа Азия-1. В сыворотках крови животных до иммунизации антитела к неструктурным белкам вируса выявлены не были. Спустя 21 сут после первой иммунизации, 27 сут после второй и 30 сут после третьей иммунизации 3 тест-системами ИФА у 7 из 8 голов (87,5%) детектировали антитела, специфичные к ЗАВС полипротеину. Тестируя сыворотки крови КРС на 44-е сут после третьей иммунизации, данные антитела детектировали в 6 из 8 образцов (75%), а на 132-е сут – у 5 из 8 животных (62,5%). При этом наблюдали снижение титра антител к неструктурным белкам вируса ящура в период с 30-х по 132-е сут после третьей иммунизации от 87,5 до 62,5%, что ранее отдельные исследователи отмечали в аналогичных опытах с применением противоящурных вакцин [7, 9].

Согласно литературным источникам, отсутствие неструктурных белков в вакцинах связывают с очисткой вирусного антигена от клеточных мембран с ассоциированными на них неструктурными белками [6, 7, 9]. Таким образом, проводимая в ФГБУ «ВНИИЗЖ» очистка культурального антигена вируса ящура при изготовлении вакцин эффективно удаляет неструктурные белки из вирусосодержащей суспензии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное тестирование на наличие ЗАВС полипротеина сывороток крови голов КРС, иммунизированных вакцинами против ящура, показало, что все тестируемые производственные коммерческие вакцины, изготовленные в ФГБУ «ВНИИЗЖ», являются очищенными от неструктурных протеинов вируса ящура, не вызывают образования антител к ним и полностью соответствуют требованиям Всемирной организации по охране здоровья животных (МЭБ (OIE)).

Введение животным неочищенного препарата индуцировало образование антител, специфичных к неструктурным белкам вируса, у 87,5% голов на 30-е сут,

75% – на 44-е сут и 62,5% – на 132-е сут после третьей иммунизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 19-я конференция Региональной комиссии МЭБ по Европе (Израиль), 19–22 сентября 2000 г. – С. 111–119.
2. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. – Суздаль, 1994. – 92 с.
3. Разработка блокирующего варианта иммуноферментного анализа для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура / А. В. Каньшина, А. С. Яковлева, Е. С. Орлова, А. В. Щербаков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2014. – Т. 12. – С. 13–23.
4. Результаты мониторинговых исследований по ящуру в России в 2011 году / А. М. Рахманов, С. Р. Кременчугская, А. В. Мищенко, А. В. Щербаков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2012. – Т. 10. – С. 7–17.
5. Рекомбинантные неструктурные белки ЗА, ЗВ и ЗАВ вируса ящура: использование для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота / А. С. Яковлева, А. В. Щербаков, А. В. Каньшина [и др.] // Молекулярная биология. – М., 2006. – Т. 40, № 1. – С. 165–171.
6. Clavijo A., Wright P., Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease // *Vet. J.* – 2004. – Vol. 167. – P. 9–22.
7. Immune responses of pigs to commercialized emulsion FMD vaccines and live virus challenge / S. P. Chena, M. C. Lee, Y. F. Sun [et al.] // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25, № 22. – P. 4464–4469.
8. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. – 7th ed. – Paris, 2012. – Vol. 1, Chap. 2.1.5. – P. 166–169.
9. The non-structural polyprotein ЗАВС of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle / M. de Diego, E. Brocchi, D. Mackay [et al.] // *Arch. Virol.* – 1997. – Vol. 142. – P. 2021–2033.

