Желудочно-кишечные вирусы свиней: патогенез и методы защиты

Porcine gastroenteric viruses: pathogenesis and protection

Luis Enjuanes

Мадрид

РЕЗЮМЕ / SUMMARY

ЭНТЕРАЛЬНЫЕ КОРОНАВИРУСЫ СВИНЕЙ

За последние годы заметно увеличилось количество коронавирусов свиней (CoVs) (Рисунок 1). К классическому вирусу трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV), известному с 1946 года, а также его делеционному мутанту-респираторному коронавирусу свиней (PRCV) с эксклюзивным респираторным тропизмом и вирусу эпидемической диареи свиней (PEDV), прибавилось несколько новых видов. Среди них: высоковирулентный вирус PEDV, который появился в Китае в 2010 году и в США три года спустя; дельта-коронавирус свиней (PDCoV), впервые обнаруженный в 2012 году; относительно недавно обнаруженный энтеральный коронавирус свиней, новый рекомбинантный вирус с основой TGEV и белком (S), образующим шиповидные отростки на оболочке (пепломеры), от PEDV. Несмотря на то, что впервые этот вирус описали в январе 2016 в Италии, а позднее (февраль 2016 года) и в Германии, он уже циркулировал в стадах свиней в 2009. Подобное увеличение числа коронавирусов свиней заметно усложняет диагностику болезней коронавирусной этиологии.

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА PEDV

На основе анализа структуры вириона PEDV, а также его генетической структуры и модели транскрипции, мы можем предположить, что указанный вирус обладает некоторым сходством с TGEV (Рисунок 2). PEDV очень быстро эволюционировал, вследствие чего в различных географических районах появились некоторые разновидности PEDV (Таблица 1). Число полных геномов PEDV в базе данных экспоненциально возрастало с момента секвенирования первых высокопатогенных штаммов PEDV в США в 2013 году и увеличилось практически в два раза за один год. На данный момент в GenBank зарегистрировано 334 генома вируса (апрель 2016 года). Вследствие вышеуказанного факта, мы можем классифицировать PEDV по нескольким генотипам, однако корреляция между генотипами и серотипами до конца не изучена. PEDV быстро эволюционирует, особенно последовательность гена S, в которой были

PORCINE ENTERIC CORONAVIRUSES

The complexity of known porcine coronaviruses (CoVs) has considerably increased (Fig. 1). To the classical transmissible gastroenteritis virus (TGEV) known since 1946, its deletion mutant with an exclusive respiratory tropism, the porcine respiratory CoV (PRCV), and the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), several emerging CoVs have been added. These CoVs include the highly virulent PEDV virus that emerged in China in 2010 and in the States around three years later, the porcine delta CoV (PDCoV) that was identified for the first time in 2012 and, more recently, the swine enteric CoV, a novel recombinant virus with the backbone of TGEV and the spike (S) protein from PEDV. Although this virus has been reported for the first time in January 2016 in Italy (Boniotti et al., 2016), and soon later (February 2016) in Germany (Akimkin et al., 2016), it was already present in swine samples circulating as early as in 2009. This augmented complexity of porcine CoVs has complicated the diagnostic of this family of viruses.

PEDV GENOME EVOLUTION

The virion structure of PEDV virus and of its genetic structure and transcription patterns shows that this virus is similar but not identical to TGEV virus (Fig. 2). PEDV has evolved very fast leading to the emergence of a variety of PEDVs in different geographical areas (Table 1). The number of PEDV full genomes in databases has exponentially grown since the first highly pathogenic USA PEDV strains were sequenced in 2013, and has almost duplicated in one year, with 334 genomes available in GenBank (April 2016). This fact has allowed the classification of PEDV viruses into several genotypes, although the correlation between genotypes and serotypes remains to be determined. PEDV is rapidly evolving, especially the sequence of the S gene, in which small insertions and deletions in North American strains (S-INDEL), and also large deletions, have been identified less than a year after the first isolation of PEDV in the USA (Jung and Saif, 2015). As a consequence, PEDV phylogenetic classification based on the S genes is quite different to that based on full-genome sequences, being the last one the most appropriate for evolutionary and epidemiological analyses (Huang et al., 2013; Jarvis et al., 2015; Vlasova et al., 2014).

At the beginning of the PEDV epidemics in the USA, the virus genomes were grouped in two genotypes based in full-length genomes: Genotype 1, divided into 1a (containing the classical EU PEDV strains) and 1b; and Genotype 2, divided into 2a and 2b which contains the first PEDV USA outbreak strains (Huang et al., 2013). Soon after sequencing additional PEDV isolates, USA strains were subdivided in Clades I and Clade II, this one containing the identified S-INDEL strains (Vlasova et al., 2014) (Fig. 3). The classification of PEDV genomes has become increasingly complex as: (i) USA S-INDEL and large S protein deletion strains have been identified (Oka et al., 2014; Wang et al., 2014a); (ii) currently circulating

Информация об авторах / Information about the authors

Luis Enjuanes¹, Alejandro Pascual¹, Carlos Sanchez¹, Alexei D. Zaberezhny², Isabel Sola¹, Sonia Zuniga¹

¹Отделение молекулярной и клеточной биологии, Государственный центр биотехнологий (CNB-CSIC), Мадрид, Испания.

²Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко (ВИЭВ), Москва, Россия.

¹Department of Molecular and Cell Biology, National Center of Biotechnology (CNB-CSIC), Madrid, Spain.

²Y. R. Kovalenko All-Russia Institute of Experimental Veterinary Medicine (VIEV). Moscow, Russia.

зафиксированы небольшие инсерции и делеции, а также крупные делеции в штаммах из Северной Америки (S-INDEL) менее года после первого выделения PEDV в США (Jung и Saif, 2015). Как следствие, филогенетическая классификация PEDV по S генам довольно сильно отличается от классификации по последовательностям полного генома и является наиболее подходящей для эволюционных и эпидемиологических анализов (Huang с соавт., 2013; Jarvis с соавт., 2015; Vlasova с соавт., 2014).

В начале эпидемий PEDV в США геномы вируса были сгруппированы в два генотипа на основе полных геномов: Генотип 1, поделенный на 1a (включающий классические штаммы PEDV из Европы) и 1b; Генотип 2, поделенный на 2a и 2b, который включает первые штаммы PEDV из США. Вскоре после секвенирования дополнительных штаммов PEDV, штаммы из США были разделены на группы ("клейды") I и II, последняя включает штаммы S-INDEL. Вследствие этого, классификация геномов PEDV сильно усложнилась, поскольку: (i) были обнаружены S-INDEL из США и штаммы с крупными делециями в белке S (Ока с соавт., 2014; Wang с соавт., 2014a); (ii) циркулирующие в настоящее время штаммы из Европы похожи на штаммы S-INDEL из США (Hanke с соавт., 2015; Theuns с соавт., 2015), кроме некоторых штаммов из Украины, которые похожи на первичные вирулентные штаммы PEDV из США; (iii) в Китае были обнаружены новые рекомбинантные вирусы PEDV, состоящие в одном кластере со штаммами S-INDEL из США (Li с соавт., 2016); (iv) также разделение на группы было проведено на основе временных периодов, в которые штаммы циркулировали. Самая последняя классификация штаммов PEDV основана на анализе мировых последовательностей полного генома (Jarvis с соавт., 2015). В соответствии с этой классификацией, вирусы PEDV сгруппированы в четыре группы, от А до D. Все классические штаммы PEDV из Европы и штаммы из Китая включены в группу А. Группа В содержит S-INDEL из США и действующие штаммы из Европы. Наконец, небольшая группа С и крупная группа D включают большинство штаммов из США, кроме S-INDEL (Jarvis с соавт., 2015) (Рисунок 3).

Появление аттенуированных PEDV с делециями в белке S (S-INDEL)

Вскоре после первых вспышек PEDV, в США появились вирусы PEDV, содержащие небольшие вставки и делеции (от 1 до 4 аминокислот) на N-конце белка S (S-INDEL). Штаммы S-INDEL, по сравнению с вирулентными штаммами PEDV, считаются слабыми, т.к. они обладали сниженной вирулентностью, что позволяло естественно инфицированным животным быстрее возвращались к стабильному состоянию. Похожие результаты наблюдались при экспериментальном заражении 4-суточных поросят штаммом S-INDEL PEDV: задержка появления диареи, более короткая продолжительность проявления симптомов и снижение количества смертей, по сравнению с вирулентным штаммом PEDV (Lin с соавт., 2015). Полученные данные были подтверждены в недавно опубликованном исследовании, также демонстрирующем уменьшенную патогенность штамма S-INDEL, при введении 5-суточных поросятам.

Новые рекомбинантные вирусы, образованные полевыми штаммами PEDV и вакцинными штаммами PEDV

Обширная вакцинация с помощью инактивированных и живых вакцин, проводимая в Азии, не предотвратила появления новых патогенных вариантов вируса с начала 2010 года. Предполагается, что причиной этому является неспособность живых вакцин предотвратить выделение вируса в окружающую среду. Таким образом, вирус в дальнейшем способен рекомбинировать с циркулирующими штаммами PEDV. Анализ полной геномной последовательности штамма PEDV из Китая (CH/HNQX-3/14) показал, что данный штамм является естественным рекомбинантом аттенуированных вакцинных штаммов (CV777 и DR13) и циркулирую-

EU strains are similar to USA S-INDEL strains (Hanke et al., 2015; Theuns et al., 2015), except some strains in Ukraine which are similar to initial virulent USA PEDV isolates (Dastjerdi et al., 2015); (iii) new recombinant PEDV viruses have been identified in China, which clustered together with USA S-INDEL strains (Li et al., 2016); and (iv) some grouping has also been made based in the years when strains were circulating (Bonioti et al., 2016). The most recent classification of PEDV strains is based on an analysis of full-genome sequences worldwide (Jarvis et al., 2015). According to this classification, PEDV viruses are clustered in four clades, A to D. All the classical EU PEDV strains and those from China are included in clade A. Clade B contain USA S-INDEL and current EU strains. Finally, small clade C and large clade D include the majority of the USA isolates except S-INDEL (Jarvis et al., 2015).

Emergence of attenuated PEDVs with deletions in the S protein (S-INDEL)

PEDV viruses containing small insertions and deletions (1 to 4 aa) in the N-terminal of S protein (S-INDEL) have appeared soon after first PEDV outbreaks in the USA (Vlasova et al., 2014). The S-INDEL strains are considered as mild-strains, since they caused a reduced pathogenesis and a faster return to baseline conditions in the farms where they were isolated, compared with virulent PEDV strains (Wang et al., 2014a). Similar results were observed after an experimental inoculation of 4-day-old conventional suckling piglets with a PEDV S-INDEL strain, with a delay in diarrhea appearance, shorter symptoms duration, and a reduction in the number of deaths compared with a virulent PEDV strain (Lin et al., 2015a). These data have been reinforced by a recently published study also showing reduced pathogenicity of a S-INDEL strain after inoculation of 5-day-old piglets (Chen et al., 2016).

Novel recombinant viruses generated by field PEDV isolates in combination with PEDV vaccine strains

In Asia, the extensive vaccination with both inactive and attenuated vaccines did not prevent the emergence of novel pathogenic variants since 2010. One of the proposed reasons is that attenuated vaccines did not prevent virus shedding, therefore allowing virus recombination with circulating PEDV strains (Song and Park, 2012). In fact, the full-length genome sequence from a PEDV isolate in China (CH/HNQX-3/14) showed that it is a natural recombinant between the attenuated vaccine strains (CV777 and DR13) and circulating wild-type strain (CH/ZMDZY/11) (Li et al., 2016). The recombination occurred in the replicase ORF1a region and also in the structural protein-coding region (S, ORF3 and N genes). These results provided new evidence that PEDV strains circulating in China underwent recombination between vaccine and field strains contributing to the genetic variability of PEDV.

Novel PEDV-TGEV recombinant viruses

Both PEDV and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) can cause severe enteritis in pigs accompanied by diarrhea, vomiting, and dehydration. The detection and genetic characterization of a new recombinant swine enteric coronavirus (SeCoV), circulating in Italy between 2007 and 2014, has been recently reported (Bonioti et al., 2016). The study revealed that SeCoV-ITA09 strain contains a TGEV backbone and a PEDV spike gene. This chimeric virus presumably resulted from a recombination event between PEDV and TGEV circulating strains (Fig. 4A). In fact, S gene of SeCoV-ITA09 shared 92% and 90% nt identity with the prototype European strain of PEDV CV777 and the original highly virulent North American strain Colorado 2013, respectively. The remaining genome shared a 97% nt identity with the virulent strains TGEV H16 and TGEV Miller M6 (Bonioti et al., 2016). Based on this observation, a retrospective analysis of fecal samples from pigs that showed typical clinical symptoms of a PEDV infection, collected in 2012 in Southern Germany was performed (Hanke et al., 2015). This material was previously shown to contain CoV-like particles by electron microscopy, but was found negative in RT-PCR assays specific for the PEDV N gene. Recent full-genome sequencing identified a novel SeCoV strain (SeCoV-GER12), with high similarity (99.5% identity) to SeCoV-ITA09 strain. It

щего дикого штамма (CH/ZMDZY/11) (Li с соавт., 2016). Рекомбинация произошла в области репликазы ORF 1a, а также в области, кодирующей структурные белки (генах S, ORF3 и N). Полученные результаты еще раз доказали, что штаммы PEDV, распространенные в Китае, претерпели рекомбинацию между вакцинными и полевыми штаммами, что выразилось в генетической вариативности PEDV.

