

猪德尔塔冠状病毒 CHN/GSYD/2023 株的分离鉴定与致病性分析

于瑞明¹, 张莉萍², 周鹏², 张中旺², 潘丽², 郭慧琛², 袁莉刚^{1*}, 刘新生^{2*}

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州

2 中国农业科学院兰州兽医研究所, 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州

于瑞明, 张莉萍, 周鹏, 张中旺, 潘丽, 郭慧琛, 袁莉刚, 刘新生. 猪德尔塔冠状病毒 CHN/GSYD/2023 株的分离鉴定与致病性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 3994-4007.

YU Ruiming, ZHANG Liping, ZHOU Peng, ZHANG Zhongwang, PAN Li, GUO Huichen, YUAN Ligang, LIU Xinsheng. Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a porcine deltacoronavirus strain CHN/GSYD/2023[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 3994-4007.

摘要: 猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)是一种重要的猪肠道冠状病毒, 给养猪业带来了重大经济损失, 截至目前尚无可用的商品化疫苗。【目的】获得 PDCoV 流行毒株, 并对其生物学特性和致病性进行初步研究, 为尽快研发出有效防控 PDCoV 的疫苗提供生物材料。【方法】使用 LLC-PK1 细胞分离来自甘肃某猪场 PDCoV 阳性病料中的病毒, 并通过观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)、间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)、病毒全基因组测序等方法进行鉴定, 同时评价分离毒株在仔猪上的致病性。【结果】PDCoV 阳性病料接种 LLC-PK1 细胞后, 连续盲传至第 6 代(passage 6, P6), 细胞出现变大、变圆、皱缩脱落成单个或成簇密集颗粒的典型 CPE; IFA 鉴定 PDCoV 阳性, 表明成功分离出 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株。全基因组序列与系统发育分析表明, 本研究分离的 CHN/GSYD/2023 毒株与中国毒株亲缘关系更近, 与本实验室保存的 CHN/XJYN/2016 毒株位于不同的进化分支上; 5 日龄仔猪感染 CHN/GSYD/2023 毒株后, 仔猪发病率为 100% (5/5)。剖检及组织病理学显示, 仔猪小肠肠壁变薄, 肠腔内含大量积液, 回肠绒毛坏死等病理损伤。【结论】本研究从甘肃地区某猪场 PDCoV 阳性样品中成功分离出 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株。该毒株可在 LLC-PK1 细胞中稳定增殖传代, 对哺乳仔猪具有高致病性。

关键词: 猪德尔塔冠状病毒; 分离鉴定; 致病性

资助项目: 国家生猪技术创新中心项目(NCTIP-XD/C 03); 甘肃省科技重大专项(24ZD13NA008, 23ZDNA007)

This work was supported by the National Center of Technology Innovation for Pigs Project (NCTIP-XD/C 03) and the Major Science and Technology Project of Gansu Province (24ZD13NA008, 23ZDNA007).

*Corresponding authors. E-mail: YUAN Ligang, yuan2918@126.com; LIU Xinsheng, liuxinsheng@caas.cn

Received: 2026-02-10; Accepted: 2026-03-25; Published online: 2026-03-31

Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a porcine deltacoronavirus strain CHN/GSYD/2023

YU Ruiming¹, ZHANG Liping², ZHOU Peng², ZHANG Zhongwang², PAN Li², GUO Huichen², YUAN Ligang^{1*}, LIU Xinsheng^{2*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Animal Disease Control and Prevention, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy for Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: Porcine deltacoronavirus (PDCoV), a major porcine intestinal coronavirus, has caused enormous economic losses to the pig industry. Up to now, there is no commercial vaccine available. **[Objective]** To obtain the epidemic strain of PDCoV and study its biological characteristics and pathogenicity, thereby providing biological materials for the development of an effective vaccine against PDCoV as soon as possible. **[Methods]** LLC-PK1 cells were used to isolate the virus from PDCoV-positive samples from a pig farm in Gansu Province. The virus was identified by observation of cytopathic effect (CPE), indirect immunofluorescence assay (IFA), and whole genome sequencing. **[Results]** After blind passage of the PDCoV-positive LLC-PK1 cells to P6, the cells became larger and rounded, and then shrunk and shed into single or clustered dense particles, typical features of CPE. The IFA results confirmed successful isolation of the PDCoV strain CHN/GSYD/2023. The whole genome sequencing and phylogenetic analysis showed that CHN/GSYD/2023 isolated in this study was more closely related to the strain from China and was located on a different clade from the strain CHN/XJYN/2016 preserved in our laboratory. After 5-day-old piglets were infected with CHN/GSYD/2023, 100% (5/5) of piglets became diseased. Autopsy and histopathology of piglets showed thinning small intestinal wall, a large amount of effusion in the intestinal cavity, ileum intestinal villus necrosis and other pathological damage. **[Conclusion]** A PDCoV strain CHN/GSYD/2023 was successfully isolated from PDCoV-positive samples in a pig farm in Gansu. The strain can be stably proliferated and passaged in LLC-PK1 cells, and it is highly pathogenic to suckling piglets.