PURITY TESTING OF ARRIAH FMD VACCINES

D. A. Lozovoy¹, D. V. Mikhailishin², V. A. Starikov³, M. I. Doronin⁴, A. S. Sharypov⁵

¹ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: lozovoy@arriah.ru

² Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: michalishin_dv@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ Junior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: doronin@arriah.ru

⁵ Leading Veterinarian, Postgraduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: sharypov@arriah.ru

SUMMARY

The paper demonstrates results of FMD vaccine testing for their inability to induce antibodies to FMD virus non-structural proteins (FMDV NSP antibodies) in cattle at different dates post vaccination. Subtype A, O, Asia-1 and SAT-2 cultural FMD virus replicated in baby hamster kidney suspension culture (BHK-21/2-17) was used for vaccine production. FMDV antigen was inactivated with aminoethyl ethylenimine solution, and the suspension was subsequently purified. Non NSP-purified preparation was made to simulate presence of NSPs in the vaccine. ELISA test-kits were used for testing cattle sera collected before and after immunization for presence of 3ABC polyprotein-specific antibodies. Inoculation of cattle with non-purified preparation induced antibodies specific to FMDV NSPs in 87.5% animals on day 30, in 75% animals on day 44 and in 62.5% animals on day 132 post third immunization. All tested vaccines manufactured by the FGBI "ARRIAH" were demonstrated to induce no FMDV NSP antibodies suggesting their complete removal from the virus-containing suspension.

Key words: antibodies, FMDV non-structural proteins, FMD vaccine, cell debris, ELISA.

INTRODUCTION

Foot and mouth disease is a highly contagious viral disease of cloven-hoofed animals, categorized as a transboundary disease. The causative agent belongs to *Picornavirales* order, *Picornaviridae* family, *Aphthovirus* gender. The specific peculiarity of FMD virus is its seven immunologically distinct types: O, A, C, Asia-1, SAT-1, SAT-2, SAT-3 and variety of subtypes with different antigenic characteristics. [1, 8]. The virus genome encodes for structural and eight non-structural proteins inducing antibodies in animals.

The effective maintenance of the protection zone in the Russian Federation envisages consistent vaccination and regular monitoring tests to control immunity and detect potential occult disease and virus carriage in animals [4]. Vaccinated animals shall demonstrate antibodies only to structural proteins. This is one of the basic OIE requirements for FMD vaccines. The compliance with the requirement is achieved by purification of the virus from the majority of NSPs which are associated with cell debris [5, 7].

An important tool to control the disease is the detection of FMDV NSP antibodies. Avoiding this test makes impossible serological diagnostics in the regions, where preventive vaccination is carried out. FMD immunized and infected animals induce antibodies to its structural proteins. FMD infected animals induce polyclonal antibodies to structural proteins and antibodies to non-structural proteins. That's why such animals can be differentiated from vaccinated ones by the presence of antibodies to

non-structural proteins. ELISA is widely used to detect FMDV non-structural polypeptides [3, 6, 9]. This technique is based on the ability to detect FMDV NSP antibodies (3ABC polyprotein) and thus to differentiate immunized animals from convalescent animals as well as to detect asymptomatic virus carriers in a vaccinated population [5, 9]. Antibodies to non-structural proteins are detected on day 19 post infection and persist in the body for a year afterwards [2, 7].

The aim of this study was to confirm the absence of non-structural proteins in FMD vaccines produced by the FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH").

MATERIALS AND METHODS

Cell line Continuous baby hamster kidney suspension cell line (BHK-21/2-17) was used in the study.

Virus. Subtype A, O, Asia-1 and SAT-2 cultural FMD virus replicated in baby hamster kidney suspension culture (BHK-21/2-17) was used for vaccine production.

Inactivation. FMDV antigen was inactivated with the aminoethylethylenimin solution and the suspension was subsequently purified from ballast proteins using flocculant.

Inactivated FMDV compositional analysis. To determine the concentrations of virus-specific protein as well as 146S, 75S and 12S structural components quantitative complement fixation test (CFT) was used [2].

