

ГЛАВА 3.8.10

ТРАНСМИССИВНЫЙ ГАСТРОЭНТЕРИТ

РЕЗЮМЕ

Трансмиссивный гастроэнтерит (ТГ) – кишечное заболевание свиней, возбудителем которого является вирус трансмиссивного гастроэнтерита (ВТГ), входящий в семейство Coronaviridae. С 1984 года во многих частях света распространился самостоятельный респираторный вариант (респираторный коронавирус свиней, или РКС). Этот вирус считается вероятным делеционным мутантом ВТГ. РКС, судя по всему, не представляет значимости как возбудитель, но он вносит свой вклад в комплекс заболеваний органов дыхания у свиней и сильно усложняет диагностику ТГ, особенно серологическими методами. Лабораторная диагностика заключается в обнаружении вируса, вирусных антигенов или вирусной нуклеиновой кислоты в материале, полученном от подозреваемых случаев, или в обнаружении вирусспецифичных гуморальных антител.

Идентификация возбудителя: *Вирус может быть идентифицирован путем выделения его на тканевой культуре, электронной микроскопией, различными иммунодиагностическими тестами и по специфической вирусной РНК (этот метод появился недавно). Наиболее распространенными в практике оперативными исследованиями, вероятно, являются иммунодиагностические: в частности, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) фекалий и реакция иммунной флюоресценции криостатических срезов кишечника. Другое кишечное заболевание, эпидемическая диарея свиней, вызывается серологически отличным коронавирусом, который, однако, обладает идентичными внешними признаками под электронным микроскопом. С диагностической точки зрения иммуноэлектронная микроскопия позволяет избежать такой проблемы.*

Серологические реакции: *Наиболее широко используемыми методами являются реакции вирусной нейтрализации и твердофазный ИФА. Дифференциация от РКС возможна только в последнем случае, поскольку для ВТГ и РКС характерна полная перекрестная нейтрализация.*

Требования к вакцинам и биологическим препаратам для диагностики: *Коммерческие биологические препараты не представлены в международном масштабе. Однако некоторые страны практикуют вакцинацию, и в Соединенных Штатах Америки были выданы лицензии, разрешающие производство и реализацию моновалентной и комбинированной вакцин.*

А. ВВЕДЕНИЕ

Трансмиссивный гастроэнтерит (ТГ) – кишечное заболевание свиней, возбудителем которого является вирус трансмиссивного гастроэнтерита (ВТГ), входящий в семейство *Coronaviridae*. С 1984 года во многих частях света распространился

самостоятельный респираторный вариант (респираторный коронавирус свиней или РКС), и на настоящий момент он обнаружен во многих странах, где проводился его мониторинг, за исключением Океании. Случаи ТГ стали более спорадическими. Сообщения о заболевании продолжают поступать эпизодически из частей Европы, Северной Америки и Азии. ВТГ размножается в энтероцитах, выстилающих тонкий кишечник, и, разрушая их, вызывает атрофию ворсинок и энтерит. У свиней всех возрастов возникает диарея и рвота; наиболее высокий уровень смертности отмечается у новорожденных поросят. За пределами кишечника вирус размножается в дыхательных путях и в тканях молочной железы (Kemeny *et al.*, 1975), однако легче всего его удается выделить из кишечного тракта и фекалий. РКС, наоборот, легче всего выделяется из верхних дыхательных путей, трахеи, миндалин или легких и в небольшой степени размножается в кишечнике (Cox *et al.*, 1990; O'Toole *et al.*, 1989; Pensaert *et al.*, 1986), при этом РКС может обнаруживаться гнездовой полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ПЦР ОТ) в смывах носовой полости и в фекалиях свиней, инфицированных РКС (Costantini *et al.*, 2004). РКС, вероятно, является делеционным мутантом ВТГ (Rasschaert *et al.*, 1990), что подтверждается последними полученными данными о сравнении полных, состоящих из 30 тысяч оснований, геномных последовательностей штаммов ВТГ и РКС (Zhang *et al.*, 2007).

Поскольку ТГ – контагиозное заболевание, которое может развиваться в форме вспышечной эпизоотии, быстрые диагностические методы его подтверждения приобретают особую значимость. Заболевание также может принимать форму эндемической проблемы низкочастотной послеотъемной диареи, которую сложнее диагностировать. Появление ВТГ в иммунных к РКС стадах также обуславливает более легкие и спорадические клинические случаи ТГ, впоследствии усложняющие диагностику ТГ при таком сценарии (Kim *et al.*, 2000b).

Высказано предположение о возможном существовании резервуаров ВТГ среди диких и домашних животных. Дикая и домашняя плотоядные (лисы, собаки, возможно, норка) и кошки сероконвертированы к ВТГ и, как предполагается, являются потенциальными субклиническими носителями ВТГ, выполняя функцию резервуаров между сезонными (зимними) эпидемиями. Однако только у вируса, выделяемого собаками, которых многократно инфицировали ВТГ, была подтверждена вирулентность для свиней (Saif & Sestak, 2006). Учитывая генетическую и антигенную схожесть, выдвинуто предположение, что ВТГ, РКС, коронавирусы кошачьих и псовых являются видоспецифичными мутантами коронавируса-предшественника. Дикая птица (*Sturnus vulgaris*) и муха (*Musca domestica*) предложены как механические векторы ВТГ, выделяющие вирус в течение 32–72 часов, соответственно (Saif & Sestak, 2006).

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

1. Идентификация возбудителя

Вирус может быть идентифицирован путем выделения его на тканевой культуре (Dulac *et al.*, 1977), иммунофлюоресцентными методами, реакцией обратной пассивной гемагглютинации, твердофазными иммуноферментными анализами (твёрдофазными ИФА), радиоиммунным анализом (РА), гибридизацией с ДНК-

зондами, электронной микроскопией и по специфической вирусной РНК (этот метод появился недавно; Enjuanes & Van der Zeijst, 1995; Kim *et al.*, 2000a; Paton *et al.*, 1997; Saif & Sestak, 2006; Sirinarumitr *et al.*, 1996; Woods, 1997). Такие молекулярные методы, как ПЦР ОТ и гнездовая ПЦР ОТ, разработанные в последние несколько лет, повысили чувствительность и специфичность обнаружения и дифференциации ВТГ и РКС непосредственно в полевых образцах (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000a; 2000b; Paton *et al.*, 1997). Альтернативным диагностическим методом, который был рекомендован для лабораторий с дефицитом площадок для специализированных тестов, является пероральное введение восприимчивым, сероотрицательным по ВТГ/РКС пороссятам подозреваемого содержимого кишечника. Однако лабораторные тесты по-прежнему требуют подтверждения восприимчивости свиней перед заражением, а также подтверждения того, что любое заболевание, вызванное у этих животных, является ТГ. Наиболее распространенными в практике оперативными исследованиями, вероятно, являются иммунодиагностические: в частности, твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) фекалий (Bernard *et al.*, 1986; Lanza *et al.*, 1995; Van Nieuwstadt *et al.*, 1988b), реакция иммунной флюоресценции (РИФ) криостатических срезов кишечника (Pensaert *et al.*, 1968), а также иммуногистохимический анализ (ИА) фиксированных в формалине парафиновых срезов (Shoup *et al.*, 1996). Было описано также обнаружение вируса реакцией обратной пассивной гемагглютинации (Asagi *et al.*, 1986). Другое кишечное заболевание, эпидемическая диарея свиней (ЭДС), вызывается серологически отличным коронавирусом, который, однако, обладает идентичными внешними признаками под электронным микроскопом. С диагностической точки зрения иммуноэлектронная микроскопия позволяет избежать такой проблемы (Saif *et al.*, 1977; Van Nieuwstadt *et al.*, 1988a), как и применение методов обнаружения, вирусспецифичных для ЭДС (Kim *et al.*, 2001).

