



КОНФЕРЕНЦИЯ

«Актуальные ветеринарные проблемы
в промышленном свиноводстве»

КОРОНАВИРУСЫ СВИНЕЙ: ПЕРЕДАЧА, ПАТОГЕНЕЗ И РАЗРАБОТКА ВАКЦИН

Луис Энхуанес¹, Алехандро Паскуаль¹,
Карлос Санчес¹, Алексей Забережный²,
Исабель Сола¹, Соня Суньига¹.

¹ Отдел молекулярной и клеточной биологии,
Национальный центр биотехнологии, Мадрид, Испания.

² Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко,
Москва, Россия.



КОРОНАВИРУСЫ СВИНЕЙ: ПЕРЕДАЧА, ПАТОГЕНЕЗ И РАЗРАБОТКА ВАКЦИН

Луис Энхуанес¹, Алехандро Паскуаль¹, Карлос Санчес¹, Алексей Забережный², Исабель Сола¹, Соня Суньига¹. 1. Отдел молекулярной и клеточной биологии, Национальный центр биотехнологии, Мадрид, Испания. 2. Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ. Энтеропатогенные коронавирусы свиней (CoVs) поражают стада животных во всем мире, приводя к значительным финансовым потерям. В последнее время стали известны новые свиные коронавирусы, и общая картина несколько усложнилась. К вирусу трансмиссивного гастроэнтерита (ТГС), который известен с 1946 года, его делеционного мутанта с тропизмом в отношении дыхательного тракта – респираторного коронавируса свиней (РКВС) и вируса эпизоотической диареи свиней (ЭДС) добавился ряд эмерджентных коронавирусов. Среди них, например, кишечный коронавирус свиней (SeCoV), новый рекомбинант, обладающий геномом вируса ТГС за исключением последовательности гена S-белка, которая гомологична таковой вируса ЭДС. Также в 2012 году был открыт дельтакоронавирус свиней (PDCoV). Первое сообщение о кишечном коронавирусе свиней поступило в январе 2016 года из Италии (Bonioti et al., 2016), подобные ему рекомбинантные вирусы были описаны в Германии (Akimkin et al., 2016) и Дании (Belsham et al., 2016) в феврале 2016 года. Однако эти вирусы присутствовали в пробах материала от свиней уже в 2009 году. Такое разнообразие коронавирусов свиней значительно усложняет постановку диагноза.

Несмотря на накопившийся с 1970-х годов объем знаний о коронавирусах, полностью успешной стратегии вакцинации найдено не было, вследствие чего новые вирулентные штаммы продолжали возникать. Исторически эффективнее прочих были живые аттенуированные вакцины. С нашей точки зрения многообещающим новым трендом может считаться разработка рекомбинантных вакцин методами обратной генетики. Таким образом можно сконструировать аттенуированные вирусы, которые смогут лечь в основу эффективных и безопасных вакцин-кандидатов. Для этой цели необходимо идентифицировать сигнальные механизмы хозяина, от которых зависит вирулентность свиных коронавирусов. Обладая этой информацией, можно создавать вирусы с модифицированными генами, отвечающими за факторы вирулентности, получая тем самым аттенуированные варианты, то есть потенциальные вакцинные вирусы. В настоящем обзоре речь пойдет об эволюции вируса ЭДС, диагностике, молекулярных основах аттенуации и разработке вакцин.

Эволюция вируса ЭДС. Вирус ЭДС крайне быстро эволюционирует, в особенности последовательность гена S-белка. Вскоре после того, как был получен первый изолят вируса ЭДС, был идентифицирован ряд штаммов, у которых в последовательности данного гена были выявлены небольшие инсерции или делеции (S-INDEL) либо крупные делеции (Jung and Saif, 2015). Штаммы S-INDEL в общем случае считаются менее

