

РАЗРАБОТКА И ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЭПИЗОТИЧЕСКОЙ ДИАРЕИ СВИНЕЙ

А. В. Каньшина¹, А. С. Яковлева², Е. С. Орлова³, А. В. Щербakov⁴

¹ Старший научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: vavilova@arriah.ru

² Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru

³ Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: orlova@arriah.ru

⁴ Заведующий лабораторией, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Распространение эпизоотической диареи свиней и возросшая угроза свиноводству диктуют необходимость разработки современных методов диагностики болезни. Перспективным является использование в серологических тестах рекомбинантных антигенов возбудителя болезни. На основе рекомбинантного антигена разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу эпизоотической диареи свиней. В результате проведенных исследований были установлены все необходимые условия реакции. В процессе валидации определены основные характеристики разработанного метода. Прецизионность реакции в условиях повторяемости и воспроизводимости превышала 90%, диагностическая специфичность составляла 99,47%, чувствительность относительно коммерческого набора ID Screen PEDV Indirect (IDvet, Франция) при очень хорошей согласованности двух методов (*k*-критерий – 0,88) – 92%. Тест-система характеризуется высокой устойчивостью при смене ключевого компонента реакции.

Ключевые слова: эпизоотическая диарея свиней, антитела, иммуноферментный анализ.

UDC 619:616.98:578.834.1:636.4:616-078:616-097

DEVELOPMENT AND BASIC FEATURES OF INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA

A. V. Kanschina¹, A. S. Yakovleva², Ye. S. Orlova³, A. V. Scherbakov⁴

¹ Senior Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: vavilova@arriah.ru

² Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: yakovleva_as@arriah.ru

³ Senior Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: orlova@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: ascherbakov@arriah.ru

SUMMARY

Spread of porcine epidemic diarrhea and its increased threat for the pig industry necessitate development of advanced techniques for the disease diagnosis. Use of recombinant antigens of the disease agent seems prospective. The recombinant antigen-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay has been developed for the detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea virus. The research performed allowed for determination of all necessary test conditions. Basic features of the developed method were determined during its validation. The test precision was above 90% pursuant to its repeatability and reproducibility, diagnostic specificity of the test amounted to 99.47%, and its sensitivity as compared to commercial ID Screen PEDV Indirect (IDvet, France) was 92% with very good compatibility of the two tests (*k*-criterion – 0.88) – 92%. The test-system demonstrates high stability upon the change of the key test component.

Key words: porcine epidemic diarrhea, antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay.

ВВЕДЕНИЕ

Эпизоотическая диарея свиней (ЭДС) – острое кишечное заболевание, характеризующееся рвотой и диареей с водянистым поносом. Возбудителем болезни является РНК-содержащий вирус семейства *Coronaviridae* [1, 3].

К заболеванию восприимчивы свиньи всех возрастных групп. Острое течение болезни наблюдается при первичном попадании инфекции в хозяйство. По симптомам ЭДС напоминает типичную вспышку трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС). Смертность в результате дегидратации среди 1–14-суточных поросят-сосунов может достигать 90% [2, 13].

Заболевание наносит свиноводству большой экономический ущерб, обусловленный высокой смертностью поросят, а также снижением привеса свиней из группы откорма вследствие угнетения аппетита после выздоровления [3].

ЭДС известна с 1970-х гг., долгое время ее ареал ограничивался Европой и некоторыми азиатскими странами. В 2013 г. ЭДС впервые была занесена в США, где нанесла значительный ущерб свиноводству. Вскоре болезнь распространилась на территорию Канады и Мексики. Масштабные эпизоотии ЭДС были зарегистрированы в последние годы также в Китае, Южной Корее, Японии [11].

Глобальное распространение ЭДС и возросшая угроза свиноводству делают актуальной проблему разработки современных методов диагностики болезни.

Для обнаружения антител против вируса ЭДС используются такие серологические методы, как реакция нейтрализации, иммуногистохимия, иммунофлуоресценция, иммуноферментный анализ (ИФА). Многие из этих методов основаны на использовании нативного вирусного антигена [5, 7, 9]. Перспективным является использование в серологических тестах рекомбинантных антигенов возбудителя ЭДС.

