



Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура (обзор)

А. С. Яковлева, А. В. Щербаков

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Ящур – высококонтагиозное вирусное заболевание парнокопытных животных, способное вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб. Болезнь остается огромной проблемой в развивающихся странах и представляет постоянную угрозу для развитых стран. Важным инструментом контроля заболевания является обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура в крови восприимчивых животных. Это единственный способ, позволяющий достоверно дифференцировать вакцинированных животных от переболевших и вирусоносителей. Для выявления антител к неструктурным протеинам вируса ящура разработаны различные модификации твердофазного иммуноферментного анализа. В качестве антигена в них используются рекомбинантные неструктурные белки вируса ящура, чаще всего 3ABC или 3AB. За короткий срок иммуноферментный анализ с использованием рекомбинантных антигенов вируса ящура прошел путь от внутрилабораторного метода до общедоступных коммерческих тест-систем, большинство из которых обладают высокой диагностической специфичностью и чувствительностью. Данный метод широко применяется в надзоре за ящуром. В странах или зонах, благополучных по ящуру без вакцинации, иммуноферментный анализ, основанный на обнаружении антител к неструктурным белкам вируса ящура, применяется как основной метод серологического мониторинга и ретроспективной диагностики заболевания. В благополучных по ящуру странах и зонах с вакцинацией этот метод используется для доказательства отсутствия вирусной инфекции в вакцинированных стадах. В Южной Америке при эрадикации заболевания иммуноферментный анализ, основанный на обнаружении антител к неструктурным белкам вируса ящура, применялся для выявления инфицированных животных, а в настоящее время этот метод используется для мониторинга циркуляции возбудителя в еще неблагополучных по заболеванию странах Азии и Африки, реализующих программу прогрессивного контроля за ящуром. В России, как стране с зонами вакцинации против ящура, данный метод является обязательным инструментом надзора за заболеванием. Обзор составлен на основе анализа 65 источников.

Ключевые слова: обзор, вирус ящура, неструктурные белки, иммуноферментный анализ

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Яковлева А. С., Щербаков А. В. Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура (обзор). *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 190–196. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-190-196.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Яковлева Анастасия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьеvec, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

Detection of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus (review)

A. S. Yakovleva, A. V. Scherbakov

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

SUMMARY

Foot-and-mouth disease (FMD) is a highly contagious viral disease of cloven-hooved animals that can cause epidemics and great economic losses. The disease remains a huge problem in developing countries and poses a constant threat to developed countries. Detection of antibodies to FMD virus non-structural proteins in the blood of susceptible animals is an important tool for the disease control. This is the only way for reliable differentiation of vaccinated animals from convalescent and virus-carrier animals. Various modifications of solid-phase enzyme immunoassay (ELISA) have been developed for detection of antibodies to FMD virus nonstructural proteins. Recombinant FMD virus non-structural proteins, mostly 3ABC or 3AB, are used as an antigen for such assay. In a short time, recombinant FMD virus antigen-based ELISA has evolved from an in-house laboratory method to commonly available commercial test systems, most of which have high diagnostic specificity and sensitivity. The said method is widely used for FMD surveillance. In the countries and zones free from FMD without vaccination the ELISA for detection of antibodies against FMD virus non-structural proteins is used as a primary method for FMD serological monitoring and retrospective diagnosis. In the countries and zones free from FMD with vaccination this ELISA is used for confirmation of the virus infection absence in vaccinated herds. In South America, ELISA for detection of antibodies against FMD virus non-structural proteins was used for detection of infected animals during the disease eradication. Currently, it is used for monitoring for the virus circulation in still FMD infected Asian and African countries implementing progressive FMD control programme. In Russia having zones where anti-FMD vaccination is carried out this method is a mandatory tool of the disease surveillance. The review is based on the analysis of 65 publications.

Keywords: review, foot-and-mouth disease virus, non-structural proteins, enzyme-linked immunosorbent assay

Acknowledgements: The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the research topic: "Veterinary Welfare".

For citation: Yakovleva A. S., Scherbakov A. V. Detection of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus (review). *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 190–196. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-3-190-196.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

For correspondence: Anastasia S. Yakovleva, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозная вирусная болезнь домашних и диких парнокопытных животных, проявляющаяся везикулярными поражениями эпителия ротовой полости, конечностей и вымени [1]. Относится к категории трансграничных болезней, способных преодолевать границы между государствами, вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни является безоболочечный РНК-содержащий вирус ящура, представитель рода *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae* [2]. Различают семь серотипов вируса: О, А, С, Азия-1, SAT-1, SAT-2 и SAT-3. В пределах каждого серотипа вирус ящура дифференцируют на топотипы, генетические линии и сублинии [3, 4].

Борьба с ящуром осуществляется путем профилактической вакцинации восприимчивых сельскохозяйственных животных в энзоотичных регионах и защитных зонах, созданных в некоторых благополучных странах (например, в России) на границах с неблагополучными по заболеванию государствами. Иммунизация предотвращает клиническое проявление болезни, однако не всегда способна предотвратить субклиническую инфекцию или персистенцию вируса [5]. Вакцинированные особи, которые были заражены вирусом ящура, потенциально способны стать источником инфекции для других восприимчивых животных [6]. В связи с этим программа надзора за ящуром в странах или зонах с вакцинацией в обязательном порядке предусматривает доказательство отсутствия циркуляции вируса в иммунизированных стадах. Самым надежным индикатором инфекции у вакцинированных животных являются антитела к неструктурным белкам вируса ящура [7–10].