патогенными по сравнению с вирулентными штаммами вируса ЭДС (Chen et al., 2016; Lin et al., 2015; Wang et al., 2014). В свете этого филогенетическая классификация штаммов вируса ЭДС на основе последовательности гена S-белка отличается от той, в основе которой лежит полная последовательность генома. Классификация вариантов вируса ЭДС была пересмотрена по сравнению с предыдущей (Huang et al., 2013), и в настоящее время “американские” штаммы подразделяются на две клады – I и II, - причем к последней относятся штаммы S-INDEL (Vlasova et al., 2014). Классификация вирусов ЭДС на основании полных последовательностей геномов стала крайне затруднительна, поскольку: (i) в США были идентифицированы штаммы с S-INDEL, а также штаммы с крупными делециями в последовательности S-белка (Oka et al., 2014; Wang et al., 2014); (ii) в настоящее время циркулирующие в ЕС штаммы схожи с американскими S-INDEL штаммами (Hanke et al., 2015; Theuns et al., 2015), за исключением некоторых найденных в Украине штаммов, схожих с “изначальными” изолятами вируса ЭДС, полученными в США (Dastjerdi et al., 2015); (iii) в Китае были найдены новые “рекомбинантные” вирусы, попавшие в один кластер с американскими S-INDEL штаммами (Li et al., 2016); и (iv) часть работы по классификации штаммов проводилась одновременно с их циркуляцией (Boniotto et al., 2016). Последняя предложенная классификация штаммов вируса ЭДС основана на анализе полных последовательностей геномов, полученных во всем мире (Jarvis et al., 2015). В соответствии с данной классификацией все штаммы подразделяются на четыре клады, с А по D. Все классические штаммы вируса ЭДС из ЕС и Китая отнесены к кладе А. К кладе В относятся американские S-INDEL и ныне циркулирующие в ЕС штаммы. Наконец, небольшая кллада С и обширная кллада D включают в себя большинство американских изолятов, за исключением S-INDEL штаммов (Jarvis et al., 2015).

Начиная с 2010 года масштабные программы иммунизации животных в Азии как инактивированными, так и аттенуированными вакцинами не предотвратили появления новых патогенных штаммов. Одна из возможных причин в том, что вакцины на основе аттенуированных штаммов не исключали выделения вируса в окружающую среду, тем самым создавая возможность рекомбинации вакцинных штаммов с полевыми (Song and Park, 2012). Секвенирование генома одного из полученных в Китае изолятов вируса ЭДС (CH/HNQX-3/14) действительно показало, что данный штамм появился вследствие естественным образом произошедшей рекомбинации аттенуированных штаммов (CV777 и DR13) с циркулировавшим в тот момент полевым штаммом (CH/ZMDZY/11) (Li et al., 2016).

Недавно было опубликовано сообщение (Boniotto et al., 2016) о новом вирусе, вызывающем у свиней энтерит и циркулировавшего в Италии между 2007 и 2014 годами. Данный вирус обладал последовательностью генома вируса ТГС, в которой последовательность S-белка была идентична таковой вируса ЭДС (SeCoV-ITA09). Этот химерный вирус, вероятно, появился вследствие рекомбинации между полевыми штаммами вирусов ТГС и ЭДС. Похожие вирусы были найдены также другими исследовательскими группами из Германии (Akimkin et al., 2016) и Восточной Европы

(Belsham et al., 2016). Недавно проведенное секвенирование генома полученного в Германии изолята позволило идентифицировать новый вирус SeCoV (SeCoV-GER12), с геномом, на 99.5% идентичным рекомбинантному вирусу, описанному (Boniotti et al., 2016). Последовательность гена S-белка итальянского изолята SeCoV-ITALY-2009 была на 92% гомологична таковой прототипического европейского штамма вируса ЭДС CV777, в то время как остальной геном был на 97% идентичен геномам штаммов TГС TGEV H16 и TGEV Miller. Рекомбинантные вирусы обнаруживались у свиней с диареей в легкой форме. Диагносты должны быть осведомлены о существовании рекомбинантов свиных коронавирусов.