Keywords: porcine deltacoronavirus; isolation and identification; pathogenicity

冠状病毒(coronavirus, CoV)是一类具有包膜的单股正链 RNA 病毒, 属于尼多病毒目(Nidovirales), 冠状病毒科(Coronaviridae)^[1-2]。根据基因组序列, 冠状病毒可分为 α 、 β 、 γ 和 δ 共 4 个属。猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)属于 δ 冠状病毒属, 病毒粒子呈球形, 直径约 100 nm, 有囊膜及末端凸起的刺突, 基因组大小约 25.4 kb, 是目前已

知最小的冠状病毒^[3]。PDCoV 基因组的组成、排列与其他冠状病毒相似, 两端包含 5'非翻译区(untranslated region, UTR)和 3' UTR, 8 个开放阅读框(open reading frames, ORFs)分别编码多聚蛋白 pp1a/pp1b、纤突蛋白(spike, S)、包膜蛋白(envelope, E)、膜蛋白(membrane, M)、核衣壳蛋白(nucleocapsid, N)、非结构蛋白 6 (nonstructural protein 6, NS6) 和非结构蛋白 7 (nonstructural

protein 7, NS7)^[4]。PDCoV S 蛋白呈同源三聚体结构,以刺突状镶嵌于病毒颗粒表面,包含 S1 和 S2 2 个亚基。其中 3 个 S1 亚基组成头部,负责识别并结合宿主细胞表面受体;3 个 S2 亚基组成茎部,介导病毒包膜与宿主细胞膜的融合^[5-6]。S 蛋白具有高度免疫原性,在诱导机体产生中和抗体方面最为重要,因此也是疫苗研发的重要靶点^[7]。

PDCoV 是引起仔猪病毒性腹泻的重要病原之一^[8]。自 2012 年首次报道以来^[9],PDCoV 已在全球范围内广泛传播,严重危害多国生猪养殖产业^[10-11]。PDCoV 主要感染哺乳仔猪,其引起的仔猪呕吐、腹泻和脱水等临床症状与病理变化与传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、猪急性腹泻综合征冠状病毒(swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)及猪轮状病毒(porcine rotavirus, PoRV)所致者极为相似;且 PDCoV 与 PEDV 或 TGEV 等病原混合感染可导致更为严重的临床症状和更高的致死率^[11-12]。研究表明,PDCoV 在实验条件下可感染鸡、火鸡、牛等动物,具有跨物种传播潜力^[13-14]。然而,最新研究表明 PDCoV 可感染儿童,研究人员从 3 名海地急性未分化发热儿童血浆样本中分离到 PDCoV,基因组和进化分析表明,人类感染至少源于 2 个不同病毒谱系的跨种传播事件,这些病毒在编码 Nsp15 和 S 蛋白的基因中具有相同的突变特征;结构分析进一步预测,S1 亚基受体结合域中的 S1 亚基的 1 个氨基酸变化可能影响蛋白质的柔韧性及其与宿主细胞受体的结合^[15]。因此,PDCoV 与其他猪肠道病毒的共感染特性及其跨物种传播能力使其成为不容忽视的经济和公共卫生风险。

PDCoV 在适应环境变化过程中不断进化,频繁变异导致其跨物种传播能力持续增强。因此,分离和鉴定新的流行毒株尤为迫切。本研

究针对当前 PDCoV 流行毒株,通过病毒分离、鉴定及致病性分析阐明流行毒株的遗传变异规律,旨在为 PDCoV 流行病学监测及疫苗研发提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 病料