1.1. Выделение вируса на тканевой культуре

Это наиболее точный метод диагностики, наряду с заражением живых поросят (Dulac *et al.*, 1977). Однако он долог и трудозатратен для рутинного применения. ВТГ плохо растет в клеточной культуре, что делает указанный метод непригодным для рутинной диагностической практики. Кроме того, выделение ВТГ от свиней в сероположительных по РКС стадах также сопряжено с проблемами и нередко требует помещения сероотрицательных по ВТГ/РКС свиней, которые служат индикатором, в подозреваемое стадо с последующим сбором образцов от свиней-индикаторов для выделения или обнаружения ВТГ (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000b). РКС можно выделить на тканевой культуре, применяя типы клеток и методики, аналогичные таковым для ВТГ, и клетки или жидкости носовой полости, а также ткани или гомогенаты трахеи, миндалин или легких в качестве оптимальных образцов (Costantini *et al.*, 2004; Pensaert *et al.*, 1986).

Попытки выделить ВТГ обычно предпринимаются до смертельного исхода (из фекалий) или посмертно (из тонкого кишечника). Наиболее предпочтительны в качестве образцов петли пораженного тонкого кишечника, лигированные с двух концов, чтобы сохранить содержимое, или маски-отпечатки слизистой оболочки просветной поверхности тонкого

кишечника. Поскольку вирус термоллабилен, все образцы должны быть свежими или охлажденными.

Исследуемый материал гомогенизируют в питательной среде клеточной культуры или фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР) со значением pH 7,2, содержащем антибиотики, например, пенициллин (1000 Ед./мл), дигидрострептомицин (1000 Ед./мл) и микостатин (20 Ед./мл), с получением 10% суспензии. Полученную суспензию оставляют на 30 минут в местах, защищенных от воздействия прямых солнечных лучей, при комнатной температуре. Затем ее подвергают ультразвуковой обработке и освещают низкоскоростным центрифугированием. Надосадочную жидкость можно смешать с равным объемом сыворотки крови крупного рогатого скота, инактивированной нагреванием (такая обработка позволяет снизить цитотоксический эффект материала). После этого ее используют для инокуляции восприимчивых клеточных культур, например, первичных или вторичных монослоев клеток почек поросят 3–4-дневного возраста. Для первичного выделения вируса можно также использовать другие культуры клеток низкого пассажа свиного происхождения (такие, как клетки щитовидной железы и семенника) и некоторые клеточные линии (Honda *et al.*, 1990; McClurkin & Norman, 1966). После инкубации при температуре 37°C в течение 1 часа клеточные пласты покрывают такой питательной средой, как сбалансированный солевой раствор Эрла с дрожжевой вытяжкой и гидролизатом лактальбумина (EYL), содержащий натрия бикарбонат и антибиотики, например, пенициллин (100 Ед./мл), дигидрострептомицин (100 мкг/мл) и микостатин (20 Ед./мл), и 1% фетальной телячьей сыворотки крови. Включение трипсина в питательную среду культуры может улучшить первичное извлечение вируса (Bohl, 1979; Honda *et al.*, 1990). Параллельно готовят контрольные культуры без инокуляции, и все культуры инкубируют при температуре 37°C.

Вирусное цитопатическое действие (ЦД) может наблюдаться через 3–7 дней. Он характеризуется округлением, увеличением клеток, образованием синцития и высвобождением в питательную среду. Образование бляшек в некоторых случаях служит более надежным и легким способом распознавания. Покрытие, наиболее подходящее для выявления бляшек – 2-кратная минимальная поддерживающая среда с 1,6% очищенного агара, 1% NaCO₃, антибиотиками (указаны выше), 0,7% нейтрального красного и 1% ДЭАЭ (диэтиламиноэтила; 100 мкг/мл). Дикий тип ВТГ плохо растет на тканевой культуре, поэтому для того, чтобы эти характерные изменения стали четкими, может понадобиться несколько субпассажей. Принадлежность цитопатических изолятов к ВТГ подлежит подтверждению иммуноокрашиванием или реакцией нейтрализации *in vitro* с использованием соответствующей, специфичной к ВТГ, антисыворотки (Bohl, 1979). При наличии подходящих моноклональных антител (МА) их можно использовать для дифференциации ВТГ и РКС методами иммуноокрашивания (Garwes *et al.*, 1988; Simkins *et al.*, 1992). Дифференциация ВТГ и РКС может также быть дополнена специфичными для ВТГ кДНК-зондами (Bae *et al.*, 1991), или избирательной ПЦР ОТ, или гнездовой ПЦР ОТ (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000a; 2000b; Paton *et al.*, 1997).

1.2. Реакция иммунной флюоресценции для вирусных антигенов

Реакция иммунной флюоресценции – быстрый, чувствительный и специфичный способ идентификации антигенов вируса ТГ в криостатических срезах кишечника. Требуются свежие трупы свиней; кроме того, оптимально, если возраст животного составляет менее 4 недель (предпочтительно менее 1 недели), а клинические признаки заболевания только манифестировали (другими словами, не позднее 24–28 часов от заражения). В пределах 30 минут от наступления смерти из четырех разных участков задней части тонкого кишечника берут фрагменты длиной по 2 см. От них отрезают фрагменты длиной по 5–10 мм для мгновенного замораживания твердым СО₂. Правильное направление материала важно для того, чтобы обеспечить впоследствии при нарезке микротомом-криостатом получение истинных поперечных срезов. Срезы толщиной 6 мкм помещают на предметные стекла, сушат на воздухе и фиксируют ацетоном. Альтернативная и более оперативная процедура предполагает отбор и продольное вскрытие участка дистальной части тонкого кишечника, осторожную промывку слизистой поверхности ФСБР и подготовку мазков-отпечатков просветной поверхности кишечника на очищенных этанолом предметных стеклах с последующей сушкой воздухом и фиксацией ацетоном (Bohl, 1979). Предметные стекла затем обрабатывают и окрашивают как криостатические срезы из представленного ниже описания. Зафиксированные положительные и отрицательные контрольные срезы или мазки хранят при температуре -20°C для параллельного окрашивания. После промывки трис-буфером со значением рН 8,7 или ФСБР срезы окрашивают разбавленным раствором антитела к ВТГ, конъюгированного с флюоресцина изотионатом (ФИ), и помещают во влажный термостат при температуре 37°C на 30 минут. Любой несвязанный краситель удаляется промывкой трис-буфером. По желанию срезы докрашиваются разведением 10⁻⁵ синего Эванса в трис-буфере и помещаются в глицерин.