В настоящее время известно по меньшей мере две группы вариантов вируса ЭДС обширными делециями в последовательности гена S-белка, если сравнивать с европейским штаммом CV777 (Kocherhans et al., 2001) или штаммом non-Indel Colorado-2013, не содержащим делеции (Marthaler et al., 2014). В геноме таких вирусов имеется обширная делеция приблизительно в одном и том же участке генома, как, например, у штаммов PC-177 из США и TTR2 из Японии, у которых делеции были обнаружены в последовательности гена S-белка, кодирующей домен S1, соответственно, с 34 по 232 аминокислоту (Wang et al., 2014) и с 25 по 220 аминокислоту (Masuda et al., 2015). Вирус другого штамма, Korean MF3809, имеет обширную делецию в последовательности, соответствующей домену S1 несколько ближе к С-концу (аминокислоты с 713 по 916) (Park et al., 2014). Было показано, что штаммы с обширными делециями в последовательности S-белка, такие, как TTR2, обладают тропизмом в отношении кишечника, но *in vivo* оказываются аттенуированными (Suzuki et al., 2016). Недавно в Японии был описан ряд новых вариантов вируса ЭДС с делециями в домене S1 протяженностью от 194 до 216 аминокислот. В одной из работ было продемонстрировано, что все пробы биоматериала содержали вирусы по меньшей мере двух генотипов, и по меньшей мере в 94% этих проб присутствовал вирус с полной последовательностью гена S-белка (Diep et al., 2017). В целом можно заключить, что, похоже, аттенуированные штаммы понемногу вытесняют вирулентные.

Иммуногенные свойства и серотипы вируса ЭДС. По итогам экспериментов по нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток и сыворотки от выздоравливающих животных был сделан вывод, что все варианты вируса ЭДС относятся к одному серотипу. Однако недавно были получены данные полевых наблюдений, согласно которым эмерджентные высоковирулентные штаммы вируса ЭДС (не имеющие делеции в гене S-белка) по антигенным свойствам отличаются от “классических” штаммов (Lin et al., 2015). Это значит, что вакцины, приготовленные на основе классических штаммов, неэффективны против новых высоковирулентных вариантов вируса. Сравнение последовательностей, кодирующих эпитопы S-белка, говорит о том, что между антигенами классических и эмерджентных высоковирулентных non-Indel штаммов существуют различия, которыми объясняется неэффективность вакцин. Антитела, вырабатывавшиеся в ответ на стимуляцию классическими штаммами ЭДС, не были способны эффективно нейтрализовать вирусы высоковирулентных штаммов. Исследовалась перекрестная реактивность антигенов между прототипическим штаммом

вируса ЭДС CV777 и тремя штаммами вируса ЭДС с существенно различившимися геномами (non-S Indel PC22A без делеций, S-Indel Iowa106 и 197-Del PC177) с использованием набора свиных антисывороток и мышинных моноклональных антител к штамму CV777. По итогам эксперимента был сделан вывод, что между прототипическим штаммом и тремя американскими изолятами существуют антигенетические различия (Lin et al., 2015). Серологическая перекрестная реактивность и перекрестная нейтрализация между штаммами S-Indel и non-S-Indel была выше для гомологичных изолятов по сравнению с гетерологичными (Chen et al., 2016). С другой стороны при заражении поросят-сосунов штаммом S-Indel обеспечивалась частичная защита против высоковирулентных штаммов non-S-Indel (Lin et al., 2015).

Прогресс в области разработки вакцин против ЭДС. Вакцины «домашнего приготовления» представляют слишком серьезную опасность для хозяйств и мы не рекомендуем их использовать. Так, скармливание свиньям фрагментов кишечника животных с других ферм приводило к нежелательным результатам, а именно к появлению в таких хозяйствах персистентной коронавирусной инфекции, а также к проникновению других вирусов, таких как РРСС и цирковирусы. В докладах, представленных на V и VI Международном ветеринарном конгрессе (Enjuanes, 2015; Enjuanes et al., 2016) мы отмечали, что наиболее многообещающими вакцинами против свиных энтеритов будут те препараты, что способны стимулировать секреторный иммунитет в кишечнике. Лучший способ вакцинации для достижения этой цели – оральная, с доставкой аттенуированных вирусов непосредственно к клеткам эпителия кишечника. Такие вакцины способны защитить до 90% потомства вакцинированной свиноматки.