При репликации вируса ящура в клетках в равных количествах синтезируются 4 структурных белка (1А, 1В, 1С и 1D) и 10 неструктурных протеинов (НСП): L, 2А, 2В, 2С, 3А, 3В₁₋₃, 3С и 3D (рис. 1). Неструктурные белки выполняют различные функции в процессе размножения вируса в инфицированных клетках: полимеразную, хеликазную, протеазную и др. Функции некоторых НСП вируса ящура пока не выяснены [1, 11]. В отличие от структурных белков неструктурные протеины являются высококонсервативными, т. е. у разных серотипов вируса ящура не различаются серологическими методами.

У инфицированных вирусом ящура животных вырабатываются антитела ко всем вирусным белкам:

и структурным, и неструктурным. У животных, вакцинированных против ящура, антительный профиль отличается: у них, как правило, выявляют антитела только против структурных белков вируса. Это обусловлено тем, что современные противоящурные вакцины проходят этап очистки, и большая часть неструктурных белков вируса удаляется из них вместе с клеточным дебрисом [12, 13]. Таким образом, выявление антител к неструктурным белкам вируса ящура может служить доказательством инфицирования животного вирусом независимо от того, было оно вакцинировано или нет.

РАЗРАБОТКА СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ К НЕСТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ЯЩУРА

Для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура испытывались различные технологии: иммунодиффузия в агаровом геле [14], иммуноблоттинг [15] и др., однако наиболее технологичным методом оказался твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) [16].

При разработке ИФА, предназначенного для выявления антител к неструктурным протеинам вируса

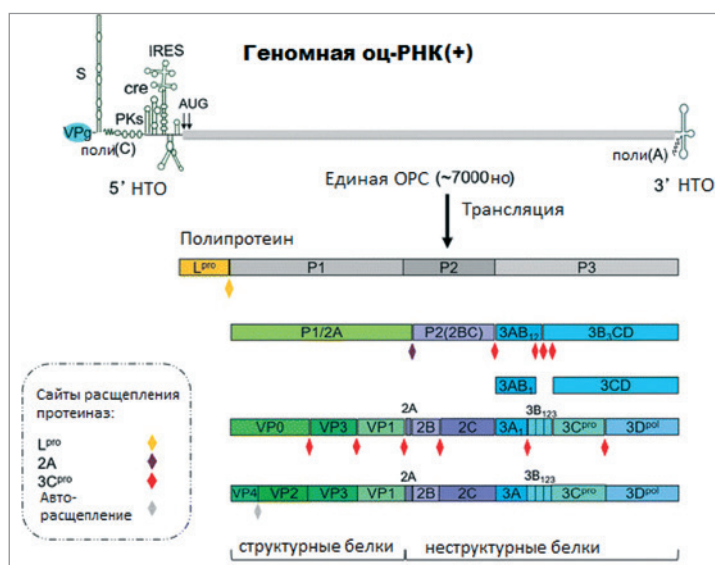


Рис. 1. Схематическое изображение генома вируса ящура и процесс образования вирусных белков [11]

Fig.1 Schematic diagram of FMD virus genome and processing of viral proteins [11]

ящура (НСП-ИФА), необходимо было решить проблему, связанную с получением антигена. Поскольку очищенные неструктурные белки вируса ящура трудно получать из инфицированной культуры клеток, все исследователи применяли в качестве антигена в НСП-ИФА химически синтезированные пептиды [17, 18] или значительно чаще – рекомбинантные белки [19]. Рекомбинантные белки получали путем молекулярного клонирования и экспрессии соответствующих генов вируса ящура в *Escherichia coli* (*E. coli*) [19–23] или системе бакуловирус – клетки насекомых [24–27].

В качестве антигена в НСП-ИФА испытывались практически все неструктурные белки вируса ящура [28–32]. Многочисленные исследования показали, что наилучшую дифференциацию постинфекционных и поствакцинальных антител против вируса ящура обеспечивало применение в НСП-ИФА рекомбинантных белков 3AB или 3ABC [8, 20, 21, 23, 32–37]. Антигенная активность полипротеина 3ABC, вероятно, определяется входящими в его состав белками 3A и 3B, а роль белка 3C значительно меньше. Так, было показано, что рекомбинантный белок 3C не реагирует с гипериммунной сывороткой в иммуноблотинге и, следовательно, не содержит линейных эпитопов, распознаваемых антителами [34].

Для выявления антител к НСП вируса ящура разработаны различные варианты твердофазного ИФА. В непрямом варианте ИФА (н-ИФА) для детекции антител, связавшихся с неструктурным антигеном вируса ящура, применяется антивидовой (т. е. видоспецифический) конъюгат. В связи с этим н-ИФА в большинстве случаев позволяет исследовать сыворотки крови либо крупного, либо мелкого рогатого скота, либо свиней. В конкурентном варианте ИФА в качестве детектирующих антител применяются меченные ферментом поликлональные [38] или моноклональные [24] антитела против неструктурных белков вируса ящура. Этот вариант позволяет исследовать сыворотки крови всех видов животных. В 2015 г. M. Hosamani et al. предложили использовать в непрямом варианте 3ABC-ИФА белок G, конъюгированный с пероксидазой хрена. Это позволило исследовать в н-ИФА сыворотки крови от разных видов животных [39].