Окрашенные срезы или мазки исследуются микроскопией в ультрафиолетовом свете как можно быстрее. Качество окрашивания определяют по сравнению с контролями. Точность интерпретации зависит от сохранения структуры ворсинок эпителиальных клеток, которые оцениваются на интрацитоплазматическую флюоресценцию.

Пероксидазно-антипероксидазный иммуногистохимический метод для обнаружения ВТГ был разработан для того, чтобы обнаруживать ВТГ и РКС как в замороженных, так и фиксированных в формалине, залитых в парафин тканях (Jean *et al.*, 1987; Shoup *et al.*, 1996). Применение иммуногистохимического анализа в случае фиксированных в формалине тканей предпочтительнее, поскольку он может выполняться как проспективно, так и ретроспективно по одним и тем же фиксированным в формалине тканям, которые используются для патогистологического исследования, и фиксированные ткани или препараты легче транспортировать, так как они стабильны и не содержат живой вирус (Shoup *et al.*, 1996).

1.3. Обнаружение антигенов вируса в фекалиях твердофазным иммуноферментным анализом

Может использоваться система типа «сэндвич» на основе двух антител: например, с захватывающим моноклональным антителом и поликлональным, связанным с ферментом детекторным антителом (Lanza *et al.*, 1995; Sestak *et al.*, 1996). Этот анализ базируется на захвате вирусного антигена из образца фекалий тремя моноклональными антителами, двумя специфичными к белку S (сайт A и D) и одним специфичным к нуклеопротеину N (Lanza *et al.*, 1995; Sestak *et al.*, 1996). Отрицательное покрытие используется в качестве контроля специфичности анализа; оно состоит из антител, выделенных из асцитической жидкости мышей после введения им клеток миеломы SP2/0, которые не распознаются ВТГ. Моноклональные антитела наносятся на 96-луночные микропланшеты в бикарбонатном буферном растворе со значением pH 9,6 и инкубируются в течение ночи при температуре 37°C. Для анализа всех образцов предусмотрены две лунки: в одной содержится положительное покрытие (моноклональные антитела к ВТГ), а в другой – отрицательное. Образцы фекалий разбавляют питательной средой клеточной культуры (1/10), перемешивают на вихревой мешалке и центрифугируют на низкой скорости (2000 g) в течение 15 минут. Затем надосадочную жидкость сливают в стерильные пробирки и подвергают анализу или направляют на хранение в замороженном состоянии. Перед добавлением подготовленных образцов фекалий планшеты дважды промывают промывочным буферным раствором (ФСБР, содержащий 0,05% полисорбата 20). Планшеты инкубируют в течение ночи при температуре 37°C. После четырехкратной промывки сыворотку крови с биотинилированными поликлональными антителами к ВТГ добавляют в ФСБР, содержащий 0,05% полисорбата 20. Планшеты инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа. Планшеты промывают четыре раза перед добавлением конъюгата (стрептавидин, меченный пероксидазой хрена) и инкубируют при температуре 37°C в течение 1 часа. Планшеты промывают шесть раз перед добавлением субстрата фермента, АВТС (2,2'-азиноди-[3-этил-бензотиазолин]-6-сульфоновой кислоты), с 0,03% H₂O₂ в 0,1 М цитратном буферном растворе со значением pH 4,2. Реакцию останавливают через 30 минут при комнатной температуре добавлением 5% раствора натрия додецилсульфата и определяют оптическую плотность в считывающем устройстве для твердофазного ИФА при 405 нм. Отрицательные и положительные по ВТГ образцы фекалий вносят на каждый планшет.

1.4. Методы распознавания нуклеиновой кислоты

Были описаны методы *in situ* гибридизации (IHS) и ПЦР ОТ для прямого обнаружения ВТГ в клинических образцах, с дифференциацией от РКС (Kim *et al.*, 2000a; Paton *et al.*, 1997; Sirinarumitr *et al.*, 1996). Второй раунд гнездовой ПЦР может значительно улучшить чувствительность (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000a; 2000b; Paton *et al.*, 1998). Дифференциация вирусов ТГ может быть проведена путем определения продуктов ПЦР, полученных с помощью ферментов рестрикционных эндонуклеаз (Woods, 1997), или секвенированием (Costantini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2000b; McGoldrick *et al.*, 1999; Paton & Lowings, 1997; Zhang *et al.*, 2007). Дуплексная ПЦР ОТ для

сочетанной детекции ВТГ и вируса эпидемической диареи свиней не описана (Kim *et al.*, 2001).

2. Серологические реакции

Серологические реакции могут иметь диагностическое значение в том случае, если они способны выявить рост титров антител. Кроме того, диагностическую значимость приобретает единичный сероположительный результат, если он получен в популяции, ранее считавшейся серонегативной. Поскольку вероятность приобретения свиньями статуса носителя вируса удается снизить путем принятия только серонегативных животных, серологические исследования также обычно являются непременным условием импорта.

Антитела к вирусу можно обнаружить в сыворотке крови через 6–7 дней после инфицирования ВТГ или РКС, и эти антитела сохраняются как минимум многие месяцы. Хотя антитела к РКС и ВТГ обеспечивают полную нейтрализацию каждого из вирусов, существуют различия в специфичности некоторых антител, не осуществляющих нейтрализацию (non-neutralising antibodies; Callebaut *et al.*, 1988; Enjuanes & Van der Zeijst, 1995; Garwes *et al.*, 1988; Saif & Sestak, 2006; Simkins *et al.*, 1992), поскольку у РКС отсутствуют определенные эпитопы, имеющиеся у ВТГ. Несмотря на это, реакция вирусной нейтрализации (ВН) не является практическим методом дифференциации инфекции, вызванной РКС и ВТГ. В конкурентный твердофазный ИФА можно включить моноклональные антитела к этим участкам, чтобы обнаруживать в сыворотке крови антитела, специфичные исключительно к ВТГ. При том, что такие методы надежны в части того, что они не дают ложноположительных результатов с антисывороткой к РКС, возможно получение ложноотрицательных результатов из-за более низкой чувствительности в сравнении с реакцией нейтрализации, а также из-за межштаммовой вариабельности вируса ТГ: определенные моноклональные антитела к ВТГ могут оказаться неспособными распознавать все штаммы (Brown & Paton, 1991; Simkins *et al.*, 1992). Проблема нечувствительности может быть снижена посредством использования тестов на групповом или стадном уровне. При оценке животных, предназначенных на экспорт, такие твердофазные ИФА на основе моноклональных антител являются методом выбора для дифференциации РКС и ВТГ.