Теоретически существуют различные типы вакцин, которые можно использовать для защиты от ЭДС: 1) инактивированные или субъединичные вакцины; 2) аттенуированные вакцины, приготовленные из вирусов, прошедших серию пассажей в клеточной культуре; 3) вакцины на основе встречающихся в естественных условиях низковирулентных вариантов вируса ЭДС; 4) векторные вакцины; 5) современные рекомбинантные вакцины; 6) вакцины на основе РНК-репликонов; 7) вакцины на основе вирусов, способных к репликации, но не к размножению; 8) вакцины на основе аттенуированных вирусов, способных и к репликации, и к размножению. Я подробнее остановлюсь на плюсах и минусах перечисленных типов вакцин.

Инактивированные и субъединичные вакцины. Данные вакцины готовятся на основе инактивированных вирусов и чаще всего обеспечивают лишь частичную защиту, не предотвращая распространения инфекции (Lin et al., 2016). В качестве альтернативы были разработаны препараты на основе олигомеров S-белка (“розеток”), состоящих из 14-18 тримеров (Anton et al., 1996). Так как в ЖКТ свиней имеются рецепторы S-белка вируса ЭДС, то такие препараты могут быть усвоены и индуцировать развитие иммунного ответа, который однако будет слабее, чем если бы использовался аттенуированный способный к репликации вирус.

Вирусы, аттенуированные после серии пассажей в клеточной культуре. Одна из стандартных техник получения аттенуированного вакцинного вируса предполагает проведение серии 100-200 пассажей в клеточных культурах, желательнее используя клетки животных вида, отличного от того, для которого создается вакцина. Типичным примером может служить корейская вакцина DR13, для получения которой вирус прошел 93 пассажа в клетках Vero, что позволило обеспечить уровень защиты 40% и 87% при внутримышечной и оральной вакцинации, соответственно (Song et al., 2007). Во всех подробностях генетические изменения, приводящие к аттенуации вируса ЭДС, неизвестны, так как на всем протяжении генома было обнаружено множество модификаций последовательности в 14 различных локусах (Enjuanes et al., 2016; Park et al., 2012; Zuñiga et al., 2016). Четыре из этих модификаций соответствуют делециям длиной 8, 1, 16 или 7 аминокислот в белках nsp3, S, 3 или 7, соответственно. В последовательности одного только S-белка вакцинный вирус накопил 26 модификаций по сравнению с исходным вирусом. Сходным образом, японский аттенуированный штамм Japan 83P-5, полученный после 100 пассажей в клетках Vero, накапливал модификации в 14 позициях последовательности гена S-белка (Zuñiga et al., 2016). Недавно сообщалось о получении аттенуированного вируса из американского вирулентного штамма также путем проведения серии пассажей. Были получены аттенуированные варианты и из штаммов P120 и P160, пассажи проводились как в рожденных методом Кесарева сечения и не получивших молозива поросятах, так и в поросятах обыкновенных (Lin et al., 2017). Уровень репликации P120 и P160 *in vivo* значительно снизился, что было установлено иммуногистопатологическими методами и в ходе анализа выделения вируса в окружающую среду. Интересно, что P120, в отличие от P160 обеспечивал частичную защиту от родительского штамма (PC22A) при заражении (Lin et al., 2017). Полученные результаты напоминают о том, что не следует забывать о шаткой гармонии аттенуации и уровня репликации при создании вакцины. Во всех случаях изменения, приведшие к аттенуации вируса, идентифицированы не были. Применение вакцин этого типа обеспечивает защиту от инфекции, однако живые вакцинные вирусы в прошлом ревертировались к вирулентности при рекомбинации с циркулирующими в поле вариантами (Li et al., 2016). Следовательно, важно идентифицировать те изменения в геноме, что не позволят вирусу снова стать вирулентным.