Основными структурными белками вируса ЭДС являются белок Spike (S), нуклеокапсидный протеин (N) и мембранный протеин (M). Было показано, что данные белки содержат антигенные детерминанты и могут использоваться в качестве антигенов в иммунологических реакциях [8, 12, 13]. Белок N является наиболее консервативным по аминокислотному составу у различных изолятов вируса ЭДС [11]. Ранее в ФГБУ «ВНИИЗЖ» был получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок вируса ЭДС и отработаны условия его синтеза в *E. coli* [4].

Цель данной работы заключалась в разработке непрямого ИФА на основе рекомбинантного антигена и определении основных характеристик реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антиген. В качестве антигена для ИФА использовали рекомбинантный белок вируса ЭДС, полученный ранее [4].

Сыворотки крови. В работе использовали сыворотки крови свиней, полученные из хозяйств, благополучных и неблагополучных по ЭДС. В качестве гетерологичных использовали сыворотки крови от свиней, вакцинированных против репродуктивно-респираторного синдрома свиней, классической чумы свиней, ТГС и др.

Конъюгат антивидовых антител. В работе использовали пероксидазный конъюгат против иммуноглобулина G свиньи (Sigma, США).

Непрямой вариант ИФА. Разработка непрямого варианта ИФА на основе рекомбинантного антигена со-

ставляла предмет исследований, поэтому схема ЭДС-ИФА описана в разделе «Результаты и обсуждение».

ИФА с использованием коммерческих наборов. В работе использовали импортный коммерческий набор ID Screen PEDV Indirect (IDvet, Франция). Постановку ИФА осуществляли в соответствии с инструкцией к тест-системе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка непрямого варианта ИФА для обнаружения антител к вирусу ЭДС включала несколько этапов.

Определение антигенной активности рекомбинантного белка вируса ЭДС и оптимизация условий постановки непрямого варианта ИФА. Очищенный препарат рекомбинантного белка вируса ЭДС использовали для изучения его антигенной активности и специфичности. С этой целью методом последовательных разведений в ИФА вносили антиген в сенсibiliзирующем буфере. Для сенсibiliзации использовали буферные растворы: карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,6 (КББ) и карбонатно-бикарбонатный буфер с добавлением 50 мМ 1,4-дитио-DL-треитола, pH 9,6 (КББ + ДТТ). Сорбированные планшеты инкубировали 16–18 ч при температуре 4–8 °С. Затем один из планшетов отмыли от несвязавшегося антигена три раза по 300 мкл на лунку фосфатно-буферным раствором (ФБР), другой только обсушили и внесли блокирующий буфер. В качестве положительной и отрицательной контрольных сывороток использовали пробы, предварительно протестированные с помощью коммерческого набора ID Screen PEDV.

Результаты проверки антигенной активности рекомбинантного белка вируса ЭДС отражены в графической форме на рисунках 1 и 2.

Как видно из рисунков 1 и 2, состав сорбирующего буфера на антигенную активность рекомбинантного белка не влиял – рабочее разведение антигена для сенсibiliзации предложенных буферов составило 1:800, что соответствует концентрации белка 0,032 мкг/мл. Влияние оказывал этап отмывания планшета от несвязавшегося антигена. Поэтому далее в качестве сорбирующего применяли карбонатно-бикарбонатный буфер, а планшет от несвязавшегося антигена отмывали.

Для выбора блокирующего буфера использовали восемь различных составов: 10%-й, 5%-й, 3%-й растворы бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10%-й, 5%-й растворы нормальной сыворотки крови лошади и 10%-й, 3%-й и 1%-й растворы сухого обезжиренного молока. Компоненты растворяли в ФБР, pH доводили до 7,3–7,6. После серии экспериментов количество пригодных для блокирования буферов сократили до трех: 10%-й, 1%-й растворы молока и 10%-й раствор БСА. Эти три буфера использовали для определения оптимального времени инкубации сывороток и конъюгата. Измерения оптической плотности (ОП) проводили на трех отрицательных и четырех положительных пробах сывороток крови в четырех повторностях через 30, 45, 60 мин. Затем вычисляли среднее арифметическое значение (\bar{x}) ОП сывороток, среднее квадратичное отклонение (δ) и коэффициент вариации (c). Наилучшие результаты (коэффициент вариации менее 10%) получили при инкубации сывороток и конъюгата в течение 30 мин с использованием 1%-го раствора молока.