Новые рекомбинантные вирусы PEDV-TGEV

PEDV, а также вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV) вызывают тяжелый энтерит у свиней, сопровождаемый диареей, рвотой и обезвоживанием. Недавно в Италии обнаружили и провели генетический анализ нового рекомбинантного энтерального коронавируса свиней (SeCoV), который циркулировал в стране в период с 2007 по 2014 гг. В ходе исследования было обнаружено, что штамм SeCoV-ITA09 содержит основу от TGEV и ген пепломеров от PEDV. Появление такого химерного вируса, вероятно, обусловлено рекомбинацией между циркулирующими штаммами PEDV и TGEV (Рисунок 4А). Следует отметить, что нуклеотидная последовательность S гена SeCoV-ITA09 на 92% идентична прототипному европейскому штамму PEDVCV777 и на 90% – высоковирулентному североамериканскому штамму, выделенному в Колорадо в 2013. Оставшаяся часть генома на 97% идентична вирулентным штаммам TGEVH16 и TGEV Miller M6. На основе указанных наблюдений был проведен ретроспективный анализ собранных в Южной Германии в 2012 фекальных образцов свиней, у которых были обнаружены типичные клинические симптомы PEDV-инфекции. Анализ с помощью метода электронной микроскопии показал наличие в образцах CoV-подобных частиц, однако последующая ПЦР с обратной транскрипцией не подтвердила присутствия гена PEDVN. В ходе недавнего секвенирования полного генома был обнаружен новый штамм SeCoV (SeCoV-GER12), на 99.5% идентичный штамму SeCoV-ITA09. Можно предположить, что SeCoV-ITA09 является предшественником SeCoV-GER12, а другие представители этого нового генотипа, скорее всего, до сих пор не обнаружены. Эти вирусы, возможно, подвергаются вторичным мутациям и рекомбинации. Таким образом, следует как можно скорее обнаружить другие представители этих химерных CoV, чтобы определить потенциальный источник рекомбинации.

Детальный анализ генетической структуры итальянского и немецкого SeCoV (Рисунок 4В) демонстрирует, что при рекомбинации TGEV и PEDV, произошла делеция крупного участка генома, на котором находились регуляторные сигнальные участки транскрипции, контролировавшие экспрессию открытой рамки считывания (ORF) 3а. В результате у указанных штаммов прекратилась экспрессия гена белка 3а. Рекомбинантные штаммы SeCoV были обнаружены у свиней с легкими клиническими признаками, что указывает на вероятность циркуляции SeCoVs в Италии и Европе в течение многих лет.

Правильно диагностировать инфекцию PEDV может быть довольно трудно в странах, в которых одно или оба коронавирусных заболевания имеют статус регистрируемых. Специалисты должны знать о возможных рекомбинантных CoV среди свиней. Диагностические проблемы могут быть предотвращены посредством использования стратегии двойной проверки, предполагающей использование методов, анализирующих различные участки генома. Влияние подобных химерных штаммов на вирулентность рекомбинантного вируса и его тропизм до сих пор не изучены.

seems that SeCoV-ITA09 is a precursor of SeCoV-GER12, and other members of this novel genotype are most likely undetected. These viruses might be the target of secondary mutation and recombination events. It is therefore of highest importance to identify additional members of this chimeric CoV to determine the potential origin of the recombination event.

A detailed genetic structure of the Italian and German SeCoVs (Fig. 4B) illustrates that during the recombination event between TGEV and PEDV, a large deletion was introduced that removed the transcription regulatory signals that control the expression of ORF 3a leading to the loss of protein 3a expression. The recombinant SeCoV strains were reported in pigs with mild clinical signs, indicating that SeCoVs have probably been circulating in Italy and Europe for multiple years but were underestimated.

Correct diagnosis and reporting PEDV might be difficult in countries where one or both of the diseases are reportable. Thus, diagnosticians should be aware of possible recombinants among swine CoVs. Diagnostic problems can be prevented through the use of a double check strategy with techniques targeting different genome regions. Apart from diagnostic obstacles, the impact of those chimeras in terms of virulence and organotropism is unknown and needs further investigations.

DYNAMICS OF PEDV INFECTION IN YOUNG AND ADULT PIGS

PEDV infects mainly small intestinal villous enterocytes, causing acute necrosis leading to villi atrophy in the small intestine (Jung and Saif, 2015; Jung et al., 2014). This virus caused severe diarrhea as a consequence of malabsorption. Often, diarrhea is accompanied by vomiting that increases severe dehydration. In addition, the persistence of anorexia and appetite loss could lead to animal death. The severity of clinical signs caused by PEDV infection is inversely related with the age of animals. Symptoms are very severe in nursing piglets under 2-weeks of age, with a mortality of up to 95%. In weaned to finisher pigs and pregnant sows the clinical signs are milder and self-limiting within 5 to 10 days after the onset of disease (Jung and Saif, 2015). The higher susceptibility of younger piglets has been associated with the slower turnover of enterocytes (up to one week) in neonatal piglets compared with older animals (2-3 days). Enterocytes turnover correlates with the presence of leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 positive (LGR5⁺) stem cells in the intestinal crypt, which is reduced in nursing piglets (Jung et al., 2015a). In addition, a correlation between the severity of the infection and the innate immune responses has been observed. In young piglets NK cell activity and its interferon (IFN)- γ production were lower than those in weaned pigs (Annamalai et al., 2015).

Таблица 1

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ PEDV

1978	PEDV был впервые обнаружен в Европе
1980-2010	PEDV в Азии, включая Китай, Японию, Корею и Таиланд
2010-2012	Генетически разные штаммы PEDV появились в Китае
2013-2014	PEDV распространяется в США, Канаде и Мексике
2013-2014	Генетически схожие штаммы обнаружены в Южной Корее и на Тайване
2005-2006	Европа, острая эпидемия PEDV в Италии
2007-2012	Италия, рекомбинант TGEV-PEDV: SeCoV (Обнаружен в 2016)
2012-2013	Германия, рекомбинант TGEV-PEDV: SeCoV (Обнаружен в 2016)
2014-2015	Штаммы S-INDEL обнаружены в США
2014-2015	S-INDEL-подобные штаммы PEDV обнаружены в Германии, Франции и Бельгии

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ PEDV-ИНФЕКЦИИ У МОЛОДЫХ И ВЗРОСЛЫХ СВИНЕЙ

В основном PEDV поражает ворсинчатые энтероциты тонкого кишечника, что приводит к острому некрозу и атрофии ворсинчатого эпителия тонкого кишечника (Jung и Saif, 2015; Jung с соавт., 2014). Вирус вызывает тяжелую диарею в результате мальабсорбции. Часто диарея сопровождается рвотой, которая усугубляет сильное обезвоживание. Кроме того, устойчивая анорексия и потеря аппетита могут привести к смерти животных. Тяжесть клинических признаков, вызванных PEDV-инфекцией, зависит от возраста животных. Очень тяжелые симптомы наблюдаются у поросят менее 2 недель отроду. Смертность достигает 95%. У животных после отъема и до откорма, а также у супоросных свиноматок клинические признаки проявляются слабее и длятся в течение 5–10 дней после начала заболевания. Более высокая восприимчивость молодых поросят была связана с более медленным обновлением энтероцитов (до одной недели) у новорожденных животных, по сравнению со взрослыми особями (2–3 дня). Обновление энтероцитов зависит от наличия в кишечных криптах стволовых клеток, содержащих связанные с G-протеином рецепторы 5, содержащие богатый лейцином повтор (LGR5⁺). Количество этих клеток снижено у поросят в подсосный период (Jung с соавт., 2015a). Кроме того, была отмечена корреляция между тяжестью инфекции и врожденными иммунными реакциями. У поросят-сосунков активность естественных киллеров и производство интерферона (IFN)- γ ниже, чем у поросят после отъема.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛЕВЫХ ШТАММОВ PEDV В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

Несмотря на растущее число секвенированных полных штаммов PEDV, только небольшая часть из них (от 2 до 12% в зависимости от исследований) была успешно выделена и выращена в тканевых культурах (Chung с соавт., 2015; Ока с соавт., 2014; Yamamoto с соавт., 2015). Клетки Vero используются для выделения и размножения PEDV. Для обеспечения инфицирования клеток и высвобождения вирусных частиц в среде должен присутствовать трипсин. Те же исследования указывают на то, что клетки кишечного эпителия лучше подходят для выделения из них PEDV, чем фекалии или другие биологические пробы.

Клетки Vero чувствительны к инфицированию многими вирусами, поскольку получены из эпителия почки обезьяны и являются интерферон-дефицитными. Следовательно, вирусы PEDV, выделенные из клеток Vero, следует считать адаптированными к клеточной культуре, они могут отличаться от первоначальных штаммов в биологическом образце. В исследовании Ока Т. с соавт. (2014), вирус PEDV с крупной делецией в N-концевом домене белка S был успешно выделен в клетках Vero. Тем не менее, указанная делеция не была обнаружена в исходном образце даже при глубоком секвенировании. Следовательно, делеция произошла во время адаптации к клеточной культуре. Указанный штамм, скорее всего, размножается в организме поросят-гнотобиотов *in vivo*, поскольку у животных наблюдается сероконверсия после инфицирования. Однако вирулентность штамма еще не определена. При создании живых ослабленных вакцин против PEDV с помощью пассирования вируса в клетках Vero, в корейском штамме DR13 и

Рисунок 1.

Организация генома энтеральных коронавирусов свиней. Схематичное изображение структуры геномов энтеральных коронавирусов свиней: вирус трансмиссивного гастроэнтерита (TGEV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) и его варианты с небольшими инсерциями и делециями в белке S (S-INDEL), энтеральный коронавирус свиней (SeCoV) и дельта-коронавирус свиней (PDCoV). На рисунке указаны роды, в которые входят каждый из CoV. Буквы над геномами обозначают гены репликационного комплекса (REP1a и REP1b), структурные гены (пепломеры S, оболочки E, мембраны M и нуклеокапсид N) и различные родоспецифические гены (серым цветом). L, лидерная последовательность; An, полиаденилированная концевая последовательность.

ISOLATION OF FIELD STRAINS OF PEDV IN CELL CULTURE

Despite the increasing number of full-length PEDV isolates sequenced, only a small proportion (between 2 and 12%, depending on the studies) has been successfully isolated and propagated in tissue cultures (Chung et al., 2015; Oka et al., 2014; Yamamoto et al., 2015). Vero cells are used for isolation and growth of PEDV, requiring the presence of trypsin in the culture media for PEDV entry and release. The same studies point to intestinal contents as the best source for PEDV isolation, better than feces or any other biological sample.

Since Vero cells are from monkey origin and deficient in interferon (IFN) production, they are permissive to a high number of viruses. Therefore, the PEDV viruses isolated from Vero cells could correspond to cell-culture adapted strains rather than to the original strains in the biological sample. In this sense, in the study by Oka T. et al (2014), a PEDV virus with a large deletion in the N-terminal domain of S protein was successfully isolated in Vero cells from a biological sample. Nevertheless, this deletion was not detected in the original sample, even by deep-sequencing, strongly suggesting that the deletion may have occurred during cell-culture adaptation. This isolate most likely grows *in vivo* in gnotobiotic piglets, as animals seroconverted after inoculation (Lin et al., 2015b), but its virulence remains to be determined. It has been shown that during the generation of live attenuated vaccines for PEDV by passing the virus in Vero cells, in the case of both the Korean DR13 strain and the Japanese P-5V attenuated viruses included a protein 3 in which more than half of the carboxyterminal domain was deleted (Park et al., 2012). Similarly, while a recombinant virus lacking ORF3 expression could be rescued, when ORF3 was restored the recombinant virus could not be rescued (Jengarn et al., 2015). Therefore, it seems that protein 3 could have a role *in vivo* and that its total or partial deletion helps to maintain PEDV in Vero cells.

PEDV infection of cells depends on the level of porcine aminopeptidase N (pAPN), which is the virus receptor (Nam and Lee, 2010). In fact, expression of pAPN on the surface of Vero cells further increases their susceptibility to the virus

японских ослабленных вирусах P-5V в числе прочих мутаций обнаружена потеря более половины карбоксильного терминального домена в протеине 3. Аналогичная ситуация наблюдается с рекомбинантными вирусами: при отсутствии экспрессии ORF3, рекомбинантный вирус реплицируется *in vitro*, при восстановлении ORF3 – нет. Таким образом, протеин 3 важен для репродукции вируса *in vivo*, а его полное или частичное удаление помогает адаптировать PEDV к клеткам Vero.

Уровень аминопептидазы N (pAPN), являющейся вирусным рецептором, влияет на восприимчивость клеток к PEDV-инфекции. Фактически, экспрессия pAPN на поверхности клеток Vero повышает их восприимчивость к вирусу. PEDV в основном размножают в клетках Vero, однако вирус эффективно заражает и другие типы клеток, включая клетки кишечного эпителия свиней (IEC) (Zhao с соавт., 2014) или человеческие клетки Huh 7 (Liu с соавт., 2015). До сих пор не изучено, подходят ли эти клеточные системы для эффективного выделения PEDV из биологических образцов. Мы показали, что клетки семенников свиней (ST), с внедренной плазмидой, повышающей экспрессию pAPN (ST-pAPN), стали более чувствительны к PEDV, сохраняя зависимость от уровня pAPN. В результате титр вируса достиг 10^7 б.е./мл (A. Pascual-Iglesias, L. Enjuanes и S. Zuniga, неопубликованные результаты). Указанные клетки были восприимчивы к PEDV даже в отсутствии трипсина, однако в присутствии трипсина количество вируса повышалось.