Стоит отметить, что использование таких тестов для дифференциальной диагностики менее чем через 3 недели после воздействия РКС дает нестабильные и ненадежные результаты (Sestak *et al.*, 1999b). Более точные результаты были также получены при исследовании парных образцов сыворотки крови (взяты в острый период и период выздоровления) и при использовании рекомбинантного белка spike (S) ВТГ в качестве покрывающего антигена вместо инфицированных иммобилизованных клеток семенника хряка (Sestak *et al.*, 1999b).

2.1. Тесты для определения вируса трансмиссивного гастроэнтерита/респираторного коронавируса свиней

Эти тесты позволяют обнаруживать антитела как к ВТГ, так и к РКС, и включают в себя реакцию ВН, непрямой твердофазный ИФА (Hohdatsu *et al.*, 1987; Huang *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 2001; McGoldrick *et al.*, 1999; Rukhadze *et al.*, 1989) и конкурентный твердофазный ИФА на основе группоспецифичных

моноклональных антител к ВТГ и РКС (Paton *et al.*, 1991).

Реакция ВН может выполняться с использованием разных типов клеток и вирусных штаммов. Обычно используют такие клеточные линии, как клетки семенников хряка (McClurkin & Norman, 1966) или первичные или перевиваемые клетки почек свиньи. Указанные тесты очень широко применяются многие годы и общепризнаны стандартными: оценка новых методов выполняется в сравнении с ними. Обычно ставят реакцию ВН с оценкой уменьшения числа бляшек. Для нее используются монослой клеток семенников хряка в 6-луночных пластмассовых планшетах и аттенуированный штамм Purdue ВТГ (Bohl, 1979). В модифицированном методе Витте (Witte, 1971), описанном ниже, используются плоскодонные микротитрационные планшеты для тканевой культуры, линия клеток А72, выделенных из опухоли прямой кишки собаки, и полевой штамм вируса, адаптированный для роста в таких клетках: вирус в количестве 100 ТЦД₅₀ (тканевая цитопатическая доза, при которой погибает 50% культуры) инкубируют с инактивированной нагреванием испытуемой сывороткой крови; нейтрализацию определяют по отсутствию ЦД после дальнейшей инкубации с клетками А72 в питательной среде Лейбовица 15 («Сигма», Великобритания), в которую добавлены антибиотики, 10% фетальной телячьей сыворотки крови и 1% L-глутамин. Общий объем реактивов во всех лунках составляет 150 мкл.

2.1.1. Реакция вирусной нейтрализации: методика

- i) Инактивируют сыворотку крови в течение 30 минут на водяной бане при температуре 56°C.
- ii) Выполняют двукратное разведение испытуемой сыворотки крови в питательной среде клеточной культуры, начиная с неразбавленной сыворотки крови (это дает разведение 1/2 на стадии нейтрализации после смешивания с равным объемом раствора вируса). Разведения готовят на 96-луночном плоскодонном микротитрационном планшете для культуры клеток, используя в оптимальном варианте по три лунки на разведение с объемом содержимого каждой лунки 25 мкл. Положительную и отрицательную контрольную сыворотку крови также включают в тест. Стандартная сыворотка отсутствует, но готовят внутренние положительные стандартные образцы с титрованием в соответствующем диапазоне.
- iii) 25 мкл исходного раствора ВТГ добавляют в каждую лунку в таком разведении в питательной среде культуры, которое, исходя из расчетов, обеспечит 100 ТЦД₅₀ в одной лунке. Вирус добавляют в две из трех лунок, содержащих сыворотку крови в каждом разведении. Третья лунка служит контролем исключительно из сыворотки крови: в нее вносят 25 мкл питательной среды культуры вместо вируса.
- iv) Выполняют обратное титрование остаточного вируса в четырех этапах с шагом 10, используя по 25 мкл на лунку и не менее четырех лунок на разведение; 25 мкл питательной среды культуры добавляют во все лунки обратного титрования, чтобы компенсировать отсутствие испытуемой сыворотки.

- v) Планшеты быстро встряхивают, а затем инкубируют в течение 1 часа в атмосфере с содержанием 5% CO при температуре 37°C.
- vi) 100 мкл, например, суспензии клеток A72 в концентрации 2×10^5 клеток в одном мл добавляют в каждую лунку.
- vii) Планшеты инкубируют в течение 3–7 дней в атмосфере с содержанием 5% CO при температуре 37°C; тест может быть успешно проведен, если планшеты инкубируют без CO₂.
- viii) Чтобы определить ЦД, выполняют считывание планшетов под микроскопом. Для признания теста достоверным проверяют результаты обратного титрования раствора вируса (должно быть получено значение 100 ЦПД₅₀ с допустимым диапазоном 50–200 ЦПД₅₀) и контрольной сыворотки крови. Стандартная положительная сыворотка крови должна давать значение в пределах 0,3 единиц по логарифмической шкале с основанием 10 в обе стороны от предварительно установленной величины. Считывание для каждого разведения испытуемой сыворотки крови выполняется по отношению к соответствующему контролю исключительно из сыворотки крови для дифференциации ЦД вируса от обусловленного сывороткой крови цитотоксического эффекта или контаминации.
- ix) Результаты испытуемой сыворотки крови определяют по методу Спирмена-Кербера как разведение сыворотки крови, которое нейтрализовало вирус в 50% лунок.
- x) Отрицательная контрольная сыворотка крови не обеспечивает нейтрализации при самом низком испытуемом разведении (например, неразбавленная сыворотка крови, соответствующая разведению 1/2 на стадии нейтрализации).

2.2. Тесты, специфичные для вируса трансмиссивного гастроэнтерита и позволяющие дифференцировать свиней, инфицированных ВТГ, от свиней, инфицированных РКС

Специфичные для ВТГ тесты – это блокирующий или конкурентный твердофазный ИФА, в котором используются моноклональные антитела, распознающие ВТГ, но не распознающие РКС (Brown & Paton, 1991; Callebaut *et al.*, 1989; Sestak *et al.*, 1999b; Simkins *et al.*, 1992; Van Nieuwstadt & Boonstra, 1991); они являются тестами выбора при оценке животных, предназначенных на экспорт. Испытуемая сыворотка крови от свиней, ранее инфицированных штаммом ВТГ, который распознается моноклональными антителами, будет содержать антитела с эквивалентной специфичностью, способные конкурировать за связывание антигена ВТГ, иммобилизованного на планшетах для твердофазного ИФА. Свиньи, инфицированные РКС, у которого отсутствует уникальный эпитоп ВТГ, не вызовут образования антител к этому эпитопу; таким образом, антитела к РКС не будут конкурировать за связывание специфичных к ВТГ моноклональных антител или блокировать его (Brown & Paton, 1991; Callebaut *et al.*, 1989; Sestak *et al.*, 1999b; Simkins *et al.*, 1992; Van Nieuwstadt & Boonstra, 1991). Антигены для твердофазного ИФА могут быть приготовлены из клеточных лизатов линий клеток почки, которые либо инокулированы штаммами ВТГ, адаптированными к клеточной культуре, либо не подверглись инфицированию. Также в качестве источника антигена использовались