По результатам экспериментов в качестве оптимальной была выбрана следующая схема постановки ЭДС-ИФА: рекомбинантный антиген вируса ЭДС раз-

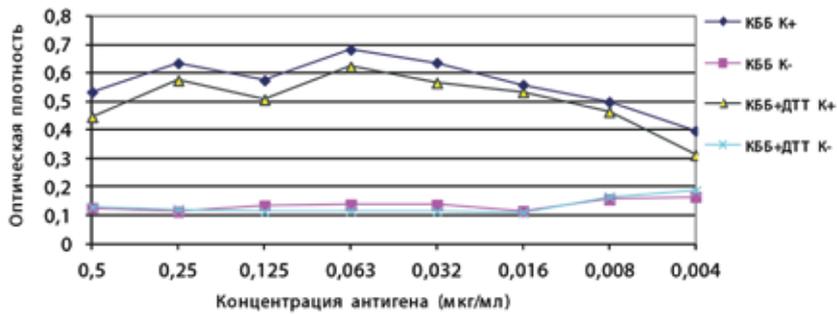


Рис. 1. Антигенная активность рекомбинантного белка в ЭДС-ИФА с контрольными сыворотками с отмыванием антигена

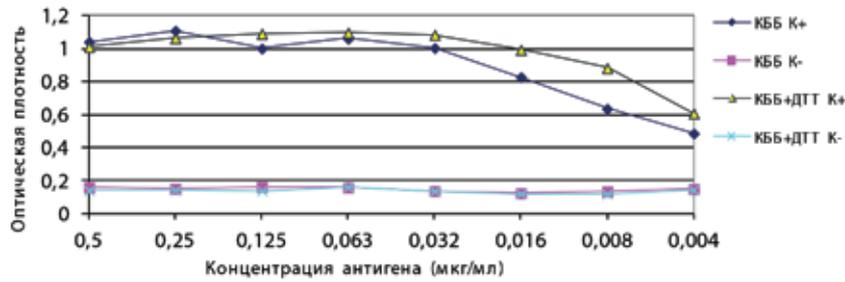


Рис. 2. Антигенная активность рекомбинантного белка в ЭДС-ИФА с контрольными сыворотками без отмывания антигена

водили в сорбирующем буфере (КББ, рН 9,6) и вносили по 50 мкл на лунку. Планшет с антигеном инкубировали при температуре 4–8 °С в течение 16–18 ч и отмывали трехкратно по 250–300 мкл на лунку ФБР. После высушивания вносили блокирующий буфер (1%-й раствор молока в ФБР, рН 7,3–7,4) и инкубировали в течение 60 мин в термощейкере при температуре 37 °С. Планшет вновь отмывали и вносили разведенные пробы сыворотки крови в буфере для разведения проб и конъюгата (1%-й раствор молока в ФБР, рН 7,3–7,4), инкубировали в термощейкере в течение 30 мин при температуре 37 °С и скорости вращения 750 об/мин. После отмывания планшета вносили конъюгат в рабочем разведении и инкубировали, как описано выше. Реакцию окрашивали раствором 2,2'-азино-ди[3-этил]бензтиазолинсульфоновой кислоты, останавливали 1%-м раствором додецилсульфата натрия. Реакцию учитывали с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм.

Выбор величины рабочего разведения сыворотки крови свиней при тестировании проб в одном разведении. Для определения оптимального разведения тестировали пробы сыворотки крови с различным уровнем антител к вирусу ЭДС методом последовательных разведений в ИФА, начиная с 1:20 до 1:1280.

Реакцию ЭДС-ИФА проводили по схеме, описанной выше.

Для всех разведений исследуемых сывороток (85 проб) вычислили процент позитивности и определили конечный титр.

За конечный титр принимали последнее разведение сыворотки, ОП которой равнялась или была выше удвоенного значения средней ОП отрицательной контрольной сыворотки.

Процент позитивности (ПП) вычисляли по формуле

$$ПП = (ОП - NC_x) / (PC_x - NC_x) \times 100\%$$

где ОП – оптическая плотность исследуемой сыворотки; NC_x – оптическая плотность отрицательного контроля; PC_x – оптическая плотность положительного контроля.