Встречающиеся в природе аттенуированные штаммы вируса ЭДС как вакцины. После того, как в природе был обнаружен вирус ТГС, обладающий тропизмом в отношении ЖКТ и дыхательной системы, были идентифицированы мутанты данного вируса с обширными делециями – более 200 аминокислот – в последовательности домена S1 S-белка (т.е. 224 АК у европейских штаммов). Данные мутанты получили название респираторных коронавирусов (РКВС) и демонстрировали тропизм в отношении одного только дыхательного тракта (Ballesteros et al., 1997; Sanchez et al., 1992). В случае заражения эти делеционные мутанты не вызывали появления явных клинических признаков, быстро распространялись по воздуху, а их циркуляция в Европе совпала с резким снижением числа случаев ТГС (Enjuanes et al., 1993). По аналогии ожидалось, что существующие в природе аттенуированные варианты вируса ЭДС с обширными делециями (т.е. 194 АК) в домене S1 S-белка индуцируют слабый иммунный ответ к

вирусу и смогут обеспечить защиту от ЭДС. На практике оказалось, что инокуляция животных S-Indel штаммами обеспечивала частичную перекрестную защиту поросят при последующем заражении высоковирулентным штаммом вируса ЭДС, то есть низковирулентные S-Indel штаммы смогут со временем лечь в основу нового поколения вакцин против ЭДС (Goede and Morrison, 2016; Goede et al., 2015; Lin et al., 2015). Тем не менее эти полевые делеционные мутанты не утрачивали тропизма в отношении ЖКТ, и для них не было показано снижение числа случаев ЭДС в регионах, где эти низковирулентные варианты циркулировали. Эффективное предотвращение этими штаммами распространения ЭДС скорее займет много времени, так как эти варианты должны сначала стать персистентными в поле, чтобы обеспечить надлежащий уровень защиты в хозяйствах.

В Европе и Китае сообщали о вирусах, появившихся как рекомбинанты вирусов ТГС и ЭДС (Akimkin et al., 2016; Boniotti et al., 2016), которые обладали пониженной патогенностью по сравнению с циркулирующими в Китае и США вирулентными штаммами, однако пригодность данных рекомбинантов для производства вакцин все еще предстоит установить.

Векторные вакцины. Недавно появилась новая вакцина, для приготовления которой использовался парамиксовирусный вектор, экспрессирующий S-белок вируса ЭДС (Hain et al., 2016). Ген S-белка встраивался в генный локус ORFV121, где закодированы некоторые факторы вирулентности и иммуномодуляторной активности, вследствие чего происходила аттенуация вируса. Данный рекомбинантный вирус стимулировал выработку иммуноглобулинов IgG и IgA, обладающий сродством к S-белку. Рекомбинантный вирус стабильно экспрессировал S-белок вируса ЭДС и обеспечивал значительный уровень защиты от инфекции, что было заметно на основании клинической картины. Тем не менее индукцию защитного иммунитета все еще предстоит оценить. Векторные вакцины интересны высоким уровнем экспрессии белков, то есть потенциалом к индукции сильного иммунного ответа.

Рекомбинантные вакцины на основе РНК-репликонов. Недавно была разработана вакцина на основе РНК-репликона вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) (Mogler et al., 2014). Вектор обладает тропизмом в отношении дендритных клеток и способствует формированию иммунного ответа, при котором сбалансированы три его основные составляющие: врожденный, гуморальный и клеточный иммунитет. РНК репликона состоит из неструктурных генов вируса ВЭЛ, за которыми следует ген S-белка вируса ЭДС. Репликонные частицы получают из клеток Vero, подвергшихся трансфекции данной РНК, сбор частиц осуществляется через 24 часа или ранее. Таким образом получается одноцикловая вакцина, содержащая РНК-репликон. У вакцинированных животных вырабатывались вируснейтрализующие антитела, специфичные к S-белку. Вакцинация наивных свиноматок и свинок вакциной на основе РНК-репликона защищала 80% родившихся от них поросят-сосунов (Mogler et al., 2014). Использование вакцины безопасно непосредственно перед опоросом, риск реверсии к вирулентности отсутствует.

Вакцина на основе репликаона альфавирусного происхождения была первым препаратом для защиты от ЭДС, условно сертифицированным в США (AVMA, 2014; Crawford et al., 2016; Kim et al., 2016).