инфицированные или неинфицированные клетки семенников хряка, фиксированные в 80% растворе ацетона, либо антигены могли быть приготовлены из рекомбинантного белка S (rec-S), собранного в растворимой форме из клеточной линии насекомых (Sf9), инфицированной рекомбинантным бакуловирусом, экспрессирующим белок S ВТГ, содержащий четыре основных антигенных сайта (Sestak *et al.*, 1999b; Simkins *et al.*, 1992). Положительные и отрицательные антигены наносят через ряд на микротитрационные планшеты с использованием бикарбонатного буферного раствора со значением pH 9,6. Разбавленную испытуемую сыворотку крови, включая подтвержденный положительный контроль ВТГ и подтвержденный отрицательный контроль ВТГ/РКС, а также подтвержденный положительный контроль РКС (отрицательный в данном тесте, положительный в реакции ВН), добавляют в соответствующие лунки и инкубируют в течение ночи перед последующим добавлением во все лунки разбавленного раствора моноклональных антител. Связанные моноклональные антитела обнаруживают с помощью антитела к мышинным антителам, конъюгированного с пероксидазой, которое индуцирует цветовую реакцию в присутствии соответствующего субстрата. Изменение цветности измеряют с помощью спектрофотометра, и для каждого испытуемого образца окончательный результат – это разница в оптической плотности между лунками с положительным и отрицательным антигеном, выраженная в процентах результата, полученного от отрицательной контрольной сыворотки крови. Пороговое значение, разделяющее отрицательные и положительные результаты теста, должно быть определено в предшествующем исследовании подтвержденной отрицательной и подтвержденной положительной популяций. Существует ряд коммерческих наборов, специфичных для ВТГ. Описанные к настоящему времени тесты на основе гемагглютинации (Labadie *et al.*, 1977; Noda *et al.*, 1987; Shimizu & Shimizu, 1977) были валидированы до появления РКС. Однако они могут быть специфичны для ВТГ, поскольку ВТГ (не РКС), обладает гемагглютинирующими свойствами (Schultze *et al.*, 1996).

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И БИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

В некоторых странах проводится вакцинация против ТГ.

Руководства по производству ветеринарных вакцин представлены в главе 1.1.8 «Принципы производства ветеринарных вакцин». Руководства, приведенные в настоящем документе и в главе 1.1.8, являются универсальными по сути и могут быть дополнены национальными и региональными требованиями.

Был составлен обзор информации об экспериментальной работе или о производственных испытаниях вакцин против ТГ, одобренных к применению в Соединенных Штатах Америки (США), в том числе о возможных ограничениях в практической эффективности и об идеях по разработке оптимальных вакцины против ТГ (Saif, 1993; Saif & Jackwood, 1990; Saif & Sestak, 2006). Несколько производителей получили лицензию на производство вакцин против ТГ в США: как модифицированных живых вакцин, так и инактивированных вакцин. Модифицированные живые вакцины используются для введения внутрь супоросным свиноматкам (формируют пассивный иммунитет), но также были

одобрены для введения внутрь подсосным пороссятам или пороссятам-отъемышам (формируют активный иммунитет). Инактивированные вакцины против ТГ одобрены для парентерального введения супоросным свиноматкам (внутримышечный путь) или подсосным пороссятам либо пороссятам-отъемышам (внутрибрюшинный путь). В целом, согласно оценке в контролируемых экспериментальных условиях и на практике в стадах с ВТГ/РКС, эти вакцины обеспечивают слабовыраженную пассивную защиту от заражения подсосных пороссят ТГ. Несмотря на то, что они неспособны обеспечить надлежащую защиту от эпизоотии ТГ, полученные данные позволяют предположить, что эти вакцины могут быть в некоторой степени эффективны против энзоотии ТГ за счет стимуляции анамнестического гуморального ответа на ВТГ в сыворотке крови и молоке (Saif & Jackwood, 1990; Saif & Sestak, 2006).

Предполагается, что основной причиной неэффективности вакцин против ТГ стала их неспособность стимулировать в молоке выработку секреторных IgA (SIgA) в высоких концентрациях по аналогии с гуморальным ответом в молоке свиноматок с естественной инфекцией ТГ (Saif & Jackwood, 1990; Saif & Sestak, 2006). Кроме того, эти вакцины не обеспечили надлежащей защиты сероотрицательной свиноматки от ТГ: заболевание у свиноматки нередко ведет к отказу от корма, агалактии и неспособности обеспечить пассивную защиту у своих пороссят. Таким образом, модифицированные живые вакцины, возможно, не могут реплицироваться в той степени, которая необходима для формирования защитного иммунитета в кишечнике; потенциальная реверсия их вирулентности в случае применения сероотрицательным новорожденным животным также вызывает беспокойство. Убитые вакцины, применяемые парентерально, не вызывают формирования SIgA; клеточные иммунные ответы часто слабы, а продолжительность иммунитета может быть короткой. Несмотря на то, что для вакцины против ТГ в качестве кандидатов были предложены штаммы РКС, экспериментальные исследования их эффективности против ТГ показали недостаток последней (Paton & Brown, 1990) или лишь частичную перекрестную защиту (Bernard *et al.*, 1989; Cox *et al.*, 1993; Van Cott *et al.*, 1994). При этом широкое распространение инфекции, вызванной РКС, среди популяции свиней в Европе, по-видимому, привело к значительному снижению частоты эпизоотий ТГ в Европе (Pensaert *et al.*, 1986). Новейшие стратегии разработки вакцин для профилактики ТГ на базе рекомбинантной ДНК предполагают применением вакцины на основе субъединицы белка S (при условии разработки систем доставки в слизистые оболочки и адьювантов; Park *et al.*, 1998; Sestak *et al.*, 1999a; Shoup *et al.*, 1997) или применение живых рекомбинантных вирусных или бактериальных векторов, которые экспрессируют гены ВТГ, имеющие значимость для формирования иммунитета (Enjuanes *et al.*, 2001; Saif, 1993; Saif & Sestak, 2006; Smerdou *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 1996; Yount *et al.*, 2000).

Существует ряд общих требований (например, ведение производства на площадке, имеющей лицензию; правила составления инструкции по применению лекарственного препарата; отслеживаемость и т. д.), которые применяются ко всем биологическим препаратам, в том числе вакцинам. Разработан пакет нормативных документов (названный стандартными требованиями или СТ), в котором описываются подлежащие выполнению испытания вакцин и средств для парентерального введения. Подробная информация о СТ для вакцин в США содержится в Своде федеральных нормативных актов (CFR; раздел 9, том 1, часть 113 (сокращенно далее 9 CFR, 113); Министерство сельского хозяйства США

(USDA), 1995 год). Общая статья Европейской Фармакопеи и руководства ЕМЕА (Европейского агентства по лекарственным средствам) применимы к вакцинам для профилактики ТГ, даже несмотря на то, что в настоящее время такие вакцины в Европейском союзе не используются.