Полученные результаты обработали с помощью компьютерной программы Statistica, которая позволила рассчитать коэффициент корреляции и стандартную ошибку. На основании этих показателей произвели выбор рабочего разведения сыворотки крови. Наиболее высокий коэффициент корреляции ($R = 0,9199$) с наименьшей стандартной ошибкой 0,07718 получили для разведения 1:40 при доверительном интервале 0,95.

Определение позитивно-негативного порога (ПНП). Для обоснования пороговых показателей, разграничивающих неспецифическую (отрицательную) и специ-

Таблица 1
Оценка сходимости ЭДС-ИФА для одной пробы на трех планшетах

Постановка реакции	Минимальное значение ОП K ⁺ (x_{\min})	Максимальное значение ОП K ⁺ (x_{\max})	Среднее значение ОП K ⁺ (\bar{x})	Среднее квадратичное отклонение (σ)	Коэффициент вариации (с), %
планшет № 1	0,672	0,920	0,817	0,049	6,0
планшет № 2	0,557	0,891	0,759	0,067	8,83
планшет № 3	0,572	0,911	0,802	0,068	8,48

фическую (положительную) реакции в ЭДС-ИФА, определяли значения ОП 92 образцов сыворотки крови, не имеющих антител к вирусу ЭДС.

ПНП определяли, рассчитывая среднее значение ОП отрицательных сывороток крови для выбранного разведения 1:40, с учетом двух и трех значений стандартного отклонения (σ). Было установлено, что сыворотки следует считать отрицательными, если ПП < 20%, положительными, если ПП \geq 25%. ПП в интервале 20–25% оценивается как сомнительный результат.

Определение допустимых величин ОП контрольных сывороток. Исследовали 20 повторностей положительной и отрицательной сывороток крови свиней в разведении 1:40. Полученные выборки значений ОП позволили рассчитать соответствующие средние значения ОП, стандартные отклонения и 95%-й доверительный интервал.

Показано, что среднее значение для положительно-го контроля соответствует значению 0,999 (стандартное отклонение – 0,223), для отрицательного – 0,137 (стандартное отклонение – 0,036). Допустимыми значениями ОП контрольных сывороток при 95%-м доверительном интервале являются значения, лежащие в диапазоне: для положительного контроля – от 0,776 до 1,222, для отрицательного контроля – от 0,062 до 0,212 оптических единиц.

Таким образом, в результате проведенных исследований были определены все необходимые условия реакции.

На следующем этапе были проведены исследования, направленные на определение основных валидационных характеристик ЭДС-ИФА: аналитической и диагностической чувствительности и специфичности, устойчивости к смене реагентов, прецизионности в условиях повторяемости (сходимость) и воспроизводимости.

Оценка аналитической специфичности ЭДС-ИФА. Аналитическую специфичность рекомбинантного белка проверяли с сыворотками крови свиней, содержащих антитела к вирусам трансмиссивного гастроэнтерита свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней, классической чумы свиней, цирковирусной инфекции свиней 2-го типа, болезни Ауески. Активность белка с гетерогенными сыворотками не превышала фоновый уровень, полученный в реакции с неиммунной сывороткой.

Определение аналитической чувствительности. Использовали сыворотку крови свиньи, полученную от переболевшего данным заболеванием животного. Наличие антител подтвердили в коммерческом наборе фирмы IDvet.

Методом последовательных двукратных разведений в ЭДС-ИФА данную сыворотку тестировали в трех повторностях, титр сыворотки составил $9,32 \log_2$, что явилось пределом обнаружения для этого метода [6]. Для коммерческого набора фирмы IDvet предел обнаружения этой же сыворотки составил $8,32 \log_2$.

Определение прецизионности. В условиях повторяемости (сходимости) один образец сыворотки крови свиньи тестировали три раза в 96 повторностях (на трех планшетах), результаты представлены в таблице 1. Сходимость ЭДС-ИФА была оценена также при тестировании шести проб с разным уровнем антител в трех повторностях в рамках одной постановки теста (табл. 2).

Коэффициенты вариации во всех случаях составили менее 10%, что указывает на высокую сходимость результатов ЭДС-ИФА.