ПЕРЕДАЧА PEDV: РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСА ВОЗДУШНЫМ ПУТЕМ И ЧЕРЕЗ КОРМ

Существует множество потенциальных механизмов передачи PEDV, предусматривающих как прямой, так и непрямой контакт между несколькими свинофермами, посредством транспортных перевозок, перевозок корма, свиней, передачи вируса через людей, с помощью ветра и т. д. В апреле 2013 года в США был зарегистрирован PEDV. Затем вирус быстро распространился более чем на 200 стад в 30 штатах почти за два месяца. Отсутствие врожденного иммунитета у животных могло спровоцировать первоначальное быстрое распространение PEDV в США, однако сейчас исследуются и другие возможные факторы.

Доказана возможность передачи PEDV воздушным путем (Alonso с соавт., 2014). Образцы воздуха были собраны из помещения, содержащего экспериментально зараженных свиней, а также на некотором расстоянии от свиноферм, на которых были зафиксированы вспышки острой PEDV-инфекции. Результаты исследования демонстрируют наличие инфекционного PEDV в воздухе из помещения с экспериментально зараженными свиньями и генетического материала PEDV на расстоянии до 10 миль по направлению ветра от естественно зараженных ферм. Следовательно, передачу воздушным путем следует рассматривать как потенциальный способ распространения PEDV.

Результаты другого независимого исследования также подтвердили возможность передачи PEDV воздушным путем на большие расстояния (Beam с соавт., 2015). В указанном исследовании анализируется вспышка PEDV весной 2013 года в США. Используются данные из 14 районов, находящихся в 4 соседних штатах. Из 222 ферм 90 (40.5%) были инфицированы в ходе вспышки PEDV, при этом доля инфицированных хозяйств, имеющих собственных свиноматок, составила 80.0%. Одна из трех компаний, занимавшихся сбором данных, зафиксировала более низкий процент (19.5%), чем две другие компании (41.1 и 47.2%). Пространственный анализ показал, что PEDV-инфекция не распространялась равномерно, но образовывала кластеры на определенных участках, что подтверждает повышенный риск появления PEDV-инфекции на фермах, соседствующих с зараженной фермой. Для определения возможности передачи PEDV воздушным путем использовались метеорологические данные. Во время вспышки вирусной инфекции преобладающим направлением ветра в течение месяца было северное. Иногда ветры дули в юго-западном

(Jengarn et al., 2015). Although PEDV is in general propagated in Vero cells, it efficiently infects a variety of cell types, including porcine intestinal epithelial cells (IECs) (Zhao et al., 2014) or human Huh 7 cells (Liu et al., 2015). It remains to be analyzed whether any of these cell systems would be suitable for effective PEDV isolation from biological samples. We have shown that swine testis (ST) cells stably transformed with a plasmid overexpressing pAPN (ST-pAPN) increased their sensitivity to PEDV in a pAPN expression dependent manner, leading to virus titers around 10^7 pfu/ml (A. Pascual-Iglesias, L. Enjuanes and S. Zuniga, unpublished results). These cells were susceptible to PEDV even in the absence of trypsin, although a lower virus yield than in the presence of trypsin was obtained in comparison with its presence.

TRANSMISSION OF PEDV: AIRBORNE VERSUS CONTAMINATED FEED

There are many potential mechanisms of PEDV transmission, including direct or indirect contacts between sites, such as movement of tracks, feed, pigs, people, wind, etc. After being diagnosed in the USA in April 2013, PEDV spread rapidly, to more than 200 herds in 30 states in less than two months. The absence of pre-existing immunity could initially have influenced the rapid dissemination of PEDV in the USA, but other factors are being investigated.

Transmission of PEDV by air has been demonstrated (Alonso et al., 2014). Air samples were collected both from a room containing experimentally infected pigs, and at various distances from the outside of swine farms experiencing acute PEDV outbreaks. Results indicated the presence of infectious PEDV in the air from room containing experimentally infected pigs, and genetic material of PEDV was detected up to 10 miles downwind from naturally infected farms. Therefore, airborne transmission should be considered as a potential route for PEDV dissemination.

Additional results supporting the conclusion that PEDV could be transmitted to long distances by air have been provided by an independent study (Beam et al., 2015). This analysis describes a spring 2013 outbreak of PEDV, using data from 222 swine sites in 14 counties, located within 4 contiguous states in the USA. During the outbreak, the premises-level incidence of PEDV was 40.5% (90 out of 222 sites), with sow sites having the highest incidence (80.0%). One of the three companies from which data were collected had a lower incidence (19.5%) than the other two companies (41.1 and 47.2%). Spatial analysis showed that PEDV infection was clustered rather than randomly distributed, which suggested that sites near a positive site had increased risk of acquiring PEDV infection. Meteorological data were used to investigate whether PEDV was spread by air. The predominant wind direction during the month of the outbreak was toward the South, with some Southeast and stronger Southwest winds. The direction of disease spread correlated with the predominant wind direction, supporting the hypothesis that PEDV airborne dissemination played a role in this outbreak. However, the results should be cautiously interpreted because no essential information was collected on direct and indirect contacts between sites, such as movement of trucks, feed, pigs or people.

Feed has also been suggested as the main cause of PEDV transmission in the North American 2013 outbreak for the dissemination of PEDV between farms (Pasick et al., 2014). In January 2014, approximately 9 months following the initial detection of PEDV in the USA, the first case of PEDV was confirmed in a swine herd in South-Western Ontario. A follow-up epidemiological investigation carried out on the initial and 10 subsequent Ontario PEDV cases pointed to feed as a common risk factor. RT-PCR analysis detected PEDV in several lots of feed and spray-dried porcine plasma (SDPP), used as feed supplement. Still, an alternative source of transmission has been described. In 2014, the US Department of Agriculture (USDA) formed an investigative group with the objective of determining the most possible cause of PEDV introduction in the USA. The most likely scenario in agreement with all the investigation findings was that flexible intermediate bulk

направлении, а также были зафиксированы сильные потоки ветра в юго-восточном направлении. Направление распространения инфекции коррелировало с преобладающим направлением ветра, что подтверждает гипотезу о значительной роли передачи воздушным путем в распространении PEDV. Однако полученные результаты следует интерпретировать осмысленно, т.к. не было получено никакой информации о возможном прямом или непрямом контактах между фермами, посредством транспортных перевозок, перевозки корма, свиней или через людей.

В качестве основной причины распространения PEDV среди свиноферм, во время вспышки в 2013 году в Северной Америке, также рассматривали передачу через корм для животных (Pasick с соавт., 2014). В январе 2014 года приблизительно через 9 месяцев, после обнаружения PEDV в США, первый случай появления PEDV-инфекции был зафиксирован у свиней в Юго-западном Онтарио. Эпизоотологическое расследование упомянутого случая появления инфекции в Онтарио и 10 последующих указывало на корм для животных в качестве основного фактора риска. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией удалось обнаружить PEDV в нескольких партиях корма и высушенной плазме крови свиней (SDPP), используемой в качестве кормовой добавки. Тем не менее, также был описан и альтернативный источник передачи инфекции. В 2014 году Министерство сельского хозяйства США (USDA) сформировало исследовательскую группу с целью расследования наиболее возможной причины появления PEDV в США. Согласно наиболее вероятному сценарию, в соответствии со всеми результатами исследований, мягкие контейнеры средней грузоподъемности для сыпучих продуктов ("биг-бэг") в качестве фомитов послужили причиной появления и распространения PEDV в США.

ПРОГРЕСС В РАЗРАБОТКЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ PEDV

Идеальная вакцина должна обладать определенными свойствами, среди которых: (i) высокая иммуногенность; (ii) способность индуцировать долговременную иммунологическую память; (iii) генетическая и температурная устойчивость; и (iv) безопасность. Субъединичные вакцины и вакцины на основе инактивированных вирусов (по крайней мере, в случае CoV) имеют ряд некоторых преимуществ, таких как: возможность быстрой разработки и стабильность (Jaum с соавт., 2012; Tseng с соавт., 2012; Wang с соавт., 2014b). Но в то же время эти вакцины имеют некоторые засвидетельствованные важные ограничения. Например, они индуцируют непродолжительную иммунологическую память, вызывают эозинофилию, а также антителозависимое усиление инфекции (ADEI) (Bolles с соавт., 2011; Iwata-Yoshikawa с соавт., 2014; Tseng с соавт., 2012). Живые аттенуированные вакцины, в свою очередь, имеют некоторые преимущества: (i) длительная история успешного использования; (ii) способность вызывать сбалансированные Th1/Th2 реакции, предотвращающие индукцию эозинофилии после искусственного или естественного инфицирования в полевых условиях; (iii) аналогичный путь иммунизации, как и при естественном инфицировании полевыми вирусами, и (iv) индуцирование долговременного иммунитета. Поскольку существует вероятность возвращения вакцинного штамма к вирулентному фенотипу, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и меди-

Рисунок 2.

Структура CoV и экспрессия генов. А. Схематичное изображение структуры вириона CoV (на примере TGEV). На схеме изображена структура оболочки и нуклеокапсида. М и М' мембранные белки у которых аминоконцевая часть находится за пределами вириона, а карбокси-концевые части располагаются в разных положениях по отношению к границе вириона. В. Изображение генома TGEV и субгеномных РНК. Под изображением генома показаны РНК положительной полярности (голубые линии) и отрицательной полярности (серые линии), синтезирующиеся в инфицированных клетках. Полиаденилированный и полиурацилиловый концы обозначены AAA и UUU соответственно. Названия генов соответствуют названиям на Рисунке 1.

containers ("feed totes") served as fomites for PEDV introduction and dissemination during PEDV epidemics in the USA (Scott et al., 2016).

PROGRESS IN THE DEVELOPMENT OF PEDV VACCINE

An ideal vaccine needs to have a combination of properties, including: (i) high immunogenicity; (ii) to induce long-lasting memory; (iii) to be genetically and thermally stable; and (iv) to be safe. Subunit vaccines and those based in inactivated viruses, at least in the case of CoVs, have clear advantages, such as fast development and being stable (Jaume et al., 2012; Tseng et al., 2012; Wang et al., 2014b). At the same time, these vaccines also have well documented, important limitations, such as inducing non-lasting memory, eosinophilia and antibody dependent enhancement of the infectivity (ADEI) (Bolles et al., 2011; Iwata-Yoshikawa et al., 2014; Tseng et al., 2012). In contrast, live attenuated vaccines, have several advantages, such as: (i) a long history of success; (ii) they elicit balanced Th1/Th2 responses preventing the induction of eosinophilia after challenge or natural infection in field conditions; (iii) their immunization route mimics that of natural infection by the field viruses, and (iv) they induce long lasting immunity. In contrast, live vaccines have to reinforce and demonstrate their safety due to the possibility of reversion to the virulent phenotype, what has led to the Food and Drug Administration in the States to engineer in them at least three safety strategies. The induction of eosinophilia by double inactivated CoVs has been demonstrated with solid data in the case of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-CoV (Bolles et al., 2011). In addition, the induction of eosinophilia has also been documented in the case of vaccines based on the S protein of SARS-CoV (Tseng et al., 2012).

The most promising vaccines to protect against porcine enteric viruses are those that elicit mucosal immunity in the gut. To achieve this, the best route of immunization is the oral one, using attenuated viruses that infect the gut lumen. These vaccines may lead to a protection higher than 90% of a litter from a vaccinated sow (Chattha et al., 2015). In principle, there are different types of vaccines that could be designed to prevent infections by PEDV: (i) home made vaccines based on grinded intestines from infected pigs; (ii) classical inactivated vaccines;

каментов США утвердило три стратегии, которые следует использовать при конструировании живых вакцин для их безопасности. Индукция эозинофилии при использовании дважды инаktivированных коронавирусов была зафиксирована в случае с вирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS)-CoV (Bolles с соавт., 2011). Кроме того, индукция эозинофилии также была зафиксирована в случае с вакцинами на основе S белка SARS-CoV (Tseng с соавт., 2012).

Вакцины, вызывающие иммунный ответ в слизистой оболочке кишечника, считаются наиболее перспективными вакцинами для защиты от энтерических вирусов свиней. Для этого применяют пероральный способ иммунизации, используя аттенуированные вирусы, которые инфицируют внутреннюю поверхность кишечника. Подобные вакцины обеспечивают защиту более 90% поросят, рожденных от вакцинированных свиноматок. Существуют различные виды вакцин, используемых для профилактики PEDV-инфекций: (i) аутовакцины на основе измельченных кишок от инфицированных свиней; (ii) классические инаktivированные вакцины; (iii) модифицированные живые аттенуированные вакцины на основе вирусов, ослабленных с помощью пассирования в культуре клеток; (iv) вакцины на основе РНК-репликонов; (v) вакцины на основе репродуктивно-дефектных вирусов, способных лишь к репликации генома; и (vi) современные живые рекомбинантные аттенуированные вакцины. Инаktivированные и модифицированные живые вакцины против PEDV производятся и используются в некоторых странах (<http://www.cfsph.iastate.edu/Vaccines/>).