Большинство описанных иммуноферментных тест-систем на основе белка 3ABC или его составляющих отличались высокой специфичностью и чувствительностью. НСП-ИФА позволял выявлять постинфекционные антитела к вирусу ящура в течение 12–18 месяцев начиная с 7–10 дня после инфицирования [21, 23, 28, 40–42]. E. Elnekave et al. [43] удавалось обнаруживать антитела через 3 года, а W. B. Chung et al. – спустя 3,5 года после заражения [25].

Вначале применявшийся лишь в лабораториях – разработчиках метода, НСП-ИФА прошел этап коммерциализации, и к настоящему времени несколько компаний (Bionote, IDEXX Laboratories, Inc., ThermoFisher Scientific, Inc. (США), IDvet (Франция), IZSLER (Италия) и др.) производят коммерческие тест-системы для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура.

Опубликовано несколько работ, посвященных сравнительной оценке коммерческих наборов [42, 44–46]. Наиболее масштабные сличительные испытания провели E. Brocchi et al. [47]. Они сравнили шесть диагностических наборов: CHEKIT-FMD-3ABC (Bommeli

Diagnostics, Швейцария); UBI® FMDV NS EIA (United Biomedical, Inc., США); I-ELISA 3ABC/EITB (PANAFITOSA, США); Ceditest® FMDV-NS ELISA (Cedi Diagnostics B.V., Нидерланды); 3ABC trapping-ELISA (IZS-Brescia, Италия); SVANOVIR™ FMDV 3ABC-Ab ELISA (Svanova, Швеция). С помощью каждой тест-системы была исследована 3551 проба сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота из девяти стран. Все испытываемые наборы продемонстрировали высокую специфичность (> 96%), однако чувствительность наборов значительно варьировала. Самую высокую относительную чувствительность продемонстрировали тест-системы 3ABC trapping-ELISA (100%), I-ELISA 3ABC/EITB (99,6%) и Ceditest® FMDV-NS ELISA (99,6%), существенно ниже она была у UBI® FMDV NS EIA (88,8%), SVANOVIR™ FMDV 3ABC-Ab ELISA (83,6%) и CHEKIT-FMD-3ABC (81,5%).

Поскольку диагностическая специфичность у всех тест-систем неабсолютна, при их использовании в серологической диагностике ящура существует вероятность получения ложноположительных результатов. Для преодоления этой проблемы рекомендуется использовать подтверждающий тест, которым может быть либо НСП-ИФА от другого разработчика, либо иммуноблотинг [8, 48].

НСП-ИФА В НАДЗОРЕ ЗА ЯЩУРОМ

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) рекомендует НСП-ИФА как официальный метод серологической диагностики ящура [48].

Для стран, благополучных по ящуру без вакцинации, НСП-ИФА является идеальным инструментом серомониторинга и ретроспективной диагностики ящура, поскольку позволяет в одной реакции выявлять антитела ко всем семи серотипам вируса [8, 49].

Определение антител к неструктурным белкам вируса ящура является ключевым диагностическим инструментом надзора за ящуром в регионах, где эта болезнь энзоотична [50]. В ходе эрадикации ящура в Южной Америке НСП-ИФА использовался как скрининговый метод для выявления инфицированных животных в вакцинированных стадах. Неблагополучные по ящуру страны, принявшие и реализующие национальные дорожные карты по поэтапной борьбе с ящуром в рамках стратегии прогрессивного контроля за ящуром, разработанной Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО), применяют НСП-ИФА для мониторинга циркуляции вируса [1].

Страны, претендующие на получение или восстановление утраченного статуса благополучия по ящуру, обязаны предоставлять в ВОЗЖ доосье, в котором, помимо прочего, должны быть отражены результаты тестирования животных на антитела к неструктурным белкам вируса ящура. После признания свободными от ящура страны должны продолжать серологические исследования для подтверждения статуса.

НСП-ИФА является обязательным инструментом, применяемым для контроля трансграничных перевозок живых животных и продуктов животного происхождения. Международные правила, регулирующие торговлю сельскохозяйственными животными, требуют тестировать на антитела к НСП вируса ящура рогатый скот и свиней, импортируемых из стран или зон с вакцинацией [51].

Широкое применение НСП-ИФА в диагностических и мониторинговых исследованиях ящура выявило как многочисленные достоинства метода, так и определенные ограничения, связанные с его применением. К достоинствам относятся высокая диагностическая чувствительность и специфичность, технологичность, возможность в одной реакции выявлять антитела ко всем серотипам вируса ящура.

Ограничения, связанные с применением НСП-ИФА, обусловлены не столько свойствами этого метода, сколько особенностями исследуемых образцов. Уже ранние исследования показали, что НСП-ИФА выявляет антитела у некоторых вакцинированных животных [7, 52–56]. Так, с помощью тест-системы PrioCHECK FMDV NS (ThermoFisher Scientific, Inc., США) S. P. Chen et al. установили, что все невакцинированные или однократно вакцинированные свиньи были серонегативными, однако антитела к неструктурным белкам вируса ящура были обнаружены у 16,2% многократно вакцинированных животных [54]. В исследовании G. K. Sharma et al. специфичность НСП-ИФА на невакцинированном поголовье была очень высокой и доходила до 100% [42]. Однако при анализировании тест-системой PrioCHECK FMDV NS проб, отобранных на 14-й день после вакцинации, антитела к неструктурным белкам вируса ящура были выявлены у 33% особей. Возможно, что такое большое количество животных с антителами к НСП вируса ящура объясняется тем, что вакцина индийского производства не прошла должную очистку от НСП (т. е. не соответствовала необходимым требованиям по показателям чистоты). Однако имеются и другие многочисленные данные, свидетельствующие о том, что некоторые животные после вакцинации вырабатывают антитела к неструктурным белкам вируса ящура. Так, в экспериментах T. Teklegiorghis et al. семь из ста голов крупного рогатого скота имели антитела к неструктурным белкам вируса ящура после однократной вакцинации [57]. Необходимо отметить, что уровень таких антител был низким: при тестировании сывороток крови с помощью набора PrioCHECK FMDV NS максимальный процент ингибции составлял 58% при позитивно-негативном пороге 50%.