病料样本采自甘肃永登县某猪场腹泻猪的粪便及肠道内容物,于-80 °C 以下超低温冰箱中保存备用。

1.2 细胞、病毒和实验动物

猪肾细胞 LLC-PK1 细胞购自 ATCC (CL-101TM),由中国农业科学院兰州兽医研究所传代并保存。PDCoV CHN/XJYN/2016 毒株由本实验室前期分离并保存^[16]。PDCoV 抗原、抗体均为阴性的 5 日龄仔猪购自甘肃省某猪场。所有实验猪在兰州兽医研究所 ABSL-II 实验室内饲养,所有实验猪均接受人文关怀,并于实验结束时实施安乐死。本研究所有动物实验均获中国农业科学院兰州兽医研究所动物伦理委员会批准,编号为 LVRIAEC-2025-134。

1.3 主要试剂和仪器

EasstepTM Super Total RNA Extraction Kit, Promega 公司; One Step PrimeScriptTM RT-PCR Kit (Perfect Real Time), 宝生物工程(大连)有限公司; MEM 培养基、青链霉素双抗、PBS、胎牛血清、Trypsin (2.5%)、HEPES、NEAA, Gibco 公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), Invitrogen 公司; HiPure Viral RNA Kit, Magen Biotechnology 公司; PDCoV 抗 S 蛋白单克隆抗体由本实验室制备并保存^[17]。

低温高速离心机, Eppendorf 公司; CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad 公司; 倒置生物显微镜, Nikon 公司; FormaTM Steri-CycleTM CO₂ 孵育器和大屏幕数码倒置显微镜, ThermoFisher Scientific 公司; 生物安全柜, 苏州安泰公司。

1.4 病料处理

将从甘肃永登县某猪场采集的临床腹泻样品用含 1% 青链霉素双抗的 MEM 培养基 10 倍稀释后充分振荡, 4 °C、3 500 r/min 离心 30 min, 吸取上清液经 0.22 μ m 无菌滤膜过滤, 分装后于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.5 RT-qPCR

按照 Eastep™ Super Total RNA Extraction Kit 操作说明提取病毒 RNA, 利用 TaqMan 实时荧光定量 One Step PrimScript™ RT-PCR Kit 检测病料中 PDCoV 病毒滴度。所用 PDCoV N 基因特异性引物为 PDCoV-N-Forward (5'-ACGTCGTAAGACCCAGCATC-3') 和 PDCoV-N-Reverse (5'-CCCACCTGAAAGTTGCTCTC-3'), 探针为 PDCoV-N-probe (5'-CY5-GTATGGCTGATCCTCGCATCATGGC-BHQ2-3')。RT-qPCR 反应体系 (20 μ L): 2 $\times$ One Step RT-PCR Buffer III 10 μ L, TaKaRa *Ex Taq* HS (5 U/ μ L) 0.4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.4 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, PDCoV-N-probe 0.6 μ L, Nuclease-Free Water 5.8 μ L, RNA 2 μ L。反应条件: 42 °C 5 min, 95 °C 10s; 95 °C 5 s, 57 °C 20 s, 共 40 次循环。

1.6 病毒的分离和传代培养

将 LLC-PK1 细胞接种于 T25 细胞瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞密度达 70%–80% 时用无菌 PBS 洗涤 3 次备用。将处理好的病料上清液用 2 mL 含 1% NEAA、1% HEPES 和 20 μ g/mL Trypsin 的 MEM 稀释, 混匀后加入 T25 培养瓶中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h, 加入 2 mL MEM (含 20 μ g/mL 胰酶) 继续培养, 同时设置空白细胞作为阴性对照。每天观察细胞病变情况。在前几代, 病毒感染细胞后 CPE 较少甚至不出现, 此种情况下需于接种后 72 h 收集病毒, 于 -80 °C 中反复冻融 3 次后继续盲传, 直至出现明显细胞病变。待细胞病变达 90% 时收获病毒。

1.7 间接免疫荧光

以病毒生长培养基作为阴性对照, 将 LLC-PK1 细胞接种于 6 孔板中培养至单层, 弃去培养液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。以 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株感染 LLC-PK1 细胞, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.01。接种 24 h 后, 弃去培养基并用 PBS 洗涤细胞 3 次。用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 加入 1 mL 0.25% Triton X-100 渗透, 室温静置 10 min。PBS 洗涤 3 次后, 用 5% BSA 室温封闭 1 h。每孔加入 1:1 000 稀释的小鼠抗 PDCoV S 蛋白单克隆抗体 (本实验室制备和保存), 37 °C 孵育 1 h。随后加入稀释的 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体, 37 °C 孵育 1 h。最后用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色 5 min, PBS 洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 半数组织培养物感染量测定