Каждая страна определяет свои требования к лицензированию вакцин. В целом, в Европе эти требования выше, чем в других крупных регионах, как например, США. Как следствие, считается, что в Европе доступно меньше вакцин, чем в США (однако воздействие этих вакцин на здоровье животных в каждом из регионов не принимается во внимание) (доклад с семинара Joint EMA/HMA Workshop, 10 июля 2015 года). Большинство вакцин для животных, используемых в США, проходят лицензирование или допускаются к применению, согласно требованиям лицензирования общедоступных препаратов, гарантирующим чистоту, эффективность и безопасность. Однако процесс лицензирования новых препаратов может длиться несколько лет. Другие механизмы лицензирования обеспечивают ускоренную доступность вакцин в экстренных случаях, угрожающих здоровью животных. К числу таких механизмов можно отнести: условное (ограниченное) лицензирование препаратов, полученных аутогенным путем, а также предусмотрена выдача разрешения Министерства сельского хозяйства США (USDA) на освобождение от лицензирования. Условные (ограниченные) лицензии на препараты могут быть выданы в случае экстренных ситуаций, при доступе препаратов на конкретный рынок, при использовании препаратов на определенной территории, либо других частных случаях. Данные условия могут позволить одобрить вакцины против вновь появившихся энтерических коронавирусов свиней и допустить их к продаже до завершения полной проверки эффективности. Таким образом, заметно ускоряется процесс выдачи лицензии, однако для достижения соответствия всем остальным требованиям лицензирования общедоступных препаратов все еще требуется значительное время. Ветеринарные компании могут получить ограниченные лицензии на препараты при соответствии их основным требованиям, в тоже время они могут продолжать исследование эффективности вакцин и подавать заявку на обычное лицензирование. Согласно законодательству США, как только регулирующие агентства одобряют более безопасную вакцину, препараты, имеющие ограниченные лицензии, снимаются с рынка.

Тканевые вакцины

Тканевые вакцины "домашнего изготовления" представляют собой переработанные ткани свиней, зараженных PEDV. Указанные вакцины представляют слишком высокий риск для хозяйств, и мы советуем использовать их только в критической ситуации. В остальных случаях мы не

(iii) modified live attenuated vaccines based on viruses that have been attenuated by passage in cell culture; (iv) vaccines based in RNA replicons; (v) vaccines based in replication-competent propagation-defective viruses; and (vi) modern live recombinant attenuated vaccines. Both inactivated and modified live PEDV vaccines are manufactured and used in several countries (<http://www.cfsph.iastate.edu/Vaccines/>).

Vaccine licensing requirements depend on the region, in general being higher in the EU than in other large regions such as USA. This fact leads to the general perception that there are fewer vaccines available in EU than in the USA, although the impact in animal health has not been analyzed (Joint EMA/HMA Workshop report, July 10th 2015). The majority of animal vaccines used in the USA are licensed or permitted under the conventional product licensing requirements for assuring purity, potency, safety, and efficacy (Hill et al., 2003). However, this licensing process requires several years for new product approvals. Mechanisms other than conventional licensure allow for more rapid availability of vaccines in an emergency animal health situation, including conditional product licenses, autogenous product licenses, and USDA exemptions from licensure. Conditional product licenses may be authorized to meet an emergency condition, limited market, local situation, or other special circumstance. This would allow vaccines for emerging porcine enteric CoVs to be approved and marketed before all of the required efficacy testing is completed. This may reduce the time to licensure, but meeting all other conventional licensing requirements still requires significant time. Veterinary biologics companies are likely to pursue a conditional license as soon as they are able to meet the requirements while they continue to develop efficacy data and pursue a conventional license. Once a safer vaccine is approved by the regulatory agencies, the conditional licenses should be removed from the market, at least in the USA.

Home made vaccines

These vaccines are based on the use of PEDV infected porcine tissues and represent a risk too high for the farms, and we do not recommend their implementation unless a chaotic situation is being faced. In fact, the administration of infected extracts from neighbor farms has frequently led to unwanted effects, such as the establishment of a persistent CoV infection in the farm, and the introduction of other viruses, such as porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and circoviruses. Nevertheless, we recognize that in many countries, including the USA this type of vaccination is applied. This procedure has been permitted because there were no effective PEDV vaccines for use in naive animals, and because PEDV spread rapidly and induced very high mortality in young piglets. In fact, some veterinarians recommended intentional infection of sows during gestation to induce lactogenic immunity for their piglets. This was the only method available in the past for immunologic control of PEDV in an infected herd. A group of swine disease and production experts has provided advice on concepts and procedures to consider when intentionally infecting sows through controlled oral exposure to induce immunity (Schwartz et al., 2014). They also acknowledge the incomplete state of the science and some safety issues related to intentional infection. Controlled oral exposure is used early in outbreaks of naive herds. The recommended inoculum is pooled feces collected from 3- to 5-day old piglets during the first 18 h of infection, the peak of PEDV shedding. Feces from infected pigs are recommended instead of macerated intestines because the latter presents a higher chance of transmitting non-enteric pathogens. Each female on the premises should simultaneously be exposed orally to high titers of PEDV using the feces of infected piglets. This should ensure that all sows and gilts recover at approximately the same time and stop shedding virus. This should induce lactogenic immunity by approximately three weeks after exposure to protect the newborn piglets. Piglets will be protected during the first few days by passive antibodies acquired through colostrum and milk. An important recommendation is to monitor all piglets closely and quickly remove any piglets that show clinical signs of PEDV. The goals

рекомендуем использовать данные вакцины. Зафиксированы случаи, когда использование инфицированных органов, полученных с соседских свиноферм, в качестве вакцин приводило к нежелательным последствиям. Например, у животных выработывалась стойкая CoV-инфекция, либо появлялись другие вирусы, такие как вирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV) и цирковирусы. Тем не менее, мы признаем, что во многих странах, включая США, этот вид вакцинации применяется до сих пор. Указанный вид вакцинации появился и был разрешен, поскольку PEDV-инфекция сразу после появления начала быстро распространяться, и показатель смертности молодых поросят достиг высоких значений, при этом эффективной вакцины против вируса не было. Некоторые ветеринары даже рекомендовали заранее заражать супоросных свиноматок, чтобы индуцировать лактогенный иммунитет для их будущего потомства. Только таким способом в прошлом удавалось контролировать PEDV в инфицированном стаде. Группа экспертов по болезням свиней выработала некоторые концепции и предложила способы индуцирования иммунитета у свиней, с помощью контролируемого инфицирования свиноматок пероральным путем (Schwartz с соавт., 2014). Однако ученые также признают нехватку экспериментальных данных по вопросу преднамеренного инфицирования, а также наличие некоторых сложностей с безопасным применением данной процедуры. Контролируемое инфицирование пероральным путем используется на ранних стадиях развития инфекции у животных без иммунитета. Рекомендованным инокулятом являются фекалии 3–5-дневных поросят, собранные в первые 18 ч с начала инфекции – пик вирусовыделения. Рекомендуется использовать именно фекалии инфицированных свиней, вместо переработанных кишок, поскольку использование внутренних органов повышает риск передачи неэнтеральных патогенов. Всем свиноматкам в хозяйстве следует одновременно перорально ввести PEDV в высоких титрах, используя фекалии инфицированных поросят. В данном случае мы можем рассчитывать, что свиноматки и ремонтные свинки выздоровеют приблизительно в одно и то же время и прекратят выделение вируса. Также мы можем рассчитывать, что будет индуцирован лактогенный иммунитет приблизительно через три недели после инфицирования, что обеспечит защиту новорожденных поросят. В течение первых нескольких дней поросята будут получать пассивную защиту антителами, полученными из молозива и молока. Рекомендуется тщательно следить за поросятами и быстро удалять особей, которые проявляют клинические признаки PEDV-инфекции. Контролируемое пероральное инфицирование энтеральными коронавирусами свиней преследует следующие цели: (i) "Обеспечение иммунитета в стаде, с помощью инфицирования свиноматок и ремонтных свинок за наиболее короткий промежуток времени, для уменьшения периода потери новорожденных поросят" и (ii) "Обеспечение одновременной иммунизации и прекращения вирусовыделения во всей популяции"

ДНК-вакцины

Получены данные о предварительной оценке эффективности ДНК-вакцин против TGEV и PEDV (Meng с соавт., 2013). Для этого открыты рамки считывания иммуногенной субъединицы S1 из TGEV, а также белков S или S1 из PEDV, были введены в эукариотический вектор экспрессии pIRES. Факт выработки антител, специфичных к TGEV и PEDV, а также кинетические изменения в подгруппах подгрупп Т-лимфоцитов у иммунизированных мышей подтвердили увеличение пролиферации Т-лимфоцитов и их подгрупп CD4⁺ и CD8⁺, возникшее вследствие воздействия рекомбинантных ДНК-плазмид. Кроме того, ДНК-вакцины

Рисунок 3.

Эволюционные связи изолятов PEDV. Филогенетическая дендрограмма на основе полных геномных последовательностей PEDV (Vlasova с соавт., 2014). Линейный масштаб указывает на количество нуклеотидных замен на сайт. Фиолетовый - штаммы S-INDEL; зеленый – штаммы, отличные от S-INDEL; красный – американские штаммы S-INDEL; синий - американские штаммы, отличные от S-INDEL.

of controlled oral exposure to porcine enteric CoVs are (Schwartz et al., 2014): (i) "Establishing herd immunity to minimize the time period of baby pig deaths by infecting and recovering all sows and gilts in a time frame as short as possible" and (ii) "Assuring all sows and gilts are on the same timeline to immunity and cessation of shedding PEDV within the population"

DNA vaccines

Preliminary evaluation of DNA vaccines for TGEV and PEDV has been reported (Meng et al., 2013). To this end, the open reading frames of the TGEV S1 subunit immunogen and in addition of the S protein or S1 proteins of PEDV were inserted into the eukaryotic expression vector pIRES. TGEV and PEDV specific antibody responses as well as kinetic changes of T lymphocyte subgroups of the immunized mice showed that the recombinant DNA plasmids increased the proliferation of T lymphocytes and the number of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subgroups. In addition, the DNA vaccines induced a high level of IFN- γ in the immunized mice. The specific CTL activity in the vaccinated group became significant at 42 days post-immunization. At 35 days post-immunization, the recombinant DNA plasmids bearing full-length S genes of TGEV and PEDV stimulated higher levels of specific neutralizing antibodies. Evaluation of this vaccine candidate in pigs remains to be done.

Subunit vaccines and vaccines based on inactivated viruses

In the specific case of CoVs such as PEDV, the oral administration of the full-length spike virus as a monomeric or oligomerized state, or domains of this protein including the receptor-binding site (RBS) that induces potent neutralizing antibodies, may be an efficient immunogen. In fact, these proteins are bound and internalized in the intestinal tract due to the presence of pAPN, the virus receptor (Fig. 5A). Among these

индуцировали высокий уровень IFN- γ у иммунизированных мышей. Активность специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) значительно увеличилась спустя 42 дня после иммунизации. На 35 день после иммунизации, рекомбинантные ДНК-плазмиды, содержащие полные гены S из TGEV и PEDV, стимулировали выработку более высоких уровней специфических нейтрализующих антител. Однако оценка эффективности данной категории вакцин на свиньях до сих пор не проведена.

Субъединичные вакцины и вакцины, основанные на инактивированных вирусах

В случае с PEDV, в качестве эффективного иммуногена для оральной иммунизации может служить полный белок S в мономерной или олигомерной формах, либо домены этого белка, включающие рецептор-связывающий сайт (RBS), индуцирующий синтез вирус-нейтрализующих антител. Стоит отметить, что указанные белки связываются и всасываются в кишечном тракте из-за наличия вирусного рецептора rAPN (Рисунок 5A). При образовании тримеров белка S ("розеток"), эффективность вакцин может повыситься. Образование таких антигенных комплексов было зафиксировано у TGEV (Рисунок 5B) (Anton с соавт., 1996). В то же время, очищенные цельные вирионы, при пероральном введении, в принципе могут быть использованы как вакцины против PEDV. В таком случае, должна быть проведена двойная инактивация вируса, подразумевающая облучение вируса УФ и химическую инактивацию. Указанные процедуры рекомендованы к применению, для обеспечения отсутствия остаточных инфекционных вирусов в вакцинном препарате. Для цельновирионной вакцины необходимо подбирать адъюванты, вызывающие сбалансированный ответ Th1/Th2.

Векторные вакцины

Вызывает интерес еще один метод вакцинации против PEDV с помощью векторов, экспрессирующих гены вирусных белков, индуцирующих вирус-нейтрализующие антитела. К числу таких протеинов можно отнести: полный S-белок, его аминотерминальный фрагмент или участок связывания рибосом (RBS). Были получены сведения об использовании поксвирусного вектора, экспрессирующего фрагмент гена S-белка PEDV, который содержал три основных участка, вызывающих синтез вирус-нейтрализующих антител. Иммунизация свиней указанным вектором вызвала синтез вирус-нейтрализующих антител IgG и IgA, которые обеспечивали лактогенный иммунитет и защиту новорожденных поросят, инфицированных PEDV. Указанные антитела снизили уровень патологического влияния вирусного вируса на кишечник и обеспечили почти 100% защиту поросят. Однако эффективность этой опытной вакцины необходимо подтвердить в производственных условиях, путем иммунизации супоросных свиноматок и оценки передачи лактогенного иммунитета поросятам-сосунам.