Вакцины на основе вирусов, способных к репликации, но не к размножению. В прошлом мы сообщали о том, что делеция гена белка Е в геноме вируса ТГС приводила к появлению вируса, способного к репликации, но неспособного к размножению, то есть “одноциклового вируса”, который не мог проникать в соседние клетки, следовательно был в высшей степени безопасен, низким был и риск реверсии к вирулентности (Ortego et al., 2002). В отсутствие белка Е вирусные частицы получались незрелыми, но высокоиммуногенными. Сходным образом, в нашей лаборатории было показано, что удаление Е-белка у вируса MERS-CoV также давало вирус, неспособный распространяться в тканях, который следовательно мог лечь в основу вакцины-кандидата [REF. mBio MERS-CoV cDNA] (J. Gutierrez, I. Sola and L. Enjuanes, 2017, неопубликованные данные). В обоих случаях поставка белка Е in trans позволяла получить “одноциклового” вирус ТГС или MERS-CoV, при заражении которого будет обеспечена высокая доза антигенов, а сами вирусы исчезнут. Такие “вирусы-самоубийцы” также могут лечь в основу безопасных вакцин. В силу сходства вирусов ТГС и ЭДС мы предполагаем, что для защиты от ЭДС подобные вакцин также подойдут.

Вакцины на основе рекомбинантных живых аттенуированных вирусов. Важным прорывом в области создания живых аттенуированных вакцин стало конструирование инфекционных кДНК клонов. В основу разработки нового поколения вакцин против ЭДС может лечь сочетание подходов обратной генетики, позволяющих удалить из вирусного генома различные участки для понимания их роли в аттенуации вируса, и результатов исследований взаимодействия вируса с хозяином для идентификации генов, отвечающих за модуляцию иммунного ответа. Удаление генов, кодирующих последовательности белков, которые угнетают различные пути врожденного иммунного ответа (например, выработку интерферона гамма), действительно позволяет получить аттенуированный вирус, а значит, в потенциале и вакцину-кандидат.

В настоящее время известно несколько инфекционных кДНК-клонов, которые могли бы лечь в основу штаммов вируса ЭДС с заданными генетическими свойствами для дальнейшей разработки вакцин (Beall et al., 2016; Fan et al., 2017; Jengarn et al., 2015). Jengarn и коллегами был создан кДНК-клон полной последовательности генома вируса путем сборки соседних участков кДНК-фрагментов в бактериальной искусственной хромосоме по методу, описанному командой нашей лаборатории (Almazan et al., 2000; Almazan et al., 2015). С целью упростить спасение рекомбинантного вируса из инфекционного кДНК-клона предварительно были созданы клетки VeroE6, стабильно экспрессирующие свиную аминопептидазу N (pAPN). Интересно, что и исходный, и созданный методами инженерии вирус ЭДС имел делецию в С-терминальной области гена S-белка, вследствие чего оказался нарушен стартовый кодон ORF3. После восстановления функциональной последовательности ORF3 спасение рекомбинантного вируса уже не

удавалось, то есть, возможно, продукт экспрессии ORF3 подавляет экспрессию вируса *in vitro*.

Другой инфекционный клон кДНК вируса ЭДС (icPEDV) успешно реплицировался и в клеточной культуре, и в организме свиней, приводя к летальному исходу *in vivo* (Beall et al., 2016). Рекомбинантный вирус ЭДС также был получен путем элиминации гена ORF3 с последующей его заменой на ген красного флуоресцентного белка. Данный вирус эффективно реплицировался *in vitro* и *in vivo*, однако показатели диареи у свиней в этом случае были ниже, чем при заражении полевым штаммом или icPEDV. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что делеционный мутант с отсутствующим геном ORF3 является частично аттенуированным и, вероятно, может использоваться для разработки вакцин.

Третий описанный кДНК клон вируса ЭДС был получен из китайского вирулентного изолята AH2012/12 (Fan et al., 2017). Рекомбинантный вирус, полученный из кДНК, был фенотипически идентичен родительскому штамму и при заражении вызывал гибель 100% поросят-сосунов.

В нашей лаборатории был сконструирован инфекционный кДНК клон вирулентного вируса ЭДС из полученного в США изолята с использованием нашей системы на основе искусственных бактериальных хромосом, которая уже была описана в прошлом (Almazan et al., 2000; Almazan et al., 2015). В настоящее время идет работа над вакциной-кандидатом путем встраивания в них комбинации различных модифицированных участков генома, с целью получения аттенуированных и генетически стабильных вирусов (A. Pascual-Iglesias, C. Sanchez, I. Sola, and L. Enjuanes and S. Zuñiga, in progress).