В исследованиях, проведенных китайскими специалистами, количество вакцинированного крупного рогатого скота с антителами против НСП вируса ящура коррелировало с кратностью вакцинаций: среди вакцинированных до 10 раз животных серопозитивными были 2,15%, а до 15 раз – уже 5,93% [58].

Вероятно, даже очистка вакцины не позволяет полностью избавиться от неструктурных белков вируса ящура в ее составе [58, 59]. Очевидно, именно это обстоятельство заставило ВОЗ внести изменение в требования к противоящурным вакцинам. Если по ранее действовавшим правилам вакцина не должна была вызывать образование антител к НСП вируса ящура после трех вакцинаций, то в действующей редакции Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных ВОЗ допускается, чтобы одно из восьми животных, вакцинированных дважды, имело такие антитела [48].

Таким образом, при проведении диагностических и мониторинговых исследований с применением НСП-ИФА в зонах с вакцинацией необходимо учитывать возможность выявления серопозитивных животных,

у которых антитела к неструктурным белкам вируса ящура имеют поствакцинальное, а не постинфекционное происхождение.

ПРИМЕНЕНИЕ НСП-ИФА В РОССИИ

В Российской Федерации исследования по разработке ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура проводились в Федеральном центре охраны здоровья животных (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир). Методом экспрессии в *E. coli* были получены рекомбинантные белки 3А, 3В и 3АВ вируса ящура [60]. На основе рекомбинантных антигенов был разработан непрямой вариант ИФА для выявления антител к НСП вируса ящура в сыворотках крови крупного рогатого скота [61, 62]. Несколько позднее был предложен усовершенствованный вариант 3АВ-ИФА, позволяющий тестировать сыворотки крови не только крупного, но и мелкого рогатого скота [63]. Этот метод прошел валидацию, в ходе которой было показано, что его диагностическая специфичность составляет 99,8%, а чувствительность – 96,6% [64]. Данный метод включен в область аккредитации ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В связи с тем, что Россия принадлежит к числу стран с зонами вакцинации против ящура, для нее НСП-ИФА является обязательным инструментом серологического надзора за заболеванием. При проведении серонадзора используется диагностический алгоритм тестирования проб, рекомендованный ВОЗ для ящура [51], а также применяемый в медицине для диагностики некоторых особо значимых болезней, например ВИЧ-инфекции¹. Суть его заключается в использовании двух тест-систем: скрининговой и подтверждающей. Первичный скрининг проб в ФГБУ «ВНИИЗЖ» проводится с использованием 3АВ-ИФА, разработанного А. С. Яковлевой и соавт. [64], а все пробы, показавшие положительный результат, повторно тестируются с помощью коммерческого набора PrioCHECK FMDV NS. Заключение о положительном статусе какой-либо пробы делается в случае, если она показала положительный результат в обеих тест-системах. Таким образом, применение скринингового и подтверждающего тестов позволяет исключить ложные положительные результаты при проведении диагностических и мониторинговых исследований [65].

В рамках федерального мониторинга ящура в 2015–2022 гг. в ФГБУ «ВНИИЗЖ» методом НСП-ИФА было исследовано около 250 тыс. проб сыворотки крови крупного и мелкого рогатого скота из всех регионов РФ. Результаты серологических исследований вошли в качестве доказательной базы в досье, по итогам рассмотрения которых ВОЗ присвоила России статус страны с зоной, благополучной по ящуру без вакцинации (включает 52 субъекта РФ), и тремя зонами, свободными от ящура с вакцинацией (включают еще 16 регионов РФ)².

С целью обеспечения региональных ветеринарных лабораторий РФ современными средствами серологической диагностики ящура в ФГБУ «ВНИИЗЖ»

¹ СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573660140>.

² Режим доступа: <https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/#ui-id-2>.