Вакцины на основе РНК-репликонов

Новая стратегия вакцинирования была разработана на основе использования репродуктивно-дефектных "неживых" векторов, способных к одному лишь циклу репликации. В данной системе используются псевдовиральные частицы, содержащие репликон РНК, полученный из ослабленного штамма вируса венесуэльского энцефалита лошадей (VEEV). Указанный вектор вызывает высокий уровень (до 10–20% от общего клеточного белка) экспрессии гетерологичных генов. Вектор имеет тропизм к дендритным клеткам и вызывает широкий сбалансированный иммунный ответ в трёх его проявлениях: врожденный, гуморальный и клеточный. Проникновение вектора в организм хозяина не вызывает анти-векторный иммунитет, следовательно, можно проводить неоднократную вакцинацию без уменьшения эффективности. РНК-репликон состоит из неструктурных генов VEEV и гена белка пепломера PEDV. Репликон РНК упаковывается в частицы при культивировании в клетках Vero, трансфицированных данной РНК. Частицы собирают через день или раньше и используют для производства "вакцины одного цикла репликации", содержащей РНК-реп-

immunogenic forms, the formation of oligomers of S protein trimers ("rosettes") may increase the efficacy of these vaccines. The production of these antigenic complexes has been well documented for TGEV (Fig. 5B) (Anton et al., 1996). Similarly, purified complete viruses could in principle be used as vaccines to protect against PEDV by oral immunization. That being the case, a combination of virus double inactivation procedures, such as UV and chemical inactivation is recommended to prevent the presence of residual infectious virus in the vaccine formulation. In this case, adjuvants eliciting a balanced Th1/Th2 response should be associated with the vaccine.

Vectored vaccines

An interesting possibility to vaccinate against PEDV is the immunization with vectors expressing viral proteins inducing neutralizing antibodies, such as full-length S protein, its amino terminal half, or the RBS. The use of a poxvirus vector expressing a PEDV S protein fragment, containing the three major domains eliciting neutralizing antibodies has been recently reported. Immunization of swine with this vector elicited IgG and IgA neutralizing antibodies that provided significant lactogenic protection when administered to newborn piglets infected with PEDV. These antibodies reduced the enteric pathology caused by virulent virus and provided close to 100% piglet protection. The efficacy of this vaccine candidate remains to be tested by immunizing pregnant sows and evaluating the transfer of lactogenic immunity during breastfeeding to the progeny.

Vaccines based in RNA replicons

A novel vaccine strategy has been developed based on propagation-defective, single-cycle "non-living" vectors. This system is based on replicon RNA particles derived from an attenuated strain of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) (Mogler et al., 2014). This vector leads to high heterologous gene expression levels, accounting up to 10–20% of the total cellular protein. The vector has dendritic cell tropism and leads to a broad, balanced immune response among the three compartments: innate, humoral, and cellular immunity. Vector entrance in the host is not affected by anti-vector immunity, therefore, repeated administration of the vaccine can be made without decreasing efficacy. The replicon RNA is composed of non-structural genes of VEEV followed by PEDV spike protein gene. Replicon particles are obtained from packaging in Vero cells transfected with this RNA, harvested in one day or less, leading to the production of one single-cycle vaccine containing the replicon RNA. Vaccinated animals develop virus-neutralizing antibodies specific for the S glycoprotein. Vaccination of PEDV-naïve dams with replicon RNA particle vaccine protects 80% of the suckling piglets from challenge (Mogler et al., 2014). The vaccine reduces to less than half the pre-weaning mortality by the passive transfer of maternal IgA antibodies in milk. This vaccine is safe for use immediately prior to farrowing and has no risk of reversion to virulence. The alphavirus-derived replicon has received conditional regulatory approval for vaccination against PEDV (AASV, 2014; Kim et al., 2016).

Vaccines based in replication-competent propagation-defective viruses

The design of viruses that can replicate but do not propagate in the host constitutes an optimum type of vaccines combining a balanced degree of efficacy and safety. Vaccines based on replication-competent propagation-defective viruses are based on defective infectious viruses that are able to replicate in the same tissues as the wild type virus, but that cannot be disseminated even to the close neighbor cell. Therefore, the reversion to a virulent virus is unlikely. Still, the antigenic dose of the virus will be amplified several thousand-fold in the infected cells. These vaccine viruses can be grown in the vaccine company by providing in trans the protein missing in the defective virus. Certainly, this type of vaccines represents one of the most advanced vaccines combining both high safety and efficacy. We have generated this type of vaccine candidates by deleting the envelope (E) protein for TGEV (Ortego et al., 2002) and for Middle East Respiratory Syndrome (MERS)-CoV (Almazan et al., 2013). The same strategy could in principle be applied to PEDV virus. Frequently, CoV E protein induces

ликон. У вакцинированных животных вырабатываются вирус-нейтрализующие антитела, специфичные для гликопротеина S. Введение не зараженным PEDV свиноматкам вакцины, на основе РНК-реплика, обеспечивает защиту 80% подсосных поросят при экспериментальном заражении. Вакцина почти наполовину снижает отход поросят до отъёма в результате пассивного переноса материнских антител IgA в молоко. Данная вакцина безопасна для использования непосредственно перед опоросом. Реверсия к вирулентности невозможна. Вакцина, содержащая репликоны на основе альфа-вируса, в настоящий момент получила условное разрешение и может применяться для вакцинации против PEDV. (AASV, 2014; Kim с соавт., 2016).

Вакцины на основе репродуктивно-дефектных вирусов, способных к репликации

Самую оптимальную вакцину, сочетающую в себе сбалансированную степень эффективности и безопасности, можно создать на базеконструированного вируса, способного к репликации, но не к размножению в организме хозяина. Подобные вакцины основаны на дефективных инфекционных вирусах, способных к репликации в тех же тканях, что и вирус дикого типа, но не способных размножаться и распространяться даже на соседние клетки. Следовательно, реверсия к вирулентности у таких вакцин маловероятна. Тем не менее, антигенная доза вируса амплифицируется в несколько тысяч раз в инфицированных клетках. Такие вакцинные вирусы можно размножить лишь на биофабрике, если обеспечить клеточные культуры *intrans* недостающим в дефектном вирусе белком. Несомненно, этот вид вакцин является одним из самых продвинутых, обеспечивающих как высокую безопасность, так и эффективность. Мы создали подобный тип вакцин с помощью делеции белка оболочки (E) у TGEV и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV). Такую же стратегию, в принципе, можно применить к вирусу PEDV. Часто коронавирусный белок E индуцирует апоптоз. Поэтому для размножения дефектного вируса следует разрабатывать клеточные линии, в которых синтез недостающего белка E происходит не постоянно, а в результате индукции, как было описано ранее. Подобная стратегия приводит к сборке дефектных вирусных частиц, неспособных к распространению, что обеспечивает безопасность вакцины.

Защитные свойства естественно возникающих ослабленных PEDV

Ослабленные полевые штаммы PEDV, в принципе, можно использовать как живые или инактивированные вакцины. Вакцинация с использованием штаммов S-INDEL (Рисунок 2) обеспечивает перекрестную защиту против вирулентных штаммов PEDV, что указывает на потенциальную возможность использования умеренно вирулентных штаммов S-INDEL в качестве основы для создания новых вакцин против PEDV (Goede и Morrison, 2016; Goede с соавт., 2015; Lin с соавт., 2015a). Кроме того, недавно в Европе, Китае и США были обнаружены штаммы PEDV с крупными делециями S-белка, а также рекомбинанты PEDV и TGEV (Akimkin с соавт., 2016; Boniotti с соавт., 2016; Li с соавт., 2016). Патогенность указанных вирусов пока не изучена, однако среди полевых изолятов, скорее всего, можно будет обнаружить ослабленные рекомбинантные вирусы, наиболее подходящие для создания вакцин.

Рисунок 4.

Новый рекомбинантный коронавирус свиней. А. Структура генома нового штамма SeCoV, появившегося в результате рекомбинации между циркулирующими штаммами TGEV и PEDV. Точки рекомбинации указаны х-образными фигурами. Различия между TGEV и SeCoV обозначены с помощью красных звездочек. В. Нуклеотидные последовательности, окружающие точки рекомбинации в геномах исходных вирусов TGEV и PEDV и в конечном геноме SeCoV. Кодировующие последовательности выделены прямоугольниками, окрашенными такими же цветами, как и в пункте А. Консервативная сердцевинная последовательность (CS) мРНК-3 TGEV, выделенная красным, отсутствует в геноме SeCoV.

apoptosis. Therefore, the generation of stably transformed cells expressing E protein is more efficiently achieved by the construction of packaging cell expressing this protein in an inducible manner as previously described (Enjuanes et al., 2016). This strategy leads to the assembly of viruses that cannot disseminate and, therefore, in principle constitute safe vaccines.

Protection by naturally occurring PEDV attenuated variants. Attenuated field PEDV strains could be used in principle as live or inactivated vaccines. In this sense, inoculation with S-INDEL strains (Fig. 2) confers cross-protection against a challenge with virulent PEDV strains, indicating the potential of S-INDEL mild strains as base for the development of novel PEDV vaccines (Goede and Morrison, 2016; Goede et al., 2015; Lin et al., 2015a). In addition, PEDV isolates with large S protein deletions, or recombinant viruses between PEDV and TGEV have been recently reported both in Europe, China and the States (Akimkin et al., 2016; Boniotti et al., 2016; Li et al., 2016). The pathogenicity of these recombinant viruses needs to be addressed but, among these field recombinant viruses, attenuated strains have most likely been generated that may be vaccine candidates.

Modified live attenuated vaccines based on viruses that have been attenuated by passage in cell culture

Modified live attenuated vaccines based in the passage of the virus in cells have been obtained after 90 to 100 passages (Song and Park, 2012). These attenuated vaccines have been developed in China, Japan and Korea. Although these vaccines provide a reasonable partial protection, in general, do not fully prevent virus shedding, an indicator of vaccine efficacy. Therefore, this type of vaccines has the possibility of evolving *in vivo* recovering their virulence. In fact, it has been observed that Asian attenuated vaccines have reverted to virulent strains in the field by recombination with circulating PEDV strains, being the origin of several PEDV isolates identified in China and Korea after the vaccine was introduced in field conditions (Li et al., 2016; Song and Park, 2012). These vaccines would need to be improved with the addition of a safety guard that does not allow reversion to a virulent phenotype.

Innovative approaches for PEDV vaccine development

Liveattenuated viruses can be generated by the deletion of genes encoding proteins involved in virus virulence, what can

Модифицированные живые ослабленные вакцины на основе вирусов, аттенуированных при пассировании в культуре клеток

В Китае, Японии и Корее удалось создать модифицированные живые ослабленные вакцины после 90–100 пассажей вирусов в культуре клеток (Song и Park, 2012). Несмотря на то, что эти вакцины обеспечивают приемлемую частичную защиту, в целом, они полностью не предотвращают выделение вируса в окружающую среду, что указывает на неполную вирулентному фенотипу.

Инновационные методы разработки вакцины против PEDV

Живые аттенуированные вакцины можно создать при помощи делеции генов, которые кодируют белки, ответственные за вирулентный фенотип. Это осуществляют при помощи конструирования дефектного вируса методами биоинженерии ("обратной генетики"). Подобная стратегия была применена, при создании перспективных вакцинных кандидатов против TGEV, SARS-CoV, MERS-CoV, а сейчас применяется, при создании вакцин против PEDV. В рамках данной стратегии инфекционные клоны к ДНК PEDV встраивают в бактериальные плазмиды, обеспечивающие устойчивость клонированной копии вирусного генома. Для того, чтобы предотвратить возможную реверсию к вирулентности, в вирусный геном следует внедрить минимум три защитных участка. Реверсия к вирулентности может возникнуть при взаимодействии вакцины с вирусами с компенсаторными мутациями, либо при рекомбинации вакцинного вируса с полевым вирулентным штаммом. Для понимания механизма ослабления вируса PEDV, следует изучить взаимодействие вирусов с организмами хозяев, что поможет идентифицировать гены, модулирующие врожденную иммунную реакцию. Делеция генов, которые кодируют вирусные белки, ингибирующие врожденную иммунную реакцию (например, производство IFN), может обеспечить создание ослабленного вируса и, следовательно, потенциальной вакцины.