Стратегии аттенуации рекомбинантных вирусов ЭДС для создания вакцин. Существует множество стратегий, применение которых способно в потенциале привести к созданию новых аттенуированных вакцинных вирусов, в том числе: 1) делеция генов, кодирующих факторы вирулентности, таких, как белки, противодействующие механизмам врожденного иммунитета хозяина, 2) деоптимизация кодонов, 3) “запутывание” генов (gene scrambling), 4) снижение уровня репликации вируса, 5) модификация сродства вируса к тем или иным тканям и многие другие. Такие методы представляются многообещающими и могут в будущем помочь создать аттенуированные вирусы ЭДС, реплицирующиеся в ЖКТ свиней, не вызывая появления клинических признаков заболевания. Трудность заключается в том, что потребуется оценка некоего количества рекомбинантных вирусов, уже обладающих чертами аттенуированных разными способами штаммов, и необходимо будет достичь баланса между аттенуацией и генетической стабильностью.

В геномах многих вирусов существуют последовательности белков, способных модулировать механизмы врожденного иммунитета, которые для защиты от патогенов активируются в первую очередь. Заражение вирусом ЭДС ингибирует синтез

интерферонов в ряде клеточных линий, например, обезьяньих MARC-145 или свиных ИЕС (Cao et al., 2015a; Zhang et al., 2016). С (Cao et al., 2015; Zhang et al., 2016). Идентификация вирусных белков, отвечающих за модуляцию механизмов врожденного иммунитета, и их элиминация может повлиять на патогенные свойства получившегося вируса, что позволит получить биологически безопасные аттенуированные делеционные мутанты. Было продемонстрировано, что при заражении вирулентным штаммом вируса наблюдается более высокий уровень активации фактора NF-κB и синтеза провоспалительных цитокинов по сравнению с заражением аттенуированным штаммом, близким к вакцинным (Guo et al., 2016). Сообщалось, что репликаза вируса ЭДС, неструктурные белки nsp1, nsp3, nsp5, nsp7, nsp14, nsp15 и nsp16, вспомогательный белок 3, а также структурные белки Е, М и N являются антагонистами интерферонов (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2016). Делеция генов белков, не обязательных для жизнеспособности вируса и обладающих антагонистической активностью в отношении индукции синтеза интерферонов, вероятно, также приведет к возникновению аттенуированных мутантов, которые потенциально смогут использоваться при разработке вакцин.

Также существуют стратегии аттенуации вируса ЭДС для создания вакцин-кандидатов, которые требуют множественных изменений в последовательности генома для предотвращения реверсии к вирулентности.

БИБЛИОГРАФИЯ

Akimkin, V., Beer, M., Blome, S., Hanke, D., Hoper, D., Jenckel, M., Pohlmann, A., 2016. New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1314-1315.

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.

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.

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

Ballesteros, M.L., Sanchez, C.M., Enjuanes, L., 1997. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* 227, 378-388.