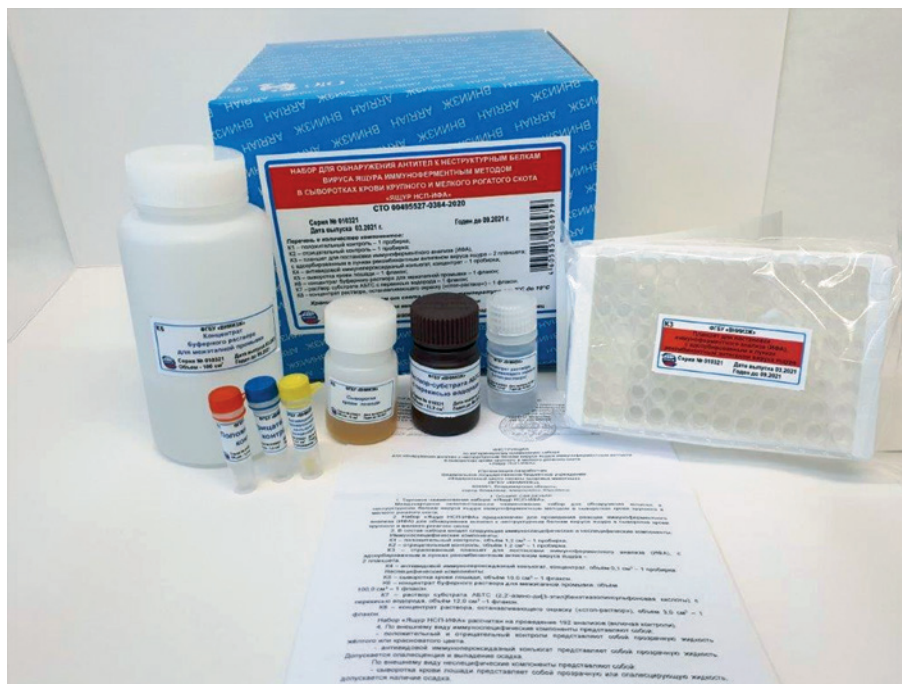


Рис. 2. Набор для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура «Ящур НСП-ИФА» производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Fig. 2. FMD-NSP-ELISA test-kit for detection of antibodies against FMD virus non-structural proteins produced by the FGBI "ARRIAH"

организовано производство коммерческого набора для выявления антител к неструктурным белкам вируса ящура «Ящур НСП-ИФА» (рис. 2)³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружение антител к неструктурным белкам вируса ящура является важным инструментом надзора за заболеванием. Способность НСП-тестов определять инфекцию независимо от серотипа вируса определяет их востребованность в странах, благополучных по ящуру без вакцинации, а возможность с помощью НСП-ИФА выявлять инфекцию у вакцинированных животных обеспечивает его широкое применение в странах или зонах с вакцинацией. Однако необходимо учитывать, что дифференциация вакцинированных и инфицированных животных с помощью НСП-тестов возможна только при условии применения высокоочищенных противоящурных вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Jamal S. M., Belsham G. J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet. Res.* 2013; 44 (1):116. DOI: 10.1186/1297-9716-44-116.
2. Grubman M. J., Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17 (2): 465–493. DOI: 10.1128/CMR.17.2.465-493.2004.
3. Samuel A. R., Knowles N. J. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J. Gen. Virol.* 2001; 82 (3): 609–621. DOI: 10.1099/0022-1317-82-3-609.
4. Carrillo C., Tulman E. R., Delhon G., Lu Z., Carreno A., Vagnozzi A., et al. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 2005; 79 (10): 6487–6504. DOI: 10.1128/JVI.79.10.6487-6504.2005.
5. Hutber A. M., Kitching R. P., Conway D. A. Control of foot-and-mouth disease through vaccination and the isolation of infected animals. *Trop. Anim. Health. Prod.* 1998; 30 (4): 217–227. DOI: 10.1023/a:1005071027414.
6. Arzt J., Belsham G. J., Lohse L., Botner A., Stenfeldt C. Transmission of foot-and-mouth disease from persistently infected carrier cattle to naive

cattle via transfer of oropharyngeal fluid. *mSphere*. 2018; 3 (5):e00365–18. DOI: 10.1128/mSphere.00365-18.

7. Crowther J. R. Review of the developments in the detection of antibodies to non-structural proteins of foot and mouth disease virus. In: *The use of non-structural proteins of foot and mouth disease virus (FMDV) to differentiate between vaccinated and infected animals*. Vienna: IAEA; 2007; 3–46. Режим доступа: https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1546_web.pdf. (дата обращения: 18.01.2023).

8. Tewari A., Ambrose H., Parekh K., Inoue T., Guitian J., Nardo A. D., et al. Development and validation of confirmatory foot-and-mouth disease virus antibody ELISAs to identify infected animals in vaccinated populations. *Viruses*. 2021; 13 (5):914. DOI: 10.3390/v13050914.

9. Clavijo A., Wright P., Kitching P. Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *Vet. J.* 2004; 167 (1): 9–22. DOI: 10.1016/S1090-0233(03)00087-X.

10. Yadin H., Brenner J., Chai D., Oved Z., Hadany Y., Kusak A., Haimovich M. The NSP immune response of vaccinated animals after in-field exposure to FMDV. *Vaccine*. 2007; 25 (49): 8298–8305. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.071.

11. Gao Y., Sun S. Q., Guo H. C. Biological function of foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virol. J.* 2016; 13:107. DOI: 10.1186/s12985-016-0561-z.

12. Doel T. R. FMD vaccines. *Virus Res.* 2003; 91 (1): 81–99. DOI: 10.1016/S0168-1702(02)00261-7.

13. Lubroth J., Grubman M. J., Burrage T. G., Newman J. F., Brown F. Absence of protein 2C from clarified foot-and-mouth disease virus vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated animals. *Vaccine*. 1996; 14 (5): 419–427. DOI: 10.1016/0264-410X(95)00172-w.

14. McVicar J. W., Suttmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (via) antigen as a tool for epidemiologic surveys. *Am. J. Epidemiol.* 1970; 92 (4): 273–278. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121207.

15. Bergmann I. E., de Mello P. A., Neitzert E., Beck E., Gomes I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.* 1993; 54 (6): 825–831. PMID: 8391765.

16. Ma L. N., Zhang J., Chen H. T., Zhou J. H., Ding Y. Z., Liu Y. S. An overview on ELISA techniques for FMD. *Virol. J.* 2011; 8:419. DOI: 10.1186/1743-422X-8-419.