Уже созданы два инфекционных клон к ДНК PEDV, которые можно использовать для генно-инженерной аттенуации PEDV (Beall с соавт., 2016; Jengarn с соавт., 2015). Jengarn с коллегами, используя методы, описанные нашей лабораторией, получили клон к ДНК, объединив смежные фрагменты к ДНК, составляющие полный геном PEDV, в бактериальной искусственной хромосоме (BAC) (Almazan с соавт., 2000; Almazan с соавт., 2015). Для того, чтобы из инфекционного клон к ДНК получить инфекционный рекомбинантный вирус, были разработаны клетки Vero E6, стабильно экспрессирующие rAPN. Эти клетки использовались для получения быстро реплицирующихся PEDV. Как было описано ранее, делеция гена белка 3 не препятствовала размножению PEDV в клетках Vero. В качестве альтернативы делеции гена белка 3, был получен ещё один вирус, в котором вместо ORF3 был вставлен чужеродный ген mCherry. Рекомбинантный вирус продемонстрировал высокий уровень репродукции, генетическую стабильность и способность синтезировать чужеродный белок. Рекомбинантный PEDV, полученный из инфекционного клон к ДНК (ic PEDV), реплицировался так же эффективно, как родительский вирус в культуре клеток и в организме свиней, что привело к воспроизведению болезни с летальным исходом *in vivo*. Важно отметить, что указанный рекомбинантный PEDV быстро передавался не привитым свиньям посредством непрямого контакта, что демонстрирует его вирулентность и способность к эффективной передаче. Ещё один рекомбинантный PEDV был получен с помощью удаления ORF3 и ее замены геном красного флуоресцентного белка. Этот вирус эффективно реплицировался *in vitro* и *in vivo*, передавался среди зараженных свиней и вызывал заболевание с летальным исходом. Однако диарея у свиней, зараженных указанным вирусом, были менее выражена, чем у свиней, зараженных вирусом дикого типа или ic PEDV. Полученные результаты демонстрируют, что мутант PEDV с удаленной ORF3, частично ослаблен и, следовательно, может служить основой для вакцины.

be achieved by engineering their genome. This strategy has been applied to generate promising vaccine candidates for TGEV, SARS-CoV, MERS-CoV, and is now being applied to PEDV. PEDV infectious cDNA clones are being constructed in plasmids that provide stability to the cloned cDNA that represents a copy of the viral genome. This strategy requires the introduction in the viral genome of at least three safety guards, in order to prevent the reversion of the vaccine candidate to the virulent phenotype. Regain of virulence could be mediated by the selection of viruses with compensatory mutations or by recombination of the vaccine virus with a virulent field strain. PEDV virus attenuation requires the study of virus-host interactions, to identify genes modulating the innate immune response. The deletion of genes encoding viral proteins that inhibit the innate immune response (for instance, the production of IFN) may lead to attenuated virus and, therefore, to vaccine candidates.

Two PEDV infectious cDNA clones have been reported, providing the necessary tools for the engineering of genetically attenuated PEDVs as vaccine candidates (Beall et al., 2016; Jengarn et al., 2015). Jengarn and collaborators have engineered a full-length cDNA clone that was constructed by assembling contiguous cDNA fragments encompassing the complete PEDV genome in a bacterial artificial chromosome (BAC), following techniques previously described by our laboratory (Almazan et al., 2000; Almazan et al., 2015). To facilitate the rescue of the recombinant virus from the infectious cDNA clone, first VeroE6 cells stably expressing gpAPN were produced to facilitate the rescue of infectious PEDV from the cDNA. These cells were used as a platform to obtain a high-growth variant of PEDV. As indicated above, the deletion of protein 3 facilitated the growth of PEDV in Vero cells. In addition, a high-growth and genetically stable recombinant PEDV expressing a foreign protein was rescued by replacing the ORF3 gene with the mCherry gene.

The second infectious cDNA clone derived PEDV (icPEDV) replicated as efficiently as the parental virus in cell culture and in pigs, resulting in lethal disease *in vivo* (Beall et al., 2016). Importantly, this recombinant PEDV was rapidly transmitted to uninoculated pigs via indirect contact, demonstrating virulence and efficient transmission. A recombinant PEDV was also generated by elimination of ORF3 that was replaced by the gene of a red fluorescent protein. This virus efficiently replicated *in vitro* and *in vivo*, was transmitted among infected pigs, and produced lethal disease outcomes. However, the diarrheic scores in pigs infected with this virus were lower than those infected with the wild-type-virus or with the icPEDV. These results indicate that the PEDV deletion mutant lacking ORF3 is partially attenuated and, therefore, may serve as the basis for a vaccine.

Identification and deletion of virulence genes may lead to vaccine candidates

PEDV infection affects several cellular signaling pathways: (i) it induces apoptosis both in tissue cultures and *in vivo*, (ii) promotes the activation of two important cell-host kinase pathways, positively affecting viral replication, and (iii) elicited an endoplasmic reticulum stress response that negatively affects viral replication (Kim and Lee, 2014, 2015; Wang et al., 2014c; Zhao et al., 2014). There is limited information on the viral proteins involved in the modulation of these cell pathways, therefore further analyses in the context of viral infection are required to elucidate their role in virulence.

Many viruses encode viral factors modulating innate immunity, which is the first line of defense against pathogens. Identification and deletion of these factors may facilitate the design of attenuated viruses that could be biosafe vaccine candidates. PEDV infection inhibits IFN production in several cell types, such as monkey MARC-145 or porcine IEC cells (Cao et al., 2015; Zhang et al., 2016). In addition, replicase non-structural proteins nsp1, nsp3, nsp5, nsp7, nsp14, nsp15 and nsp16, accessory protein 3, and structural proteins E, M and N are IFN antagonists (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Deletion of non-essential PEDV proteins with IFN induction antagonist activity will probably lead to the generation of attenuated virus mutants that may result in vaccine candidates.

Идентификация и делеция генов, ассоциированных с вирулентностью, может привести к созданию эффективных вакцин

PEDV-инфекция воздействует на несколько клеточных сигнальных путей: (i) она индуцирует апоптоз в тканевых культурах и *in vivo*, (ii) способствует активации двух важных путей метаболизма киназ во взаимодействии клетки-хозяина, что положительно влияет на репликацию вирусов и (iii) вызывает стрессовую реакцию эндоплазматической сети, которая препятствует репликации вирусов (Kim и Lee, 2014, 2015; Wang с соавт., 2014с; Zhao с соавт., 2014). Однако в настоящее время недостаточно данных о вирусных белках, участвующих в модуляции этих клеточных путей, поэтому требуется их дальнейшее изучение в ходе вирусной инфекции, чтобы выявить влияние отдельных белков на вирулентность.

Многие вирусы кодируют вирусные факторы, модулирующие врожденный иммунитет, являющийся первой линией обороны против патогенов. Идентификация и делеция подобных факторов могут способствовать получению ослабленных вирусов, которые можно будет использовать для создания биологически безопасных вакцин. PEDV-инфекция ингибирует производство IFN в некоторых типах клеток, как например: клетках обезьян MARC-145 или клетках свиней IEC (Cao с соавт., 2015; Zhang с соавт., 2016). Кроме того, неструктурные белки репликазного комплекса nsp1, nsp3, nsp5, nsp7, nsp14, nsp15 и nsp16, а также аксессуарный белок 3 и структурные белки Е, М и N являются антагонистами IFN (Wang с соавт., 2015; Zhang с соавт., 2016). Делеция заменимых белков PEDV, обладающих своим антагонизмом индукции IFN, вероятно, позволит получить ослабленные вирусные мутанты, которые можно будет использовать для создания вакцин.

Альтернативной стратегией идентификации генов, которые можно модифицировать или удалить для получения аттенуированных вирусов, является обнаружение генов, изменяющихся при пассировании вирулентного PEDV более сотни раз. Подобный метод был использован для создания вакцин в Корее, Китае и Японии. В случае вакцины DR13, разработанной в Корее, нуклеотидные замены наблюдались в 14 ORF, а делеции – в 4 из них (Рисунок 6). Очевидно, не все эти изменения способствуют ослаблению вируса. Следовательно, необходима идентификация тех

An alternative strategy to identify genes that could be modified or deleted to design attenuated viruses is to identify genes that have changed during the passages of virulent PEDV over one hundred times, in order to obtain attenuated viruses that have been used as vaccines in Korea, China and Japan (Park et al., 2012). In the case of the DR13 vaccine developed in Korea, nucleotide substitutions were observed in 14 ORFs and deletions in 4 of them (Fig. 6). Obviously, not all these changes will be associated with attenuation. Therefore, the identification of changes that had a major role in reduction of virulence could be considered as potential candidates for modification and vaccine development.

We believe that generating live attenuated vaccines including several safety guards will lead to the most efficient vaccines because they express all field virus antigens. In addition, live attenuated vaccines in general are not associated with the induction of ADEI or eosinophilia. In fact, the majority of the vaccines successfully used in human and animal health belong to this category.

PORCINE DELTA CORONAVIRUS (PDCoV)

PDCoV is a newly discovered enteric porcine CoV first identified in Hong Kong in 2009–2010 (Woo et al., 2012), and reported in the USA for the first time in February 2014, in the feces from diarrheic sows, during an epidemic of acute and transmissible diarrhea (Chen et al., 2015). In a retrospective study PDCoV was detected in Minnesota in 2013, indicating that the virus was circulating in the States before it was initially identified. The virus has been disseminated within 18 US states (December 2015). The full-length genomic sequence of a PDCoV strain from a North American herd was soon reported (Jung et al., 2015b). Since then, 45 full genome sequences have been deposited in GenBank (May 2016). The American PDCoV that was discovered in Ohio and Indiana, rapidly spread to other states in the USA and Canada, and caused significant economic losses in the swine industry (Ma et al., 2015). PDCoV has also been identified in Canada, Thailand, Korea and China (Dong et al., 2015; Homwong et al., 2016; Janetanakit et al., 2016; Lee et al., 2016; Song et al., 2015). Genome analysis has revealed that USAPDCoV isolates share a close relationship (99.7% sequence identity) with Hong Kong and South Korean PDCoV strains, and with CoV isolated in Asian leopard cat and

Рисунок 5.

Очищенные олигомеры белка S в качестве вакцинных кандидатов. А. Электронно-микроскопическая фотография подвздошной кишки поросенка, спустя 3 дня после инфицирования TGEV. Вирионы (темные частицы) поглощаются после связывания с клеточным рецептором (фотография любезно предоставлена Jens P. Teifke и Kirsten Saenger, Институт Фридриха Леффлера, о. Римс, Германия). Б. Очищенные мицеллярные олигомеры белка S ("розетки") (Anton с соавт., 1996).

изменений, которые играют ключевую роль в уменьшении вирулентности, это может поспособствовать разработке эффективных вакцин.

Мы считаем, что живые аттенуированные вакцины с встроенными в геном страховочными участками являются наиболее эффективным на данный момент вакцинами, поскольку они экспрессируют все антигены полевого вируса. Кроме того, живые ослабленные вакцины в целом не индуцируют антителозависимое усиление инфекционности (ADEI) или эозинофилию. Важно отметить, что большинство вакцин, успешно применяемых для вакцинации людей и животных, принадлежит к данной категории.

ДЕЛЬТА-КОРОНАВИРУС СВИНЕЙ (PDCoV)

PDCoV – новый энтеральный коронавирусы свиней, зафиксированный в Гонконге в 2009–2010 гг (Woo с соавт., 2012), а затем и в США в феврале 2014 года. Вирус обнаружили в фекалиях свиней во время эпидемии острой и трансмиссивной диареи (Chen с соавт., 2015). Результаты ретроспективного анализа показали, что PDCoV циркулировал в Миннесоте в 2013 году, то есть вирус уже был распространен в Штатах до момента обнаружения. Территория распространения вируса охватывает 18 штатов США (декабрь 2015 года). Вскоре после обнаружения вируса, была получена полная геномная последовательность штамма PDCoV из Северной Америки (Jung с соавт., 2015b). В настоящее время в GenBank представлены 45 полных геномных последовательностей (май 2016 года). Американский PDCoV, обнаруженный в Огайо и Индиане, быстро распространился на другие штаты в США и Канаде и вызвал значительные экономические потери в промышленном свиноводстве (Ma с соавт., 2015). PDCoV также был обнаружен в Канаде, Таиланде, Корее и Китае (Dong с соавт., 2015; Homwong с соавт., 2016; Janetanakit с соавт., 2016; Lee с соавт., 2016; Song с соавт., 2015). Результаты геномного анализа показали, что геномная последовательность штаммов PDCoV из США на 99.7% идентична штаммам PDCoV из Гонконга и Южной Кореи, а также штаммам CoV, выделенным у азиатских леопардов и китайских хорьковых барсуков (процент зараженных животных из всех исследованных составил 2.4% и 1.1% соответственно) (Li с соавт., 2014; Ma с соавт., 2015; Wang с соавт., 2014a). Результаты филогенетического анализа нуклеотидной последовательности S-гена PDCoV демонстрируют тесную связь между PDCoV, дельта-CoV мелких млекопитающих, дельта-CoV птиц и альфа-CoV (Рисунок 7) (Hu с соавт., 2015).

Chinese ferret-badger that were positive in 2.4% of and 1.1% of the animals tested, respectively (Li et al., 2014; Ma et al., 2015; Wang et al., 2014a). Phylogenetic analysis of PDCoV S gene nucleotide sequence illustrates the close relationship between PDCoV, delta-CoVs of small mammals, avian-delta CoVs, and alpha-CoVs (Fig. 7) (Hu et al., 2015).

PDCoV is an enveloped and pleomorphic virus with a diameter of 180 nm, excluding the spike projections (Ma et al., 2015). PDCoV has a positive-sense RNA genome of approximately 25.4 kb with a 5' cap and a 3' polyadenylated tail that belongs to the genus Deltacoronavirus within the family Coronaviridae of the order Nidovirales (de Groot et al., 2012; Woo et al., 2012). The PDCoV genome contains six common coronaviral genes in the following conserved order: 5'-ORF1a-ORF1b-S-E-M-N-3'. The last third of the genome encodes the 4 structural proteins, spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N), as well as two genus-specific genes, gene 5 and gene 7, between M and N, and within N, respectively (Lee and Lee, 2015; Woo et al., 2012) (Fig. 1) and shows little cross-reactivity with TGEV and PEDV with minor exceptions. In fact, recently antigenic cross-reactivity between PDCoV Michigan strain and PEDV, mediated by N protein, has been detected using a monoclonal antibody specific for N protein. Nevertheless, no cross-neutralization has been detected between these strains (Ma et al., 2016).