1. Контроль посевного вируса

1.1. Характеристики посевного вируса

Посевной вирус подлежит оценке на чистоту и подлинность. Испытание на чистоту предусматривает проверку свободы от бактерий и грибов (9 CFR 113:27), микоплазм (9 CFR 113:28) и посторонних вирусов (9 CFR 113:55; USDA, 1995 год). Подлинность обычно подтверждается в реакции ВН или реакции иммунной флюоресценции. От вакцин на основе вирусов, полученных методами генной инженерии, или вакцин на основе вирусов, полученных в результате естественного отбора, для которых заявлена делеция/инактивация гена, кодирующего антиген, требуется доказательство (генотипическое и/или фенотипическое) подлинности.

1.2. Способ культивирования

Культуру выращивают на клетках с подтвержденным отсутствием контаминации (одобренных), а количество пассажей клеточной культуры ограничено (обычно пятью). Вид, от которого происходит клеточная культура, не обязательно должен соответствовать целевому виду.

1.3. Валидация в качестве вакцины

Валидация в качестве вакцины проходит в двух формах. Производственный штамм считается иммуногенным, если для вакцины, изготовленной на самом высоком пассаже и в соответствии со схемой производства, доказаны защитные свойства. Самый низкий антигенный уровень (титр вируса в случае модифицированных вакцин или антигенная масса в случае инактивированных вакцины), для которого доказаны защитные свойства, становится исходным для всех будущих серий (партий) препарата. В случае живых вакцин могут применяться поправочные коэффициенты на вариабельность титрования и на кривую зависимости гибели от времени. Эти экспериментальные вакцины подлежат оценке производителем на чистоту, безопасность и эффективность. Должна быть доказана защита от естественного заболевания, вызванного вирулентным контрольным вирусом. Вирулентный контрольный вирус определяется дозой, которая вызывает заболевание у > 95% восприимчивых особей контрольной группы. Три серии, предшествующие выдаче лицензии, должны быть последовательно изготовлены и подвергнуты контролю на активность, стерильность и безопасность производителем и лицензирующим уполномоченным органом.

2. Способ изготовления

Настоящая информация является собственностью каждого производителя и, следовательно, недоступна.

3. Внутрипроизводственный контроль

На большую часть настоящей информации распространяется право собственности. Некоторые показатели внутрипроизводственного контроля относятся непосредственно к производству (например, концентрация O_2 в биореакторе). Другая категория в то же время включает в себя испытания, близкие к определению активности препарата в окончательной упаковке. В случае любой вакцины, чем легче испытание готовой серии или препарата в окончательной упаковке на активность, тем выше вероятность, что оно может использоваться для мониторинга/этапа перемешивания: например, результаты титрования вируса подсерий, могут использоваться для прогноза титра готовой серии после перемешивания. Ингредиенты животного происхождения подлежат стерилизации или подтверждению свободы от контаминантов.

4. Контроль партии

Перемешивание партии должно обеспечивать соответствие спецификациям готового препарата и спецификациям фасовки (например, допускается объединение партий с этапа ферментации либо разделение одной партии и объединение ее с каждой из трех других и т. д.). В некоторых странах контроль нерасфасованного продукта и производственного процесса характеризуют препарат и являются предметом строгого регулирования и проверки. В США упор делается на готовый лекарственный препарат. Порядок контроля партии должен подробно описываться в схеме производства и быть обоснованным и отслеживаемым, а производитель обязан утилизировать продукт, который не соответствует спецификациям. В том случае, если партия предназначена для экспорта в другую страну, где будет происходить расфасовка или перемешивание, она подвергается тем же испытаниям, как если бы она была готовым лекарственным препаратом.

4.1 Стерильность

Все препараты подлежат испытанию на стерильность. Производитель также может проводить испытания партий на стерильность с целью мониторинга. Испытания аналогичны тем, что описываются в разделе С.1.1.

4.2 Безопасность

Испытания на безопасность выполняются перед выдачей лицензии, а затем для препарата в окончательной упаковке (разделы С.5.1 и С.5.2).

4.3 Активность

Активность в норме определяется только в случае простой методики этого испытания (например, твердофазный ИФА) с целью подтверждения расчетов для перемешивания перед расфасовкой.

4.4 Продолжительность иммунитета

Длительность иммунитета определяют в исследовании доли лицензионной серии (исследовании эффективности), не в ходе контроля партии. Новые препараты должны соответствовать заявленным в инструкции по применению лекарственного препарата схемам ревакцинации при проведении исследований эффективности (с заражением) в обозначенные временные точки после вакцинации.

4.5 Стабильность

Стабильность устанавливают до выдачи лицензии. Обычно для оценки срока годности применяют ускоренное состаривание (при температуре 37°C), чтобы не пришлось выдерживать препарат при температуре хранения (4°C) в режиме реального времени. Впоследствии срок годности подтверждается данными, полученными в режиме реального времени. Производитель не обязан проводить исследования стабильности. От производителей требуется заявить, какое количество антигенного материала будет содержаться в их препарате в течение срока годности. Отбор образцов препарата (обычно вручную) и их испытания выполняют не позднее 30 дней от даты истечения срока годности. Это позволяет обнаружить, например, что титр остается на уровне, заявленном в спецификации производителя. Влажность также влияет на стабильность. Влага, оставшаяся в высушенном препарате, способна сократить срок его годности, поэтому она подлежит определению в готовом лекарственном препарате или как показатель внутрипроизводственного контроля.

4.6 Консерванты

Существуют ограничения по максимальному допустимому содержанию антибиотиков в препарате. Ограничения в отношении некоторых компонентов вакцины связаны с их безопасностью, а также с тем, достаточно ли долог установленный период каренции для выведения их из организма животного перед его убоем. На используемые консерванты распространяется право собственности.

4.7 Меры предосторожности (факторы риска)

Любые риски для вакцинируемых животных должны четко указываться в инструкции по применению лекарственного препарата. Это обычно касается предупреждения для беременных животных в случае abortогенных живых вирусов, а также общего предупреждения об анафилаксии, но может также касаться предупреждения оператора о болезненности или отеке в месте введения или транзиторной лихорадке либо об отказе от корма в отдельных случаях. В инструкциях по применению вакцин против ТГ, зарегистрированных в настоящее время, особые меры предосторожности отсутствуют.

5. Испытания готового лекарственного препарата

5.1 Безопасность

Определение безопасности обычно проводят на мышах и/или морских свинках или свиньях (9 CFR 113:33; работа Витте, 1971 год). Также выполняют испытание готового лекарственного препарата на стерильность.

5.2 Активность

Не существует единой методики определения активности при выпуске. Вне зависимости от типа применяемого метода, он должен коррелировать с

защитой макроорганизма (исследования эффективности). Активность живых вакцин для профилактики ТГ может оцениваться методом *in vitro* титрования вирусной инфекционной дозы в клеточной культуре (Saif, 1993). Этот титр должен коррелировать с минимальным титром вируса, который необходим для формирования защитного иммунитета против экспериментального заражения, а также против естественного заражения в полевых условиях. Активность убитых вакцин оценивается в исследованиях вакцинации и заражения с использованием различных доз вакцины. Допускается применение титров нейтрализующих антител, выработка которых у лабораторных животных индуцируется введением вакцины, в том случае, если установлена корреляция с формированием защитного иммунитета.