17. Shen F., Chen P. D., Walfeld A. M., Ye J., House J., Brown F., Wang C. Y. Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot-and-mouth disease by a peptide ELISA. *Vaccine*. 1999; 17 (23–24): 3039–3049. DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00148-6.

³ Режим доступа: <https://shop.arriah.ru/catalog/diagnostikum/nabor-dlya-obnaruzheniya-antitel-k-nesrukturnym-belkam-virusa-yashchura-immunofementnym-metodom-v->

18. Oem J. K., Kye S. J., Lee K. N., Park J. H., Kim Y. J., Song H. J., Yeh M. Development of synthetic peptide ELISA based on nonstructural protein 2C of foot and mouth disease virus. *J. Vet. Sci.* 2005; 6 (4): 317–325. PMID: 16293996.
19. Crowther J. R. The use of non-structural (NS) antigens of FMD virus to assess antibodies in vaccinated and infected livestock. In: *Foot-and-mouth disease: control strategies. Symposium Proceedings (2–5 June 2002)*. Lyons, France: 2002; 377.
20. Rodríguez A., Dopazo J., Sáiz J. C., Sobrino F. Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Arch. Virol.* 1994; 136 (1–2): 123–131. DOI: 10.1007/BF01538822.
21. De Diego M., Brocchi E., Mackay D., De Simone F. The non-structural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.* 1997; 142 (10): 2021–2033. DOI: 10.1007/s007050050219.
22. Foster M., Cook A., Cedillo L., Parkhouse R. M. Serological and cellular immune responses to non-structural proteins in animals infected with FMDV. *Vet. Q.* 1998; 20 (Suppl. 2): S28–30. DOI: 10.1080/01652176.1998.9694960.
23. Mackay D. K., Forsyth M. A., Davies P. R., Berlinzani A., Belsham G. J., Flint M., Ryan M. D. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine.* 1998; 16 (5): 446–459. DOI: 10.1016/s0264-410x(97)00227-2.
24. Sørensen K. J., de Stricker K., Dyrting K. C., Grazioli S., Haas B. Differentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals from vaccinated animals using a blocking ELISA based on baculovirus expressed FMDV 3ABC antigen and a 3ABC monoclonal antibody. *Arch. Virol.* 2005; 150 (4): 805–814. DOI: 10.1007/s00705-004-0455-z.
25. Chung W. B., Sorensen K. J., Liao P. C., Yang P. C., Jong M. H. Differentiation of foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated pigs by enzyme-linked immunosorbent assay using nonstructural protein 3AB as the antigen and application to an eradication program. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40 (8): 2843–2848. DOI: 10.1128/JCM.40.8.2843-2848.2002.
26. Kweon C. H., Ko Y. J., Kim W. I., Lee S. Y., Nah J. J., Lee K. N., et al. Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods. *Vaccine.* 2003; 21 (13–14): 1409–1414. DOI: 10.1016/s0264-410x(02)00684-9.
27. Meyer R. F., Babcock G. D., Newman J. F., Burrage T. G., Toohey K., Lubroth J., Brown F. Baculovirus expressed 2C of foot-and-mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals. *J. Virol. Methods.* 1997; 65 (1): 33–43. DOI: 10.1016/s0166-0934(96)02165-9.
28. Biswal J. K., Jena S., Mohapatra J. K., Bisht P., Pattnaik B. Detection of antibodies specific for foot-and-mouth disease virus infection using indirect ELISA based on recombinant nonstructural protein 2B. *Arch. Virol.* 2014; 159 (7): 1641–1650. DOI: 10.1007/s00705-013-1973-3.
29. Biswal J. K., Ranjan R., Pattnaik B. Diagnostic application of recombinant non-structural protein 3A to detect antibodies induced by foot-and-mouth disease virus infection. *Biologicals.* 2016; 44 (3): 157–162. DOI: 10.1016/j.jbiologicals.2016.02.004.
30. Mahajan S., Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sharma G. K., Pattnaik B. Truncated recombinant non-structural protein 2C-based indirect ELISA for FMD sero-surveillance. *J. Virol. Methods.* 2013; 193 (2): 405–414. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.07.003.
31. Mohapatra A. K., Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sanyal A., Pattnaik B. Diagnostic potential of recombinant nonstructural protein 3B to detect antibodies induced by foot-and-mouth disease virus infection in bovines. *Arch. Virol.* 2014; 159 (9): 2359–2369. DOI: 10.1007/s00705-014-2089-0.
32. He C., Wang H., Wei H., Yan Y., Zhao T., Hu X., et al. A recombinant truncated FMDV 3AB protein used to better distinguish between infected and vaccinated cattle. *Vaccine.* 2010; 28 (19): 3435–3439. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.02.072.
33. Bergmann I. E., Malirat V., Neitzert E., Beck E., Panizzutti N., Sánchez C., Falczuk A. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch. Virol.* 2000; 145 (3): 473–489. DOI: 10.1007/s007050050040.
34. Sun T., Lu P., Wang X. Localization of infection-related epitopes on the non-structural protein 3ABC of foot-and-mouth disease virus and the application of tandem epitopes. *J. Virol. Methods.* 2004; 119 (2): 79–86. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.02.016.
35. Lu Z., Cao Y., Guo J., Qi S., Li D., Zhang Q., et al. Development and validation of a 3ABC indirect ELISA for differentiation of foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals. *Vet. Microbiol.* 2007; 125 (1–2): 157–169. DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.05.017.