The USA PDCoV strain OH-FD22 was isolated from intestinal contents of a diarrheic pig from Ohio using ST and LLC porcine kidney (LLC-PK) cell cultures and various medium additives (Hu et al., 2015). PDCoV were also isolated in LLC-PK cells from intestinal contents of PDCoV inoculated gnotobiotic pigs. A differential requirement for virus growth in tissue culture was observed. LLC-PK cells required trypsin, whereas ST cells needs pancreatin. The isolates were serially propagated in cell culture formore than20 passages showing stability of the genes analyzed (S and N). Culture-adapted PDCoVs include two isolates, USA-ILI-2014 and MICHIGAN-8977-2014, both isolated at the USDA National Veterinary Services Laboratory (NVSL) (Chen et al., 2015; Ma et al., 2015).

PDCoV causes diarrhea in nursing piglets and in sows. The PDCoV-positive intestinal content (Ohio CVM1) and the cell culture-adapted PDCoVMICHIGAN-8977-2014 strains were orally inoculated into gnotobiotic and conventional piglets (Ma et al., 2015). Within 1 to 3 days postinfection, profuse watery diarrhea, vomiting, and dehydration were observed. Clinical signs were associated with epithelial necrosis in the gastric pits

Рисунок 6.

Различия в нуклеотидных последовательностях вирулентных и аттенуированных штаммов DR13. Сравнивались полные геномы вирулентных (GenBank JQ023161) и аттенуированных (GenBank JQ023162) штаммов PEDVDR13. Вверху представлено схематичное изображение генома PEDV; названия генов соответствуют названиям на Рисунке 1. Внизу обозначены смысловые замены, в виде точечных мутаций и делеций, присутствующие только в геноме аттенуированного вируса DR13. Вирусные белки с наибольшим числом мутаций выделены красным.

PDCoV является оболочечным и плеоморфным вирусом, диаметром 180 нм без учета длинны шиповидных отростков на оболочке (пепломеров) (Ma с соавт., 2015). PDCoV принадлежит к роду *Deltacoronavirus*, семейства *Coronaviridae*, порядка *Nidovirales*; имеет РНК-геном с положительной полярностью длиной примерно 25.4 тыс. нуклеотидов, с 5'-кэп и 3' полиаденилированным концом (de Groot с соавт., 2012; Woo с соавт., 2012). Геном PDCoV содержит шесть обычных генов коронавирусов в следующем закрепленном порядке: 5'-ORF1a-ORF1b-S-E-M-N-3'. Последняя треть генома кодирует 4 структурных белка: белок пепломеров (S), оболочечный (E), мембранный (M) и нуклеокапсидный (N), а также два родоспецифических гена: ген 5 и ген 7, между M и N и внутри N соответственно (Lee и Lee, 2015; Woo с соавт., 2012). (Рисунок 1) Данный вирус почти не обладает перекрестной реактивностью с TGEV и PEDV. Следует отметить, что недавно обнаруженная антигенная перекрестная реактивность между штаммом PDCoV из штата Мичиган и PEDV, вызванная белком N, была зафиксирована с помощью моноклональных антител, специфических для белка N. Однако никакой перекрестной нейтрализации между этими штаммами обнаружено не было (Ma с соавт., 2016).

Штамм PDCoV OH-FD22 из США был выделен из содержимого кишечника свиней из Огайо, больных диареей, с использованием культур клеток ST и клеток почки свиньи (LLC-PK), а также некоторых добавок (Hu с соавт., 2015). PDCoV также был выделен из кишечного содержимого гнотобиотических свиней, привитых PDCoV, с использованием клеток LLC-PK. Было отмечено, что для размножения вируса в разных культурах, требуются разные условия. К клеткам LLC-PK необходимо добавлять трипсин, тогда как к клеткам ST – панкреатин. После более 20 пассажей в культуре клеток, анализируемые гены S и N не претерпели никаких мутаций. Адаптированные к клеточным культурам PDCoV включают в себя два штамма: USA-ILI-2014 и MICHIGAN-8977-2014; оба были выделены в Национальной лаборатории ветеринарной службы (NVSL) Министерства сельского хозяйства США (Chen с соавт., 2015; Ma с соавт., 2015).

PDCoV вызывает диарею у поросят-сосунков и свиноматок. Штаммы PDCoV – в виде кишечного материала (CVM1 Ohio) и в составе клеточной культуры (MICHIGAN-8977-2014) были перорально введены гнотобиотическим и обычным поросятам (Ma с соавт., 2015). В течение 1–3 дней после заражения, были отмечены: профузная водянистая диарея, рвота и обезвоживание. Клинические признаки были связаны с некрозом эпителия желудочных ямок и тонкой кишки, что выразилось в тяжелой форме атрофии кишечных ворсинок. Также у PDCoV-инфицированных поросят была зафиксирована легкая интерстициальная пневмония. Высокий уровень вирусной РНК был зафиксирован в тканях кишечника и фекалиях зараженных поросят, в то же время, средний, но значительный уровень РНК был зафиксирован в крови, легких, печени и почках, что указывает на системное распространение вируса.

Был изучен механизм PDCoV-индуцированной смерти инфицированных энтероцитов *in vivo* и инфицированных клеток LLC-PK и ST *in vitro* (Jung с соавт., 2015b; Jung с соавт., 2016a). На 3–4 день после заражения, у свиней наблюдается острая водянистая диффузная диарея и рвота, острый атрофический энтерит с легкой или умеренной цитоплазматической вакуолизацией энтероцитов атрофи-

Рисунок 7.

Эволюционные связи изолятов PDCoV. Филогенетическая дендрограмма на основе последовательностей S-белка PDCoV (Jung с соавт., 2016b). Изоляты PDCoV (выделены красным прямоугольником) похожи на другие дельта-коронавирусы млекопитающих (синий прямоугольник) и птиц (зеленый прямоугольник).

and small intestine, the latter resulting in severe villous atrophy. Mild interstitial pneumonia was identified in the lungs of PDCoV-infected piglets. High levels of viral RNA were detected in intestinal tissue luminal content and feces of infected piglets, whereas moderate but significant RNA levels were detected in blood, lung, liver, and kidney, indicating multi-systemic dissemination of the virus.

The mechanism of PDCoV induced death of infected enterocytes *in vivo* and infected LLC-PK and ST cells *in vitro* has been analyzed (Jung et al., 2015b; Jung et al., 2016a). At 3–4 days post-inoculation, infected pigs showed severe watery diarrhea and vomiting, and mainly diffuse, severe atrophic enteritis, with mild to moderate cytoplasmic vacuolation of the enterocytes lining the atrophied villous epithelium. By immunofluorescence, PDCoV antigens were evident in villous or crypt epithelial cells. Apoptosis was not observed in PDCoV antigen-positive, small and large intestinal villous or crypt epithelial cells. In contrast, apoptotic signals were found in PDCoV antigen-positive LLC-PK and ST cells that also showed cytopathic effects, such as cell rounding, detachment and clumping in clusters. Therefore, PDCoV induces apoptosis in porcine cell cultures, but not in the infected intestinal enterocytes *in vivo* (Jung et al., 2016b).

Overall, high progress has been reported on the development of vaccines to protect against PEDV. In contrast, for the moment no licensed vaccine has been reported for PDCoV. We consider that the construction of infectious cDNA clones for PEDV and PDCoV will significantly speed up the engineering of safe vaccines to protect against these enteric viruses. Alternative approaches based on the vaccination with field derived attenuated PEDV deletion mutants or recombinants is an alternative promising possibility.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Government of Spain (BIO2013-42869-R), a U.S. National Institutes of Health (NIH) project (2P01AI060699-06A1), and financial support of IMI and European Commission and in-kind contributions from EFPIA partners (ZAPI project, IMI Grant Agreement n°115760). SZ and API received contracts from NIH and CEVA Sante, respectively. We thank Marga Gonzalez for her technical assistance.

рованного ворсинчатого эпителия. Результаты иммунофлуоресцентного анализа показали наличие PDCoV в клетках ворсинчатого эпителия и в клетках кишечных крипт. Большие и малые PDCoV антиген-положительные клетки ворсинчатого эпителия, а также клетки кишечных крипт не подверглись апоптозу. Однако признаки апоптоза были обнаружены в PDCoV антиген-положительных клетках LLC-PK и ST. В указанных клетках также были обнаружены признаки цитопатического воздействия вируса, такие как: округление, отделение и группировка в клеточные агрегации. Таким образом, PDCoV индуцирует апоптоз в культуре клеток свиней, но не в инфицированных кишечных энтероцитах *in vivo* (Jung с соавт., 2016b).

В целом наблюдается большой прогресс в разработке вакцин против PEDV. Однако до сих пор не создано лицензированной вакцины против PDCoV. Мы считаем, что получение инфекционных клонов кДНК PEDV и PDCoV значительно ускорит создание безопасных вакцин. В то же время, альтернативным многообещающим методом вакцинации можно признать использование вакцин, на основе полевых ослабленных делеционных мутантов PEDV или рекомбинантов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Настоящая работа получила поддержку в виде грантов от Правительства Испании (BIO2013-42869-R), проекта Национальных институтов здравоохранения (NIH) (2P01AI060699-06A1), финансовой поддержки от IMI и Европейской комиссии и имущественных вкладов от партнеров EFPIA (проект ZAPI, IMIGrant соглашение №115760). SZ и AP получили контракты от NIH и CEVA Sante соответственно. Мы благодарим Marga Gonzalez за техническую помощь.

Литература / References

AASV, 2014. PED vaccine gains conditional approval. J. Am. Vet. Med. Assoc. 245, 267.

Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Hoper, D., Jenckel, M., Pohlmann, A., 2016. A new chimeric porcine coronavirus strain found in swine feces collected in Germany 2012. Emerg. Infect. Dis., doi: 10.3201/eid2207.160179.

Almazan, F., DeDiego, M.L., Sola, I., Zuniga, S., Nieto-Torres, J.L., Marquez-Jurado, S., Andres, G., Enjuanes, L., 2013. Engineering a replication-competent, propagation-defective Middle East respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. MBio 4, e00650-13.

Almazan, F., Gonzalez, J.M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., Enjuanes, L., 2000. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5516-5521.

Almazan, F., Marquez-Jurado, S., Nogales, A., Enjuanes, L., 2015. Engineering infectious cDNAs of coronavirus as bacterial artificial chromosomes. Methods Mol. Biol. 1282, 135-152.

Alonso, C., Goede, D.P., Morrison, R.B., Davies, P.R., Rovira, A., Marthaler, D.G., Torremorell, M., 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. Vet. Res. 45, 73.

Annamalai, T., Saif, L.J., Lu, Z., Jung, K., 2015. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 168, 193-202.

Anton, I.M., Gonzalez, S., Bullido, M.J., Corsin, M., Risco, C., Langeveld, J.P., Enjuanes, L., 1996. Cooperation between transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) structural proteins in the *in vitro* induction of virus-specific antibodies. Virus Res. 46, 111-124.

Beall, A., Yount, B., Lin, C.M., Hou, Y., Wang, Q., Saif, L., Baric, R., 2016. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A. MBio 7, e01451-15.

Beam, A., Goede, D., Fox, A., McCool, M.J., Wall, G., Haley, C., Morrison, R., 2015. A porcine epidemic diarrhea virus outbreak in one geographic region of the United States: Descriptive epidemiology and investigation of the possibility of airborne virus spread. PLoS One 10, e0144818.

Bolles, M., Deming, D., Long, K., Agnihothram, S., Whitmore, A., Ferris, M., Funkhouser, W., Gralinski, L., Tatura, A., Heise, M., Baric, R.S., 2011. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. J. Virol. 85, 12201-12215.

Boniotti, M.B., Papetti, A., Lavazza, A., Alborali, G., Sozzi, E.,

Chiapponi, C., Faccini, S., Bonilauri, P., Cordioli, P., Marthaler, D., 2016. Porcine epidemic diarrhea virus and discovery of a recombinant swine enteric coronavirus, Italy. Emerg. Infect. Dis. 22, 83-87.

Cao, L., Ge, X., Gao, Y., Herrler, G., Ren, Y., Ren, X., Li, G., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits dsRNA-induced interferon-beta production in porcine intestinal epithelial cells by blockade of the RIG-I-mediated pathway. Virol. J. 12, 127.

Chattha, K.S., Roth, J.A., Saif, L.J., 2015. Strategies for design and application of enteric viral vaccines. Annu. Rev. Anim. Biosci. 3, 375-395.

Chen, Q., Gauger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madson, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M., Zhang, J., 2015. Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets. Virology 482, 51-59.

Chen, Q., Gauger, P.C., Stafne, M.R., Thomas, J.T., Madson, D.M., Huang, H., Zheng, Y., Li, G., Zhang, J., 2016. Pathogenesis comparison between the United States porcine epidemic diarrhea virus prototype and S-INDEL-variant strains in conventional neonatal piglets. J. Gen. Virol. 97, 1107-1121.