В убитых вакцинах возможно количественное определение конкретных вирусных антигенов, связанных с индукцией выработки нейтрализующих антител и защитой против заражения, с использованием специфичных моноклональных антител в твердофазном ИФА (например, моноклональных антител к белку S ВТГ; Saif, 1993).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ASAGI M., OGAWA T., MINETOMA T., SATO K. & INABA Y. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis virus in feces from pigs by reversed passive haemagglutination. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2161-2164.

BAE I., JACKWOOD D.J., BENFIELD D.A., SAIF L.J., WESLEY R.D. & HILL H. (1991). Differentiation of transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus and other antigenically related coronaviruses by using cDNA probes specific for the 5' region of the S glycoprotein gene. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 215-218.

BERNARD S., BOTTREAU E., AYNAUD, J.M., HAVE P. & SZYMANSKY J. (1989). Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **21**, 1-8.

BERNARD S., LANTIER I., LAUDE H. & AYNAUD J.M. (1986). Detection of transmissible gastroenteritis coronavirus antigens by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique. *Am. J. Vet. Res.*, **47**, 2441-2444.

BOHL E.H. (1979). Diagnosis of diarrhea in pigs due to transmissible gastroenteritis or rotavirus. *In: Viral Enteritis in Humans and Animals*, Bricout F. & Scherrer R., eds. INSERM, Paris, France, **90**, 341-343.

BROWN I.H. & PATON D.J. (1991). Serological studies of transmissible gastroenteritis in Great Britain, using a competitive ELISA. *Vet. Rec.*, **128**, 500-503.

CALLEBAUT P., CORREA I., PENSAERT M., JIMENEZ G. & ENJUANES L. (1988). Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **69**, 1725-1730.

CALLEBAUT P., PENSAERT M.B. & HOOYBERGHS J. (1989). A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with transmissible gastroenteritis virus (TGEV) or with the TGEV-related porcine respiratory coronavirus. *Vet. Microbiol.*, **20**, 9-19.

COSTANTINI V., LEWIS P., ALSOP J., TEMPLETON C. & SAIF L.J. (2004). Respiratory and enteric shedding of porcine respiratory coronavirus (PRCV) in sentinel

weaned pigs and sequence of the partial S gene of the PRCV isolates. *Arch. Virol.*, **149**, 957-974.

COX E., HOOYBERGHS J. & PENSAERT M.B. (1990). Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res. Vet. Sci.*, **48**, 165-169.

COX E., PENSAERT M.B. & CALLEBAUT P. (1993). Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine*, **11**, 267-272.

DULAC G.C., RUCKERBAUER G.M. & BOULANGER P. (1977). Transmissible gastroenteritis: demonstration of the virus from field specimens by means of cell culture and pig inoculation. *Can. J. Comp. Med.*, **41**, 357-363.

ENJUANES L., SOLA I., ALMAZAN F., ORTEGO J., IZETA A., GONZALEZ J.M., ALONSO S., SANCHEZ J.M., ESCORS D., CALVO E., RIQUELME C. & SANCHEZ C. (2001) Coronavirus derived expression systems. *J. Biotechnol.*, **88**, 183-204.

ENJUANES L. & VAN DER ZEIJST B.A.M (1995). Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology. *In: The Coronaviridae*, Siddell, Stuart G., ed. Plenum Press, New York, USA, 337-376.

GARWES D.J., STEWART F., CARTWRIGHT S.F. & BROWN I. (1988). Differentiation of porcine respiratory coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **122**, 86-87.

HOHDATSU T., EIGUCHI Y., IDE S., BABA H. & YAMAGISHI H. (1987). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of transmissible gastroenteritis virus antibodies. *Vet. Microbiol.*, **13**, 93-97.

HONDA E., TAKAHASHI H., OKAZAKI K., MINETOMA T. & KUMAGAI T. (1990). The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. *Jpn J. Vet. Sci.*, **52**, 217-224.

HUANG C-C., JONG M.H. & LAI S.Y. (1988). Preparation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit and its application in diagnosis of transmissible gastroenteritis. *Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husbandry*, **51**, 57-63.

JEAN Y.H., KANG M.I., HWANG E.K., KWON Y.B., CHUNG U.I. & LEE J.B. (1987). Detection of transmissible gastroenteritis virus in tissue by peroxidase-antiperoxidase method. Research Reports Rural Development Administration (Livestock & Veterinary), Korea, **29**, 48-53.

KEMENY L.J., WILTSEY V.L. & RILEY J.L. (1975). Upper respiratory infection of lactating sows with transmissible gastroenteritis virus following contact exposure to infected piglets. *Cornell Vet.*, **65**, 352-362.

KIM L., CHANG K.O., SESTAK K., PARWANI A & SAIF L.J. (2000a). Development of a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay for differential diagnosis of transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus from feces and nasal swabs of infected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 385-388.

KIM L., HAYES J., LEWIS P., PARWANI A.V., CHANG K.O. & SAIF L.J. (2000b). Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus

(TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. *Arch. Virol.*, **145**, 1133-1147.

KIM S.Y., SONG D.S. & PARK B.K. (2001). Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex Rt-pCr. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 516-520.

LABADIE J.P., AYNAUD J.M., VAISAIRE J. & RENAULT L. (1977). Porcine transmissible gastroenteritis. Antibody detection by passive haemagglutination test: applications to diagnosis and epidemiology. *Rec. Med. Vet.*, **153**, 931-936.

LANZA I., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1995). Lactogenic immunity and milk antibody isotypes to transmissible gastroenteritis virus in sows exposed to porcine respiratory coronavirus during pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 739-748.

LIU C., KOKUHO T., KUBOTA T., WATANABE S., INUMARU S., YOKOMIZO Y. & ONODERA T. (2001). A serodiagnostic ELISA using recombinant antigen of swine transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1253-1256.

MCCLURKIN A.W. & NORMAN J.O. (1966). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.*, **30**, 190-198.

MCGOLDRICK A., LOWINGS J.P. & PATON D.J. (1999). Characterization of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch. Virol.*, **144**, 763-770.

NELSON L.D. & KEHLING C.L. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of transmissible gastroenteritis virus antibody in swine sera. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1645-1657.

NODA M., YAMASHITA H., ICOIDE F., KODOI, K., ORNON T., ASAGI M. & INABA Y. (1987). Haemagglutination with transmissible gastroenteritis. *Arch. Virol.*, **96**, 109-115.

O'TOOLE D., BROWN I.H., BRIDGES A. & CARTWRIGHT S.F. (1989). Pathogenicity of experimental infection with 'pneumotropic' porcine coronavirus. *Res. Vet. Sci.*, **47**, 23-29.

PARK S., SESTAK K., HODGINS D.C., SHOUP D.I., WARD L.A., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1998). Immune response of sows vaccinated with attenuated transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and recombinant TGEV spike protein vaccine and protection of their suckling piglets against virulent TGEV challenge. *Am. J. Vet. Res.*, **59**, 1002-1008.