36. Zia M. A., Dobson S. J., Rowlands D. J., Stonehouse N. J., Shah M. S., Habib M. Development of an ELISA to distinguish between foot-and-mouth disease virus infected and vaccinated animals utilising the viral non-structural protein 3ABC. *J. Med. Microbiol.* 2022; 71 (4). DOI: 10.1099/jmm.0.001516.
37. Brocchi E., De Diego M. I., Berlinzani A., Gamba D., De Simone F. Diagnostic potential of Mab-based ELISAs for antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination. *Vet. Q.* 1998; 20 (Suppl. 2): S20–24. PMID: 9652058.
38. Sørensen K. J., Madsen K. G., Madsen E. S., Salt J. S., Ngindi J., Mackay D. K. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.* 1998; 143 (8): 1461–1476. DOI: 10.1007/s007050050390.
39. Hosamani M., Basagoudanavar S. H., Tamil Selvan R. P., Das V., Ngangom P., Sreenivasa B. P., et al. A multi-species indirect ELISA for detection of non-structural protein 3ABC specific antibodies to foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 2015; 160 (4): 937–944. DOI: 10.1007/s00705-015-2339-9.
40. Nanni M., Alegre M., Compaired D., Taboga O., Fondevila N. Novel purification method for recombinant 3AB1 nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus for use in differentiation between infected and vaccinated animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005; 17 (3): 248–251. DOI: 10.1177/104063870501700306.
41. Silberstein E., Kaplan G., Taboga O., Duffy S., Palma E. Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein. *Arch. Virol.* 1997; 142 (4): 795–805. DOI: 10.1007/s007050050119.
42. Sharma G. K., Mohapatra J. K., Mahajan S., Matura R., Subramaniam S., Pattnaik B. Comparative evaluation of non-structural protein-antibody detecting ELISAs for foot-and-mouth disease sero-surveillance under intensive vaccination. *J. Virol. Methods.* 2014; 207: 22–28. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.06.022.
43. Elnekave E., Shilo H., Gelman B., Klement E. The longevity of anti NSP antibodies and the sensitivity of a 3ABC ELISA – a 3 years follow up of repeatedly vaccinated dairy cattle infected by foot and mouth disease virus. *Vet. Microbiol.* 2015; 178 (1–2): 14–18. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.04.003.
44. Bronsvoort B. M., Sørensen K. J., Anderson J., Corteyn A., Tanya V. N., Kitching R. P., Morgan K. L. Comparison of two 3ABC enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of multiple-serotype foot-and-mouth disease in a cattle population in an area of endemicity. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (5): 2108–2114. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2108-2114.2004.
45. Moonen P., van der Linde E., Chénard G., Dekker A. Comparable sensitivity and specificity in three commercially available ELISAs to differentiate between cattle infected with or vaccinated against foot-and-mouth disease virus. *Vet. Microbiol.* 2004; 99 (2): 93–101. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.12.003.
46. Lee F., Lin Y. L., Jong M. H. Comparison of ELISA for the detection of porcine serum antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods.* 2004; 116 (2): 155–159. DOI: 10.1016/j.jviromet.2003.11.004.
47. Brocchi E., Bergmann I. E., Dekker A., Paton D. J., Sammin D. J., Greiner M., et al. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine.* 2006; 24 (47–48): 6966–6979. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.04.050.
48. Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.8.* Режим доступа: [https://www.woah.org/fileadmin/](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf)
49. Paton D. J., Ferris N. P., Hutchings G. H., Li Y., Swabey K., Keel P., et al. Investigations into the cause of foot-and-mouth disease virus seropositive small ruminants in Cyprus during 2007. *Transbound. Emerg. Dis.* 2009; 56 (8): 321–328. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2009.01088.x.
50. Chitray M., Grazioli S., Willems T., Tshabalala T., De Vleeschauwer A., Esterhuysen J. J., et al. Development and validation of a foot-and-mouth disease virus SAT serotype-specific 3ABC assay to differentiate infected from vaccinated animals. *J. Virol. Methods.* 2018; 255: 44–51. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.02.006.
51. WOAH. Terrestrial Animal Health Code. Режим доступа: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access>.
52. Armstrong R. M., Cox S. J., Aggarwal N., Mackay D. J., Davies P. R., Hamblin P. A., et al. Detection of antibody to the foot-and-mouth disease virus (FMDV) non-structural polyprotein 3ABC in sheep by ELISA. *J. Virol. Methods.* 2005; 125 (2): 153–163. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.01.012.
53. Robiolo B., Seki C., Fondevila N., Grigera P., Scodeller E., Periole O., et al. Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests. *Vaccine.* 2006; 24 (7): 997–1008. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.071.
54. Chen S. P., Ellis T. M., Lee M. C., Cheng I. C., Yang P. C., Lin Y. L., et al. Comparison of sensitivity and specificity in three commercial foot-and-mouth disease virus non-structural protein ELISA kits with swine sera in Taiwan. *Vet. Microbiol.* 2007; 119 (2–4): 164–172. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.09.013.