将冻融收集的病毒液室温融化, 3 500 r/min 离心 2 min, 取上清, 用 MEM 培养基 (胰酶浓度 20 μ g/mL) 将病毒进行连续 10 倍稀释, 即 10⁻¹, 10⁻², ... (根据病毒大致滴度确定稀释倍数); 然后用排枪将细胞接种至 96 孔板中, 细胞汇合度控制在 80% 左右, PBS 洗涤 2 次, 再以无血清 MEM 洗涤 1 次。每个稀释度取 100 μ L 加入 96 孔板, 每个稀释度设 8 个重复孔, 再补加 100 μ L MEM, 终体积为 200 μ L。设置空白对照, 即加入 200 μ L MEM。置于 37 °C 培养, 每天观察细胞病变并记录病变孔数, 以 Reed-Muench 法计算半数组织培养物感染量 (50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀)。

1.9 病毒复制动力学

将 MOI 为 0.01 的病毒液接种至长满单层的 LLC-PK1 细胞 T25 培养瓶中, 体系中胰酶终浓度为 20 μ g/mL。分别于感染后 0、6、12、24、36、48、60、72 h (hours post-infection, hpi) 收获病毒培养物, 测定各时间点 TCID₅₀, 绘制病毒

生长曲线。

1.10 病毒全基因组高通量测序

高通量测序(又称二代测序、深度测序)技术,通过大规模平行测序方式可快速无差别地测定样本中所有核酸。根据 HiPure Viral RNA Kit 操作说明提取 PDCoV CHN/GSYD/2023 第 6 代(passage 6, P6)细胞培养物中的病毒 RNA。核酸经文库构建、上机测序后转化为生物信息学软件可识别的数据格式,再经软件流程质控、去除 rRNA、宿主序列及细菌等冗余序列后获得初步病毒数据,最终经组装、比对、注释等分析流程获得病毒基因组信息。

1.11 系统发育树分析

将 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株与 GenBank 中 39 株 PDCoV 完整基因组序列(表 1)进行系统发育分析。系统发育树采用 MEGA 7.0 基于距离的邻接法构建,以 1 000 个重复数据集进行了 bootstrap 分析。

1.12 仔猪致病性实验

15 头 5 日龄健康新生仔猪购自无 PDCoV 感染或疫苗接种史的商品化猪场。接种前采集仔猪血清检测 PDCoV 特异性抗体,同时采集直肠拭子进行 RT-qPCR 检测,确认 PDCoV、PEDV、TGEV 和 PoRV 等主要猪肠道病毒均为阴性。所有仔猪随机分为 3 组,每组 5 头,分笼分圈饲养。G1 组每头仔猪口服 1 mL CHN/GSYD/2023-P6 病毒液($10^{4.91}$ TCID₅₀/mL), G2 组每头仔猪口服 1 mL CHN/XJYN/2016-P6 病毒液($10^{4.80}$ TCID₅₀/mL), G3 组每头仔猪口服 1 mL MEM 作为对照。实验期间,每天监测并记录仔猪临床体征(腹泻、呕吐、厌食等),并对粪便稠度评分:固体为 0 分,糊状为 1 分,半流质(轻度腹泻)为 2 分,液体(重度腹泻)为 3 分。实验结束后采集肠道组织进行组织病理学检查。

1.13 组织病理学和免疫组化分析

感染 7 d 后对试验仔猪实施安乐死并解剖,取回肠组织以 4% 多聚甲醛常温固定 48 h,经脱

水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片后,于显微摄像系统下采集图像。同时,采用 PDCoV S 蛋白特异性单克隆抗体(本实验室保存)对肠道组织进行免疫组化(immunohistochemistry, IHC)分析。

2 结果与分析

2.1 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株的分离鉴定

将 RT-qPCR 检测 PDCoV 阳性的粪便样品处理后接种于 LLC-PK1 细胞,进行连续盲传。结果显示,传至第 5 代(passage 5, P5)时未观察到明显细胞病变效应(cytopathic effect, CPE);传至 P6 时,显微镜下可见细胞变大、变圆,出现单个或成簇存在的密集颗粒细胞及细胞皱缩、脱落等典型 CPE;继续传至 P7,仍可观察到明显 CPE(图 1A–1C)。将 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株 P5、P6 和 P7 以 MOI=0.01 接种至铺满 LLC-PK1 细胞的 35 mm 培养皿中,以小鼠抗 PDCoV S 蛋白特异性单克隆抗体进行间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)鉴定。结果表明,24 hpi 后, P5、P6 和 P7 感染的 LLC-PK1 细胞中均可观察到绿色荧光,表明 CHN/GSYD/2023 毒株 P5、P6 和 P7 可在 LLC-PK1 细胞中稳定复制(图 1D–1F)。