Прецизионность ЭДС-ИФА в условиях внутрिलाбораторной воспроизводимости (воспроизводимость) оценивали путем постановки контрольной пробы сыворотки крови в разные дни. Для этого в течение 20 дней исследовали положительную сыворотку крови и вычисляли среднее арифметическое процента позитивности, среднее квадратичное отклонение и коэффициент вариации. Эти показатели соответствовали значениям 100,0; 7,43 и 7,43. Низкое значение коэффициента вариации (менее 10%) доказывает, что разработанный метод обладает высокой воспроизводимостью [10].

Таким образом, оцененная прецизионность ЭДС-ИФА составила более 90% как в условиях повторяемости, так и в условиях воспроизводимости.

Определение устойчивости. Компоненты для ЭДС-ИФА, такие как сухое молоко, соли для приготовления буфера и др., стандартизированы фирмами-производителями.

Одним из основных компонентов, играющих значительную роль в реакции, является рекомбинантный антиген. Для проверки устойчивости метода при смене серий рекомбинантного антигена тестировали три образца сыворотки крови свиней (табл. 3).

Низкие коэффициенты вариации результатов ЭДС-ИФА для трех разных серий рекомбинантного антигена свидетельствуют о высокой устойчивости метода к смене ключевого реагента.

Таблица 2
Оценка сходимости шести проб в рамках одной постановки теста

№ пробы	Повторность	Оптическая плотность	Среднее квадратичное отклонение (σ)	Коэффициент вариации (c), %
1	1	0,786	0,005	0,6
	2	0,795		
	3	0,787		
2	1	0,446	0,011	2,41
	2	0,465		
	3	0,457		
3	1	0,598	0,052	9,5
	2	0,510		
	3	0,527		
4	1	0,125	0,006	4,65
	2	0,135		
	3	0,128		
5	1	0,185	0,014	7,6
	2	0,172		
	3	0,195		
6	1	0,105	0,002	1,9
	2	0,103		
	3	0,107		

Таблица 3
Устойчивость ЭДС-ИФА к смене серии рекомбинантного антигена

Серии рекомбинантного антигена	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Серия 1	1,095	0,998	0,116
Серия 2	1,062	0,926	0,112
Серия 3	1,005	0,855	0,119
Среднее значение ОП (\bar{x})	1,054	0,926	0,116
Среднее квадратичное отклонение (σ)	0,053	0,085	0,004
Коэффициент вариации (c), %	5,03	9,18	3,45

Определение диагностической специфичности ЭДС-ИФА. Использовали полевые сыворотки крови свиней из хозяйств, благополучных по ЭДС. Из 1510 проб в ЭДС-ИФА положительный результат показали восемь проб, в коммерческом наборе IDVet эти пробы были отрицательными. Таким образом, диагностическая специфичность разработанного метода составила 99,47%.

Определение чувствительности ЭДС-ИФА. В связи с тем, что полевые штаммы вируса ЭДС не удается выделить в культуре клеток, не имели возможности провести экспериментальное заражение свиней с целью получения заведомо положительных сывороток, которые необходимы для определения диагностической чувствительности. Однако наличие коммерческих тест-систем для определения антител против вируса ЭДС позволило определить чувствительность разработанного метода относительно импортных диагностических наборов.

Для этого в ЭДС-ИФА исследовали 100 сывороток крови свиней, показавших положительный результат в наборе ID Screen PEDV Indirect. Сыворотки были отобраны в четырех хозяйствах, где были зарегистрированы клинические признаки ЭДС, а при лабораторных исследованиях патологического материала в ОТ-ПЦР был обнаружен вирус ЭДС. Разработанный ЭДС-ИФА обнаружил антитела к вирусу ЭДС в 92 пробах, четыре пробы показали сомнительный результат и четыре пробы – отрицательный. Таким образом, на данной панели сывороток чувствительность ЭДС-ИФА относительно тест-системы IDvet составила 92% при очень хорошей согласованности двух методов (k -критерий – 0,88).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе рекомбинантного антигена разработан не прямой вариант ИФА для обнаружения антител к вирусу ЭДС. В процессе валидации установлено, что разработанная тест-система характеризуется очень хорошей воспроизводимостью результатов, устойчивостью при смене ключевого компонента реакции, высокой специфичностью и чувствительностью, т. е. пригодна для использования в качестве метода серологической диагностики ЭДС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вирусные болезни животных / В. Н. Сурин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина. – М.: ВНИТИБП, 2001. – 928 с.
2. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телат и поросят / Х. З. Гафаров, А. В. Иванов, Е. А. Непоклонов, А. З. Рапилов. – Казань: Фен, 2002. – 592 с.
3. Пейсак З. Болезни свиней. – Брест: Брестская типография, 2008. – 424 с.