55. Mohapatra J. K., Pandey L. K., Sanyal A., Pattnaik B. Recombinant non-structural polyprotein 3AB-based serodiagnostic strategy for FMD surveillance in bovines irrespective of vaccination. *J. Virol. Methods*. 2011; 177 (2): 184–192. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.08.006.
56. Lee F., Jong M. H., Yang D. W. Presence of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in repeatedly vaccinated cattle. *Vet. Microbiol.* 2006; 115 (1–3): 14–20. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.12.017.
57. Tekleghiorghis T., Weerdmeester K., van Hemert-Kluitenberg F., Moormann R. J., Dekker A. Comparison of test methodologies for foot-and-mouth disease virus serotype A vaccine matching. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014; 21 (5): 674–683. DOI: 10.1128/CVI.00034-14.
58. Liu Z. Z., Zhao F. R., Gao S. D., Shao J. J., Zhang Y. G., Chang H. Y. Development of a chemiluminescence immunoassay using recombinant non-structural epitope-based proteins to accurately differentiate foot-and-mouth disease virus-infected and vaccinated bovines. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65 (2): 338–344. DOI: 10.1111/tbed.12811.
59. Barnett P. V., Geale D. W., Clarke G., Davis J., Kasari T. R. A review of OIE country status recovery using vaccinate-to-live versus vaccinate-to-die foot-and-mouth disease response policies I: benefits of higher potency vaccines and associated NSP DIVA test systems in post-outbreak surveillance. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62 (4): 367–387. DOI: 10.1111/tbed.12166.
60. Яковлева А. С., Каньшина А. В., Щербakov А. В. Экспрессия в *E. coli* рекомбинантных белков 3А, 3В и 3АВ вируса ящура. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2005; 3: 105–114. EDN: UNWYYB.
- Yakovleva A. S., Kanshina A. V., Scherbakov A. V. Expression of recombinant nonstructural proteins 3A, 3B and 3AB of foot-and-mouth disease virus in *E. coli*. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2005; 3: 105–114. EDN: UNWYYB. (in Russ.)
61. Яковлева А. С., Щербakov А. В., Каньшина А. В., Мудрак Н. С., Фомина Т. А. Рекомбинантные неструктурные белки 3А, 3В и 3АВ вируса ящура: использование для дифференциации вакцинированного и инфицированного крупного рогатого скота. *Молекулярная биология*. 2006; 40 (1): 165–171. EDN: HSWPVB.
- Yakovleva A. S., Shcherbakov A. V., Kanshina A. V., Mudrak N. S., Fomina T. A. Recombinant non-structural 3A, 3B and 3AB proteins of foot-and-mouth disease virus: use in indirect ELISA for differentiation of vaccinated and infected cattle. *Mol. Biol.* 2006; 40 (1): 146–151. DOI: 10.1134/S0026893306010195.
62. Яковлева А. С., Каньшина А. В., Щербakov А. В., Мудрак Н. С., Фомина Т. А. Использование рекомбинантных белков 3А, 3В и 3АВ вирусов ящура в непрямом варианте ИФА для дифференциации инфицированного и вакцинированного крупного рогатого скота. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2005; 3: 115–126. EDN: UNWYYL.
- Yakovleva A. S., Kanshina A. V., Scherbakov A. V., Mudrak N. S., Fomina T. A. Development of an indirect ELISA based on *E. coli* expressed 3A, 3B and 3AB nonstructural proteins of FMDV to differentiate between infected and vaccinated cattle. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2005; 3: 115–126. EDN: UNWYYL. (in Russ.)
63. Яковлева А., Каньшина А., Щербakov А. Development of indirect ELISA for detection of antibodies to foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins. In: *The Global Control of FMD – Tool, Ideas and Ideals: Book and Abstr. Europ. Commiss. Control FMD*. FAO; 2008; 80.
64. Яковлева А. С., Каньшина А. В., Щербakov А. В., Орлова Е. С. Разработка и валидация тест-системы 3AB-ИФА для обнаружения антител к неструктурным белкам вируса ящура в сыворотках крови крупного и мелкого рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2015; (4): 36–42. EDN: VODNXP.
- Yakovleva A. S., Kanshina A. V., Scherbakov A. V., Orlova Ye. S. Development and validation of 3AB-ELISA test-system for detection of antibodies to FMD virus nonstructural proteins in blood sera from cattle and small ruminants. *Veterinary Science Today*. 2015; (4): 36–42. EDN: VODNXP. (in Russ.)
65. Каньшина А. В., Яковлева А. С., Орлова Е. С., Щербakov А. В. Серомониторинг ящура. *Молекулярная диагностика: сборник трудов X Юбилейной международной научно-практической конференции (Москва, 9–11 ноября 2021 г.)*. Тамбов: ООО фирма «Юлис»; 2021; 2: 349–350. EDN: FEDYZQ.
- Kanshina A. V., Yakovleva A. S., Orlova Y. S., Scherbakov A. V. Seromonitoring yashchura = Seromonitoring for foot-and-mouth disease. *Molekulyarnaya diagnostika: sbornik nauchnykh trudov X Yubileinoi mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Moskva, 9–11 noyabrya 2021 g.) = Molecular diagnosis: Proceedings of the X Anniversary International Scientific and Practical Conference (Moscow, 9–11 2021)*. Tambov: ООО firma “Yulis”; 2021; 2: 349–350. EDN: FEDYZQ.

Поступила в редакцию / Received 19.04.2023

Поступила после рецензирования / Revised 15.05.2023

Принята к публикации / Accepted 19.06.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Яковлева Анастасия Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9211-9110>, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

Щербakov Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий референтной лабораторией по особо опасным болезням ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8326-4201>, e-mail: ascherbakov@arriah.ru.

Anastasia S. Yakovleva, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Highly Dangerous Diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9211-9110>, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru.

Aleksey V. Scherbakov, Candidate of Science (Biology), Head of Reference Laboratory for highly dangerous diseases, FGBI “ARRIAH”, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8326-4201>, e-mail: ascherbakov@arriah.ru.