- 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, e01451-01415.
- Belsham, G.J., Rasmussen, T.B., Normann, P., Vaclavek, P., Strandbygaard, B., Botner, A., 2016. Characterization of a novel chimeric swine enteric coronavirus from diseased pigs in Central Eastern Europe in 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 595-601.
- 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. *Virology* 500, 50-61.
- 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.
- Crawford, K., Lager, K.M., Kulshreshtha, V., Miller, L.C., Faaberg, K.S., 2016. Status of vaccines for porcine epidemic diarrhea virus in the United States and Canada. *Virus Res.* 226, 108-116.
- 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.
- Diep, N.V., Norimine, J., Sueyoshi, M., Lan, N.T., Yamaguchi, R., 2017. Novel porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) variants with large deletions in the spike (S) gene coexist with PEDV strains possessing an intact S gene in domestic pigs in Japan: A new disease situation. *PLoS One* 12, e0170126.
- Enjuanes, L., 2015. Emerging viruses: coronaviruses and ebola virus, V International Veterinary Congress. Russian Veterinary Association, Moscow, Russia.
- Enjuanes, L., Pascual-Iglesias, A., Sanchez, C.M., Zaberezhny, A.D., Sola, I., Zuñiga, S., 2016. Porcine gastroenteric viruses: pathogenesis and protection. *Veterinaria i Kormlenie* 5, 4-19.
- Enjuanes, L., Sanchez, C., Gebauer, F., Mendez, A., Dopazo, J., Ballesteros, M.L., 1993. Evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 35-42.
- Fan, B., Yu, Z., Pang, F., Xu, X., Zhang, B., Guo, R., He, K., Li, B., 2017. Characterization of a pathogenic full-length cDNA clone of a virulent porcine epidemic diarrhea virus strain AH2012/12 in China. *Virology* 500, 50-61.
- 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.
- Guo, X., Hu, H., Chen, F., Li, Z., Ye, S., Cheng, S., Zhang, M., He, Q., 2016. iTRAQ-based comparative proteomic analysis of Vero cells infected with virulent and CV777 vaccine strain-like strains of porcine epidemic diarrhea virus. *J. Proteomics* 130, 65-75.
- Hain, K.S., Joshi, L.R., Okda, F., Nelson, J., Singrey, A., Lawson, S., Martins, M., Pillatzki, A., Kutish, G.F., Nelson, E.A., Flores, E.F., Diel, D.G., 2016. Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus. *J. Gen. Virol.* 97, 2719-2731.
- Hanke, D., Jenckel, M., Petrov, A., Ritzmann, M., Stadler, J., Akimkin, V., Blome, S., Pohlmann, A., Schirrmeyer, 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.
- 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, e00737-00713.
- 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.
- 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., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet. J.* 204, 134-143.
- 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.
- Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M., Tobler, K., 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 23, 137-144.
- 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., 2015. 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., Hou, Y., Marthaler, D., Gao, X., Liu, X., Zheng, L., Saif, L.J., Wang, Q., 2017. Attenuation of an original US porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A via serial cell culture passage. *Vet. Microbiol.* 201, 62-71.
- Lin, C.M., Saif, L.J., Marthaler, D., Wang, Q., 2016. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains. *Virus Res.* 226, 20-39.
- Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K., Rovira, A., 2014. Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1347-1350.
- Masuda, T., Murakami, S., Takahashi, O., Miyazaki, A., Ohashi, S., Yamasato, H., Suzuki, T., 2015. New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs. *Arch. Virol.* 160, 2565-2568.
- Mogler, M.A., Gander, J.R., Ray, D.L., Harris, D.L., 2014. Vaccination of PEDV-naive dams with replicon RNA particle vaccine protects suckling piglets from challenge, The 2014 North American PRRS Symposium, Chicago, USA.
- 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., Kim, S., Song, D., Park, B., 2014. Novel porcine epidemic diarrhea virus variant with large genomic deletion, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 2089-2092.
- 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.
- Sanchez, C.M., Gebauer, F., Suñe, C., Mendez, A., Dopazo, J., Enjuanes, L., 1992. Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology* 190, 92-105.
- 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.S., Oh, J.S., Kang, B.K., Yang, J.S., Moon, H.J., Yoo, H.S., Jang, Y.S., Park, B.K., 2007. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain. *Res. Vet. Sci.* 82, 134-140.
- Suzuki, T., Shibahara, T., Yamaguchi, R., Nakade, K., Yamamoto, T., Miyazaki, A., Ohashi, S., 2016. Pig epidemic diarrhoea virus S gene variant with a large deletion nonlethal to colostrum-deprived newborn piglets. *J. Gen. Virol.* 97, 1823-1828.
- Theuns, S., Conceicao-Neto, N., Christiaens, I., Zeller, M., Desmarests, L.M., Roukaerts, I.D., Acar, D.D., Heylen, E., Matthijssens, 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, e00506-00515.

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., 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 917-919.

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.

Zuñiga, S., Pascual-Iglesias, A., Sanchez, C.M., Sola, I., Enjuanes, L., 2016. Virulence factors in porcine coronaviruses and vaccine design. *Virus Res.* 226, 142-151.