4. Яковлева А. С., Щербakov А. В. Получение рекомбинантного нуклеокапсидного белка вируса эпизоотической диареи свиней // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2015. – Т. 13. – С. 89–95.

5. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection // J. S. Oh, D. S. Song, J. S. Yang [et al.] // J. Vet. Sci. – 2005. – Vol. 6, No. 4. – P. 349–352.

6. Development and optimization of antibody detection assays // OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds, and Bees). – 2014. – Chap. 3.6.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf.

7. Hofmann M., Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera // Vet. Microbiol. – 1990. – Vol. 21, No. 3. – P. 263–273. – URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90037-V](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90037-V).

8. Hou X. L., Yu L. Y., Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies // Vet. Microbiol. – 2007. – Vol. 123, No. 1–3. – P. 86–92. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.014>.

9. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods / F. Guscetti, C. Bernasconi, K. Tobler [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1998. – Vol. 5, No. 3. – P. 412–414.

10. Jacobson R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious disease // Rev. Sci. Tech. OIE. – 1998. – Vol. 17, No. 2. – P. 469–486.

11. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus // Virol. J. – 2015. – Vol. 12:193; DOI: 10.1186/s12985-015-0421-2.

12. Ren X., Suo S., Jang Y.-S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection // Biotechnol. Lett. – 2011. – Vol. 33, No. 2. – P. 215–220. – URL: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0420-8>.

13. Song D., Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines // Virus Genes. – 2012. – Vol. 44, No. 2. – P. 167–175; DOI: 10.1007/s11262-012-0713-1.

REFERENCES

1. Viral animal diseases [Virusnye bolezni zhivotnyh]. V. N. Surin, A. Ya. Samuylenko, B. V. Solov'yev, N. V. Fomina. M.: VNIITBP; 2001 (in Russian).
2. Mono-infection and co-infection diarrheas in newborn calves and piglets [Mono- i smeshannyye infektsionnyye diarei novorozhdennyh teljat i porosyat]. H. Z. Gafarov, A. V. Ivanov, Ye. A. Nepoklonov, A. Z. Ravilov. Kazan: Fen; 2002 (in Russian).
3. Pejsak Z. Porcine diseases. Brest: Brest printing Office; 2008.
4. Yakovleva A. S., Scherbakov A. V. Recovery of recombinant nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea. *Proceedings of the Federal Centre for Animal Health*. 2015; 13: 89–95 (in Russian).
5. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with serum neutralization test for serodiagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection. J. S. Oh, D. S. Song, J. S. Yang [et al.]. *J. Vet. Sci.* 2005; 6 (4): 349–352.
6. Development and optimization of antibody detection assays. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds, and Bees). 2014; Chap. 3.6.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.6.01_ANTIBODY_DETECT.pdf.
7. Hofmann M., Wyler R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of porcine epidemic diarrhea coronavirus antibodies in swine sera. *Vet. Microbiol.* 1990; 21 (3): 263–273. URL: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90037-V](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90037-V).
8. Hou X. L., Yu L. Y., Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet. Microbiol.* 2007; 123 (1–3): 86–92. URL: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.014>.
9. Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. F. Guscetti, C. Bernasconi, K. Tobler [et al.]. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5 (3): 412–414.
10. Jacobson R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious disease. *Rev. Sci. Tech. OIE.* 1998; 17 (2): 469–486.
11. Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virol. J.* 2015; 12: 193; DOI: 10.1186/s12985-015-0421-2.
12. Ren X., Suo S., Jang Y.-S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol. Lett.* 2011; 33 (2): 215–220. URL: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0420-8>.
13. Song D., Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes.* 2012; 44 (2): 167–175; DOI: 10.1007/s11262-012-0713-1.

Поступила 20.04.18

Принята в печать 06.08.18