2.2 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株的增殖动力学

将 PDCoV CHN/GSYD/2023 或 CHN/XJYN/2016 毒株 P6 接种于 LLC-PK1 细胞,于 0、6、12、24、36、48、60、72 hpi 收取病毒液,测定各时间点 TCID₅₀,比较分析 2 株病毒的增殖动力学。结果显示, PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株感染 LLC-PK1 细胞后可持续增殖,60 hpi 时病毒 TCID₅₀ 达峰值($10^{4.91}$ TCID₅₀/mL),随后略有下降,与 CHN/XJYN/2016 毒株相比差异不显著(图 2)。

表1 PDCoV参考毒株信息

Table 1 Information of PDCoV reference strains

Strain names	GenBank accession No.	Year	Origin
CHN/AH/2004	KP757890.1	2004	China
CHN/AH-81/2018	MN520193.1	2018	China
CHN/CH-01/2016	KX443143.2	2016	China
CHN/CHGD/2016	MH715491.1	2016	China
CHN/GD-1/2018	MN520202.1	2018	China
CHN/GS/2016	MF642322.1	2016	China
CHN/HB/2014	KP757891.1	2014	China
CHN/HKU15-155/2010	NC_039208.1	2010	China
CHN/HN/2014	KT336560.1	2014	China
CHN/HNZK-04/2018	MH708124.1	2018	China
CHN/Hunan/2014	KY513724.1	2014	China
CHN/JS/2014	KP757892.1	2014	China
CHN/JXJGS01/2016	KY293677.1	2016	China
CHN/NH/2015	KU981059.1	2015	China
CHN/QH/2017	MF642325.1	2017	China
CHN/SD/2014	MF431743.1	2014	China
CHN/Tianjin/2016	KY065120.1	2016	China
CHN/XJYN/2016	MN064712.1	2016	China
JPN/HKD/2016	LC260045.1	2016	Japan
JPN/IWT/2014	LC260041.1	2014	Japan
KOR/DH1/2016	KY354363.1	2016	Korea
KOR/DH2/2016	KY354364.1	2016	Korea
LAO/BTL-0115/2016	KX118627.1	2016	Laos
THA/S5015L/2015	KU051649.1	2015	Thailand
THA/TT-1115/2015	KU984334.1	2015	Thailand
USA/Arkansas61/2015	KR150443.1	2015	United States of America
USA/HKU15-SD3424/2014	KJ584356.1	2014	United States of America
USA/IA-8734/2014	KJ567050.1	2014	United States of America
USA/IL/2014	KP981395.1	2014	United States of America
HT/Human-0081-4/2014	MW685622.1	2014	Haiti
HT/Human-0256-1/2015	MW685623.1	2015	Haiti
HT/Human-0329-4/2015	MW685624.1	2015	Haiti
USA/Illinois134/2014	KJ601778.1	2014	United States of America
USA/Indiana453/2014	KR265851.1	2014	United States of America
USA/Iowa136/2015	KX022602.1	2015	United States of America
USA/Nebraska210/2014	KR265861.1	2014	United States of America
USA/NorthCarolina452/2014	KR265858.1	2014	United States of America
USA/OhioCVM1/2014	KJ769231.1	2014	United States of America
VNM/HaNoi6/2015	KX834351.1	2015	Vietnam