PATON D.J. & BROWN I.H. (1990). Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their suckling piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet. Res. Commun.*, **14**, 329.

PATON D.J., BROWN I.H. & VAZ E.K. (1991). An ELISA for the detection of serum antibodies to both transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Br. Vet. J.*, **147**, 370-372.

PATON D.J., IBATA G., MCGOLDRICK A., JONES T.O. & PRITCHARD G.C. (1998). Attempted isolation and characterisation of recent British isolates of transmissible gastroenteritis. Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham, UK, 5-9 July 1998.

- PATON D., IBATA G., SANDS J. & MCGOLDRICK A. (1997). Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. *J. Virol. Methods*, **66**, 303-309.
- PATON D. & LOWINGS P. (1997). Discrimination between transmissible gastroenteritis virus isolates. *Arch. Virol.*, **142**, 1703-1711.
- PENSAERT M., CALLEBAUT P. & VERGOTE J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet. Q.*, **8**, 257-261.
- PENSAERT M.B., HALTERMAN E.O. & BERNSTEIN T. (1968). Diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs by means of immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 555-561.
- RASSCHAERT D., DUARTE M. & LAUDE H. (1990). Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2599-2607.
- RUKHADZE G.G., ALIPER T.I. & SERGEEV V.A. (1989). Isolation of peplomer glycoprotein E2 of transmissible gastroenteritis virus and application in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1754-1758.
- SAIF L.J. (1993). Coronavirus immunogens. *Vet. Microbiol.*, **37**, 285-297.
- SAIF L.J., BOHL E.H., KOHLER E.M. & HUGHES J.H. (1977). Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agent) of swine. *Am. J. Vet. Res.*, **38**, 13-20.
- SAIF L.J. & JACKWOOD D.J. (1990). Enteric virus vaccines: Theoretical considerations, current status and future approaches. *In: Viral Diarrheas of Man and Animals*, Saif L.J. & Theil K.W., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 313-329.
- SAIF L.J. & SESTAK K. (2006). Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *In: Diseases of Swine*, Ninth Edition, B.E.Straw *et al.*, eds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 489-516.
- SCHULTZE B., KREMPL C., BALLESTEROS M.L., SHAW L., SCHAUER R., ENJUANES L. & HERRLER G. (1996). Transmissible gastroenteritis coronavirus, but the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N- glycolylneuramic acid) binding activity. *J. Virol.*, **70**, 5634-5637.
- SESTAK K., LANZA I., PARK S.K., WEILNAU P. & SAIF L.J. (1996). Contribution of passive immunity to porcine respiratory coronavirus to protection against transmissible gastroenteritis virus challenge exposure in suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **5**, 664-671.
- SESTAK K., MEISTER R.K., HAYES J.R., KIM L., LEWIS P.A., MYERS G. & SAIF L.J. (1999a). Active immunity and T-cell populations in pigs intraperitoneally inoculated with baculovirus-expressed transmissible gastroenteritis virus structural proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **70**, 203-221.
- SESTAK K., ZHOU Z., SHOUP D.I. & SAIF L.J. (1999b). Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 205-214.

SHIMIZU M. & SHIMIZU Y. (1977). Micro-indirect haemagglutination test for detection of antibody against transmissible gastroenteritis virus of pigs. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 91-95.

SHOUP D., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1997). Active and passive immune responses to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in swine inoculated with recombinant baculovirus-expressed TGEV spike glycoprotein vaccines. *Am J. Vet. Res.*, **58**, 242-250.

SHOUP D.I., SWAYNE D.E., JACKWOOD D.J. & SAIF L.J. (1996). Immunohistochemistry of transmissible gastroenteritis virus antigens in fixed paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn Invest.*, **8**, 161-167.

SIMKINS R.A., WEILNAU P.A., BIAS J. & SAIF L.J. (1992). Antigenic variation among transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus strains detected with monoclonal antibodies to the S protein of TGEV. *Am. J. Vet. Res.*, **53**, 1253-1258.

SIRINARUMITR T., PAUL P.S., KLUGE J.P. & HALBUR P.G. (1996). *In situ* hybridization technique for the detection of swine enteric and respiratory coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV), in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods*, **56**, 149-160.

SMERDOU C., URNIZA A., CURTIS III R. & ENJUANES L. (1996). Characterization of transmissible gastroenteritis coronavirus S protein expression products in avirulent *S. typhimurium* *mit*/*Deltacya* *mit*/*Deltacrp*: persistence, stability and immune response in swine. *Vet. Microbiol.*, **48**, 87-100.

TORRES J.M., COVADONGA A., ORTEGA A., MITTAL S., GRAHAM F. & ENJUANES L. (1996). Tropism of human adenovirus type 5-based vectors in swine and their ability to protect against transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Virol.*, **70**, 3770-3780.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Code Of Federal Regulations, Title 9, Parts 1-199. US Government Printing Office, Washington D.C., USA.

VAN COTT J., BRIM T., LUNNEY J. & SAIF L.J. (1994). Contribution of antibody secreting cells induced in mucosal lymphoid tissues of pigs inoculated with respiratory or enteric strains of coronavirus to immunity against enteric coronavirus challenge. *J. Immunol.*, **152**, 3980-3990.

Van Nieuwstadt A.P. & Boonstra J. (1991). A competitive ELISA to distinguish TGEV from PRCV-infected pigs. International Pig Veterinary Society Proceedings 1990, 265.

VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & VREESWIJK J. (1988a). Solid phase immune electron microscopy for diagnosis of transmissible gastroenteritis in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 286-294.

VAN NIEUWSTADT A.P., CORNELISSEN J.B. & ZETSTRA T. (1988b). Comparison of two methods for detection of transmissible gastroenteritis virus in feces of pigs with experimentally induced infection. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 1836-1843.

WITTE K.H. (1971). Micro-colour test for assay of transmissible gastroenteritis virus neutralizing antibodies. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **33**, 171-176.

WOODS R.D. (1997). Development of PCR-based techniques to identify porcine transmissible gastroenteritis coronavirus isolates. *Can. J. Vet. Res.*, **61**, 167-172.

YOUNT B., CURTIS K. & BARIC R. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: Transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.*, **74**, 10600-10611.

ZHANG X., HASOKSUZ M., SPIRO D., HALPIN R., WANG S., STOLLAR S., JANIES D., HADYA N., TANG Y., GHEDIN E. & SAIF L.J. (2007). Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in non-structural protein 3b of uS strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology*, **358**, 424-435.

NB: Существуют Референтные лаборатории МЭБ по диагностике трансмиссивного гастроэнтерита (см. таблицу, приведенную в части 4 настоящего Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или посетите веб-сайт МЭБ для получения актуального списка лабораторий: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Для получения более подробной информации, касающейся тестов и реагентов для диагностики трансмиссивного гастроэнтерита, просим Вас обращаться в Референтные лаборатории МЭБ.