Vaccinated cattle sera ELISA testing for FMDV NSPs antibodies (n=8)

Group	Vaccine	Vaccination	Sera sampling time	Sera testing results using test kits (number of vaccinated animals per group/number of animals with FMDV NSPs)		
				ARRIAH	Prionics	IZSLER
1	Emulsion Trivalent Vaccine against FMD Types A, O, Asia-1	–	Before vaccination	8/0	8/0	8/0
		1	21 days post vaccination 1	8/0	8/0	8/0
		2	27 days post vaccination 2	8/0	8/0	8/0
		3	30 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
2	Sorbate Universal Monovalent Vaccine against FMD Type A	–	Before vaccination	8/0	8/0	8/0
		1	21 days post vaccination 1	8/0	8/0	8/0
		2	27 days post vaccination 2	8/0	8/0	8/0
		3	30 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
			44 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
132 days post vaccination 3	8/0		8/0	8/0		
3	Sorbate Polyvalent Vaccine against FMD Types A, O, Asia-1, SAT-2	–	Before vaccination	8/0	8/0	8/0
		1	21 days post vaccination 1	8/0	8/0	8/0
		2	27 days post vaccination 2	8/0	8/0	8/0
		3	30 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
			44 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
132 days post vaccination 3	8/0		8/0	8/0		
4	Sorbate Bivalent Vaccine against FMD Types A and O	–	Before vaccination	8/0	8/0	8/0
		1	21 days post vaccination 1	8/0	8/0	8/0
		2	27 days post vaccination 2	8/0	8/0	8/0
		3	30 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
			44 days post vaccination 3	8/0	8/0	8/0
132 days post vaccination 3	8/0		8/0	8/0		
5	Sorbate Monovalent Vaccine against FMD type Asia-1 (<i>non-purified antigen</i>)	–	Before vaccination	8/0	8/0	8/0
		1	21 days post vaccination 1	8/7	8/7	8/7
		2	27 days post vaccination 2	8/7	8/7	8/7
		3	30 days post vaccination 3	8/7	8/7	8/7
			44 days post vaccination 3	8/6	8/6	8/6
			132 days post3 vaccination	8/5	8/5	8/5

Groups: 1 – controls; 2, 3, 4 – commercial vaccines; 5 – experimental vaccine.

Vaccines. The following vaccines were used in the study:
 1. Emulsion trivalent vaccine against FMD, types A, O and Asia-1 (commercial);
 2. Sorbate universal monovalent vaccine against FMD type A (commercial);
 3. Sorbate polyvalent vaccine against FMD, types A, O, Asia-1, SAT-2 (commercial);
 4. Sorbate bivalent vaccine against FMD, types A and O (commercial);

5. Sorbate monovalent vaccines against FMD type Asia-1 (non-purified, experimental).
 To simulate presence of FMDV NSPs in a vaccine, NSP non-purified preparations were made.
Animals: Forty 9-12 month old, 250-300 kg Holstein-Friesian cattle were used in the study.
Vaccination of animals. All cattle were divided into 5 groups with 8 animals in each and immunized with the abovementioned vaccines. Sorbate vaccines were injected

subcutaneously and emulsion vaccines were administered intramuscularly at the dose of 2 cm³. All animals were vaccinated three times at the interval of 21–30 days according to the OIE instructions. [8].

Cattle sera testing. Cattle sera were tested before vaccination, 21 days post first vaccination, 27 days post second vaccination and 30, 44 and 134 days post third vaccination using the following three commercial ELISA test kits:

1. ELISA Test Kit for Detection of Foot and Mouth Disease Non-Structural Proteins in Sera of Cattle and Small Ruminants (FGBI "ARRIAH", Russia);
2. "PrioCHECK® FMDV NS ELISA for *in vitro* detection of antibodies against Foot and Mouth Disease Virus in serum of cattle, sheep and pigs" (Prionics Lelystad B. V., Netherlands);
3. "FMDV 3ABC-TRAPPING ELISA" (IZSLER Biotechnology Laboratory, Italy).

RESULTS AND DISCUSSION

4 commercial vaccines against FMD, types A, O, Asia-1, SAT-2 produced by the FGBI "ARRIAH" and one experimental vaccine containing FMDV NSPs associated with BHK-21/2-17 cell debris were used in the study. Blood samples were taken from vaccinated animals to test sera for FMDV NSPs using three commercial ELISA diagnostic test kits.

For purity testing of commercial emulsion vaccine against FMD types A, O, Asia-1 (test for NSPs antibodies) Group 1 containing eight 9-12 month old cattle was made.