Chung, H.C., Nguyen, V.G., Moon, H.J., Lee, J.H., Park, S.J., Lee, G.E., Kim, H.K., Noh, Y.S., Lee, C.H., Goede, D., Park, B.K., 2015. Isolation of Porcine Epidemic Diarrhea Virus during Outbreaks in South Korea, 2013-2014. Emerg. Infect. Dis. 21, 2238-2240.

Dastjerdi, A., Carr, J., Ellis, R.J., Steinbach, F., Williamson, S., 2015. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. Emerg. Infect. Dis. 21, 2235-2237.

De Groot, R.J., Baker, S.C., Baric, R., Enjuanes, L., Gorbalenya, A.E., Holmes, K.V., Perlman, S., Poon, L., Rottier, P.J.M., Talbot, P.J., Woo, P.C.Y., Ziebuhr, J., 2012. Coronaviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 774-796.

Dong, N., Fang, L., Zeng, S., Sun, Q., Chen, H., Xiao, S., 2015. Porcine Deltacoronavirus in Mainland China. Emerg. Infect. Dis. 21, 2254-2255.

Enjuanes, L., Zuniga, S., Castaño-Rodriguez, C., Gutierrez-Alvarez, J., Canton, J., Sola, I., 2016. Molecular basis of coronavirus virulence and vaccine development. Adv. Virus Res., In press.

Goede, D., Morrison, R.B., 2016. Production impact & time to stability in sow herds infected with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). Prev. Vet. Med. 123, 202-207.

Goede, D., Murtaugh, M.P., Nerem, J., Yeske, P., Rossow, K., Morrison, R., 2015. Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain. Vet. Microbiol. 176, 161-164.

Guliukin A.M., 2014. Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey. Vopr. Virusol. 59 (3), 5-10.

Guliukin M.I., Gorbato A.V., Sokolova N.A., Mnikova L.A., ishkpa T.A., Development of vaccine against rota-viral, corona-viral, colibacterioses of calves. 2014. Veterinaria i Kormlenie, 5, 52-53.

Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, M., Stadler, J., Akimkin, V., Blome, S., Pohlmann, A., Schirmmeier, H., Beer, M., Hoper, D., 2015. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. Emerg. Infect. Dis. 21, 493-496.

Hill, R.E., Jr., Foley, P.L., Carr, M.Y., Elsken, L.A., Gatewood, D.M., Ludemann, L.R., Wilbur, L.A., 2003. Regulatory considerations for emergency use of non-USDA licensed vaccines in the United States. Dev. Biol. (Basel) 114, 31-52.

Homwong, N., Jarvis, M.C., Lam, H.C., Diaz, A., Rovira, A., Nelson, M., Marthaler, D., 2016. Characterization and evolution of porcine deltacoronavirus in the United States. Prev. Vet. Med. 123, 168-174.

Hu, H., Jung, K., Vlasova, A.N., Chepngeno, J., Lu, Z., Wang, Q., Saif, L.J., 2015. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States. J. Clin. Microbiol. 53, 1537-1548.

Huang, Y.W., Dickerman, A.W., Pineyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., Opriessnig, T., Meng, X.J., 2013. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. MBio 4, e00737-13.

Iwata-Yoshikawa, N., Uda, A., Suzuki, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, Y., Morikawa, S., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H., Nagata, N., 2014. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine. J. Virol. 88, 8597-8614.

Janetanakit, T., Lumyai, M., Bunpaong, N., Boonyapisitsopa, S., Chaiyawong, S., Nonthabenjawan, N., Kesdaengsakonwut, S., Amonsin, A., 2016. Porcine Deltacoronavirus, Thailand, 2015. Emerg. Infect. Dis. 22, 757-759.

Jarvis, M.C., Lam, H.C., Zhang, Y., Wang, L., Hesse, R.A., Hause, B.M., Vlasova, A., Wang, Q., Zhang, J., Nelson, M.I., Murtaugh, M.P., Marthaler, D., 2015. Genomic and evolutionary inferences between

- American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus. *Prev. Vet. Med.* 123, 175-184.
- Jaume, M., Yip, M.S., Kam, Y.W., Cheung, C.Y., Kien, F., Roberts, A., Li, P.H., Dutry, I., Escriu, N., Daeron, M., Bruzzone, R., Subbarao, K., Peiris, J.S., Nal, B., Altmeyer, R., 2012. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement. *Hong Kong Med. J.* 18, 31-36.
- Jengarn, J., Wongthida, P., Wanasen, N., Frantz, P.N., Wanitchang, A., Jongkaewwattana, A., 2015. Genetic manipulation of porcine epidemic diarrhoea virus recovered from a full-length infectious cDNA clone. *J. Gen. Virol.* 96, 2206-2218.
- Jung, K., Annamalai, T., Lu, Z., Saif, L.J., 2015a. Comparative pathogenesis of US porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) strain PC21A in conventional 9-day-old nursing piglets vs. 26-day-old weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 178, 31-40.
- Jung, K., Hu, H., Eyerly, B., Lu, Z., Chepngeno, J., Saif, L.J., 2015b. Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 650-654.
- Jung, K., Hu, H., Saif, L.J., 2016a. Porcine deltacoronavirus induces apoptosis in swine testicular and LLC porcine kidney cell lines in vitro but not in infected intestinal enterocytes in vivo. *Vet. Microbiol.* 182, 57-63.
- Jung, K., Hu, H., Saif, L.J., 2016b. Porcine deltacoronavirus infection: Etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis. *Virus Res.*, doi: 10.1016/j.virusres.2016.1004.1009.
- Jung, K., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet. J.* 204, 134-143.
- Jung, K., Wang, Q., Scheuer, K.A., Lu, Z., Zhang, Y., Saif, L.J., 2014. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 662-665.
- Kim, H., Lee, Y.K., Kang, S.C., Han, B.K., Choi, K.M., 2016. Recent vaccine technology in industrial animals. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 5, 12-18.
- Kim, Y., Lee, C., 2014. Porcine epidemic diarrhea virus induces caspase-independent apoptosis through activation of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Virology* 460-461, 180-193.
- Kim, Y., Lee, C., 2015. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation is required for porcine epidemic diarrhea virus replication. *Virology* 484, 181-193.
- Lee, J.H., Chung, H.C., Nguyen, V.G., Moon, H.J., Kim, H.K., Park, S.J., Lee, C.H., Lee, G.E., Park, B.K., 2016. Detection and Phylogenetic Analysis of Porcine Deltacoronavirus in Korean Swine Farms, 2015. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 248-252.
- Lee, S., Lee, C., 2015. Functional characterization and proteomic analysis of the nucleocapsid protein of porcine deltacoronavirus. *Virus Res.* 208, 136-145.
- Li, G., Chen, Q., Harmon, K.M., Yoon, K.J., Schwartz, K.J., Hoogland, M.J., Gauger, P.C., Main, R.G., Zhang, J., 2014. Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734. *Genome Announc.* 2, e00278.
- Li, R., Qiao, S., Yang, Y., Guo, J., Xie, S., Zhou, E., Zhang, G., 2016. Genome sequencing and analysis of a novel recombinant porcine epidemic diarrhea virus strain from Henan, China. *Virus Genes* 52, 91-98.
- Lin, C.M., Annamalai, T., Liu, X., Gao, X., Lu, Z., El-Tholoth, M., Hu, H., Saif, L.J., Wang, Q., 2015a. Experimental infection of a US spike-insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus in conventional nursing piglets and cross-protection to the original US PEDV infection. *Vet. Res.* 46, 134.
- Lin, C.M., Gao, X., Oka, T., Vlasova, A.N., Esseili, M.A., Wang, Q., Saif, L.J., 2015b. Antigenic relationships among Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Transmissible Gastroenteritis Virus strains. *J. Virol.* 89, 3332-3342.
- Liu, C., Tang, J., Ma, Y., Liang, X., Yang, Y., Peng, G., Qi, Q., Jiang, S., Li, J., Du, L., Li, F., 2015. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus. *J. Virol.* 89, 6121-6125.
- Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Lou, F., Oglesbee, M., Krakowka, S., Li, J., 2015. Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States. *MBio* 6, e00064.
- Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Oglesbee, M., Krakowka, S., Niehaus, A., Wang, G., Jia, A., Song, H., Li, J., 2016. Two-way antigenic cross-reactivity between porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus. *Vet. Microbiol.* 186, 90-96.
- Meng, F., Ren, Y., Suo, S., Sun, X., Li, X., Li, P., Yang, W., Li, G., Li, L., Schwegmann-Wessels, C., Herrler, G., Ren, X., 2013. Evaluation on the efficacy and immunogenicity of recombinant DNA plasmids expressing spike genes from porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *PLoS One* 8, e57468.
- Mogler, M.A., Gander, J.R., Ray, D.L., Harris, D.L., 2014. Vaccination of PEDV-naïve dams with replicon RNA particle vaccine protects suckling piglets from challenge, The 2014 North American PRRS Symposium, Chicago, USA.
- Nam, E., Lee, C., 2010. Contribution of the porcine aminopeptidase N (CD13) receptor density to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Vet. Microbiol.* 144, 41-50.
- Oka, T., Saif, L.J., Marthaler, D., Esseili, M.A., Meulia, T., Lin, C.M., Vlasova, A.N., Jung, K., Zhang, Y., Wang, Q., 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet. Microbiol.* 173, 258-269.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., Enjuanes, L., 2002. Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J. Virol.* 76, 11518-11529.
- Park, S.J., Kim, H.K., Song, D.S., An, D.J., Park, B.K., 2012. Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J. Virol.* 86, 5964.
- Pasick, J., Berhane, Y., Ojkic, D., Maxie, G., Embury-Hyatt, C., Swekla, K., Handel, K., Fairles, J., Alexandersen, S., 2014. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transbound Emerg. Dis.* 61, 397-410.
- Schwartz, K., Henry, S., Tokach, L., Potter, M., Davidson, D., Egnor, C., Taylor, A.Z., 2014. Exposing Sows to PEDV to Build Herd Immunity. *Natl. Hog Farmer*, Mar 13.
- Scott, A., McCluskey, B., Brown-Reid, M., Grear, D., Pitcher, P., Ramos, G., Spencer, D., Singrey, A., 2016. Porcine epidemic diarrhea virus introduction into the United States: Root cause investigation. *Prev. Vet. Med.* 123, 192-201.
- Smirnova I.S., Aksenov N.D., Vonsky M.S., Hinkula J., Isagulians M.G., Kashuba E.V., Payakurel P., Biberfeld P., Grabovetsky V.V., Zaberezhny A.D., Buchinska L., 2006. Hepatitis C virus core protein transforms murine fibroblasts by promoting genomic stability. *Cellular Oncology.* 28(4), 177-190.
- Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167-175.
- Song, D., Zhou, X., Peng, Q., Chen, Y., Zhang, F., Huang, T., Zhang, T., Li, A., Huang, D., Wu, Q., He, H., Tang, Y., 2015. Newly emerged porcine deltacoronavirus associated with diarrhoea in swine in China: identification, prevalence and full-length genome sequence analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 575-580.
- Theuns, S., Conceicao-Neto, N., Christiaens, I., Zeller, M., Desmarests, L.M., Roukaerts, I.D., Acar, D.D., Heylen, E., Matthijnsens, J., Nauwynck, H.J., 2015. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in Belgium, January 2015. *Genome Announc.* 3, e00506-15.
- Tseng, C.T., Sbrana, E., Iwata-Yoshikawa, N., Newman, P.C., Garron, T., Atmar, R.L., Peters, C.J., Couch, R.B., 2012. Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PLoS One* 7, e35421.
- Vlasova, A.N., Marthaler, D., Wang, Q., Culhane, M.R., Rossow, K.D., Rovira, A., Collins, J., Saif, L.J., 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1620-1628.
- Wang, D., Fang, L., Shi, Y., Zhang, H., Gao, L., Peng, G., Chen, H., Li, K., Xiao, S., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus 3C-like protease regulates its interferon antagonism by cleaving NEMO. *J. Virol.* 90, 2090-2101.
- Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y., 2014a. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 917-919.
- Wang, S.F., Tseng, S.P., Yen, C.H., Yang, J.Y., Tsao, C.H., Shen, C.W., Chen, K.H., Liu, F.T., Liu, W.T., Chen, Y.M., Huang, J.C., 2014b. Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 208-214.
- Wang, Y., Li, J.R., Sun, M.X., Ni, B., Huan, C., Huang, L., Li, C., Fan, H.J., Ren, X.F., Mao, X., 2014c. Triggering unfolded protein response by 2-Deoxy-D-glucose inhibits porcine epidemic diarrhea virus propagation. *Antiviral Res.* 106, 33-41.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.S., Lau, C.C., Tsang, A.K., Lau, J.H., Bai, R., Teng, J.L., Tsang, C.C., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995-4008.
- Yamamoto, R., Soma, J., Nakanishi, M., Yamaguchi, R., Niinuma, S., 2015. Isolation and experimental inoculation of an S INDEL strain of porcine epidemic diarrhea virus in Japan. *Res. Vet. Sci.* 103, 103-106.
- Zhang, Q., Shi, K., Yoo, D., 2016. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1. *Virology* 489, 252-268.
- Zhao, S., Gao, J., Zhu, L., Yang, Q., 2014. Transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhoea virus infection induces dramatic changes in the tight junctions and microfilaments of polarized IPEC-J2 cells. *Virus Res.* 192, 34-45.