Animals were vaccinated intramuscularly at the dose of 2 cm³ three times at the interval of 21–30 days according to the OIE "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2012".

To detect antibodies to FMDV NSPs sera were sampled before vaccination, 21 days post first vaccination, 27 days post second vaccination and 30 days post third vaccination. Test results are shown in the Table below.

As it is seen from the table no FMDV NSPs antibodies were detected using all ELISA test kits in sera of Group 1 before vaccination, 21 days post first immunization, 27 days post second immunization and 30 days post third immunization.

Animals of Groups 2, 3 and 4, immunized three times with commercial vaccines produced by the FGBI "ARRIAH", did not induce any FMDV NSPs antibodies during the whole study. Test was performed using three commercial ELISA test kits. This suggests that FGBI "ARRIAH" vaccines contain no FMDV NSPs.

Group 5 (eight cattle) were inoculated three times with the experimental sorbate monovalent vaccine against FMD type Asia-1. Before inoculation no FMDV NSP antibodies had been detected in their sera. 21 days post first vaccination, 27 days post second immunization and 30 days post third vaccination antibodies specific to 3ABC protein were detected in seven animals out of eight (87.5%) using all three ELISA test kits. Testing of cattle sera 44 days post third immunization revealed these antibodies in 6 out of 8 samples (75%) and 132 days post

vaccination in 5 out of 8 animals (62.5%). Moreover FMDV NSP antibody titre decrease from 87.5% to 62.5% was observed on days 30 to 132 post third immunization, which has been reported previously in analogous trials using FMD vaccines [7, 9].

According to publications the absence of NSPs in vaccines is conditioned by purification of virus antigen from NSP associated-cell membranes [6, 7, 9]. Thus purification of FMDV cultural antigen performed by the FGBI "ARRIAH" when producing vaccines effectively removes non-structural proteins from virus containing suspension.

CONCLUSION

Test for 3ABC protein in sera of cattle immunized with FMD vaccines showed that all tested commercial vaccines produced by the FGBI "ARRIAH" are purified from FMDV NSPs and do not induce antibodies to them being completely compliant with the requirements of the World Organization for Animal Health (OIE).

Inoculation of animals with non-purified preparation induced FMDV NSP specific antibodies in 87.5% animals at day 30, 75% at day 44 and in 62.5% at day 132 post third immunization.

REFERENCES

1. 19th OIE Regional Commission for Europe (Israel) September 19 – 22, 2000. – P. 111–119.
2. Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical analysis of viral proteins. – Suzdal, 1994. – 92 p.
3. Development of blocking ELISA to detect FMDV NSP antibodies / A. V. Kanshina, A. S. Yakovleva, E. S. Orlova, A. V. Scherbakov // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health. – Vladimir, 2014. – Vol. 12. – P. 13–23.
4. Results of FMD Monitoring Tests in 2011 / A. M. Rakhmanov, C. R. Kremenchugskaya, A. V. Mischenko, A. V. Scherbakov // Proceedings of the Federal Centre for Animal Health. – Vladimir, 2012. – Vol. 10. – P. 7–17.
5. FMDV recombinant non-structural proteins 3A, 3B and 3AB: their use for differentiation between vaccinated and infected cattle / A. S. Yakovleva, A. V. Scherbakov, A. V. Kanshina [et al.] // Molecular Biology – M., 2006 – Vol. 40, №1. – P. 165–171.
6. Clavijo A., Wright P., Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease // Vet. J. – 2004. – Vol. 167. – P. 9–22.
7. Immune responses of pigs to commercialized emulsion FMD vaccines and live virus challenge / S. P. Chena, M. C. Lee, Y. F. Sun [et. al.] // Vaccine. – 2007. – Vol. 25, № 22. – P. 4464–4469.
8. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) / OIE. – 7th ed. – Paris, 2012. – Vol. 1, Chap. 2.1.5. – P. 166–169.
9. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle / M. de Diego, E. Brocchi, D. Mackay [et. al.] // Arch. Virol. – 1997. – Vol. 142. – P. 2021–2033.