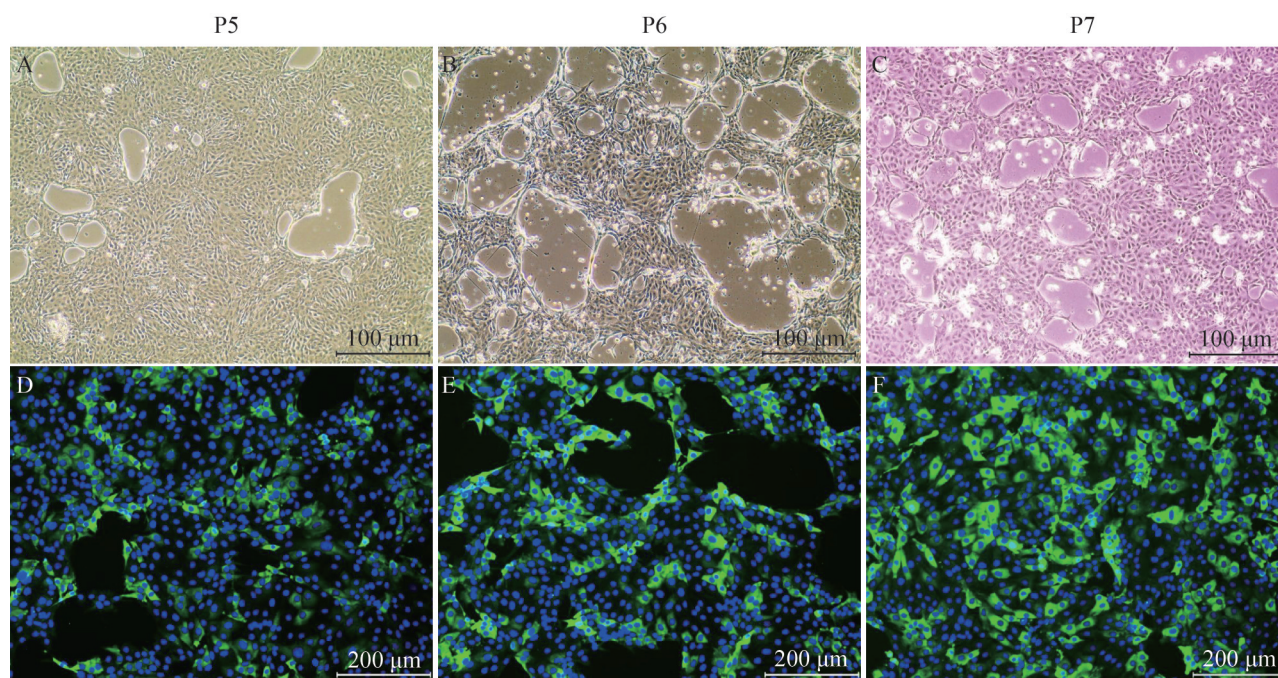


图1 PDCoV CHN/GSYD/2023毒株的分离与鉴定

Figure 1 Isolation and identification of PDCoV CHN/GSYD/2023 strain. A–C: The CPE of PDCoV CHN/GSYD/2023 P5, P6 and P7 was observed under a microscope (200 $\times$); D–F: After LLC-PK1 cells were infected with PDCoV CHN/GSYD/2023 P5, P6 and P7 for 24 h. Mouse anti-PDCoV S protein monoclonal antibody was used as the primary antibody, and Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG was used as the secondary antibody to detect PDCoV antigen. The green fluorescence signal was observed under a fluorescence microscope.

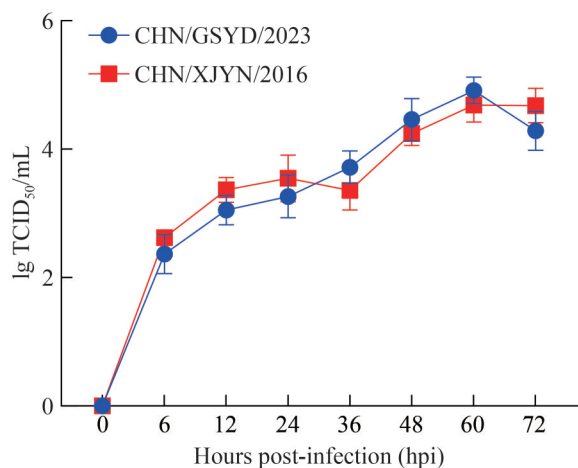


图2 PDCoV CHN/GSYD/2023毒株在LLC-PK1细胞中的增殖动力学

Figure 2 Proliferation kinetics of PDCoV CHN/GSYD/2023 strain in LLC-PK1 cells.

2.3 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株全基因组测序及系统进化分析

对 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株进行全基因组测序分析(GenBank 登录号为 PZ065654), 结果显示该毒株基因组全长为 25 394 nt (不含 polyA 尾)。系统进化分析表明, 所有 PDCoV 毒株遗传进化上亲缘关系密切, 序列相似性高, 提示其可能起源于共同祖先。美国、韩国和日本的 PDCoV 分离株聚于同一分支, 亲缘关系较近, 可能源于同一毒株; 越南、老挝和泰国的分离株归于另一分支, 且东南亚分离株与中国毒株亲缘关系较近。本研究分离的 CHN/GSYD/2023 毒株与本实验室保存的 CHN/XJYN/2016 毒株位于不同进化分支(图 3)。

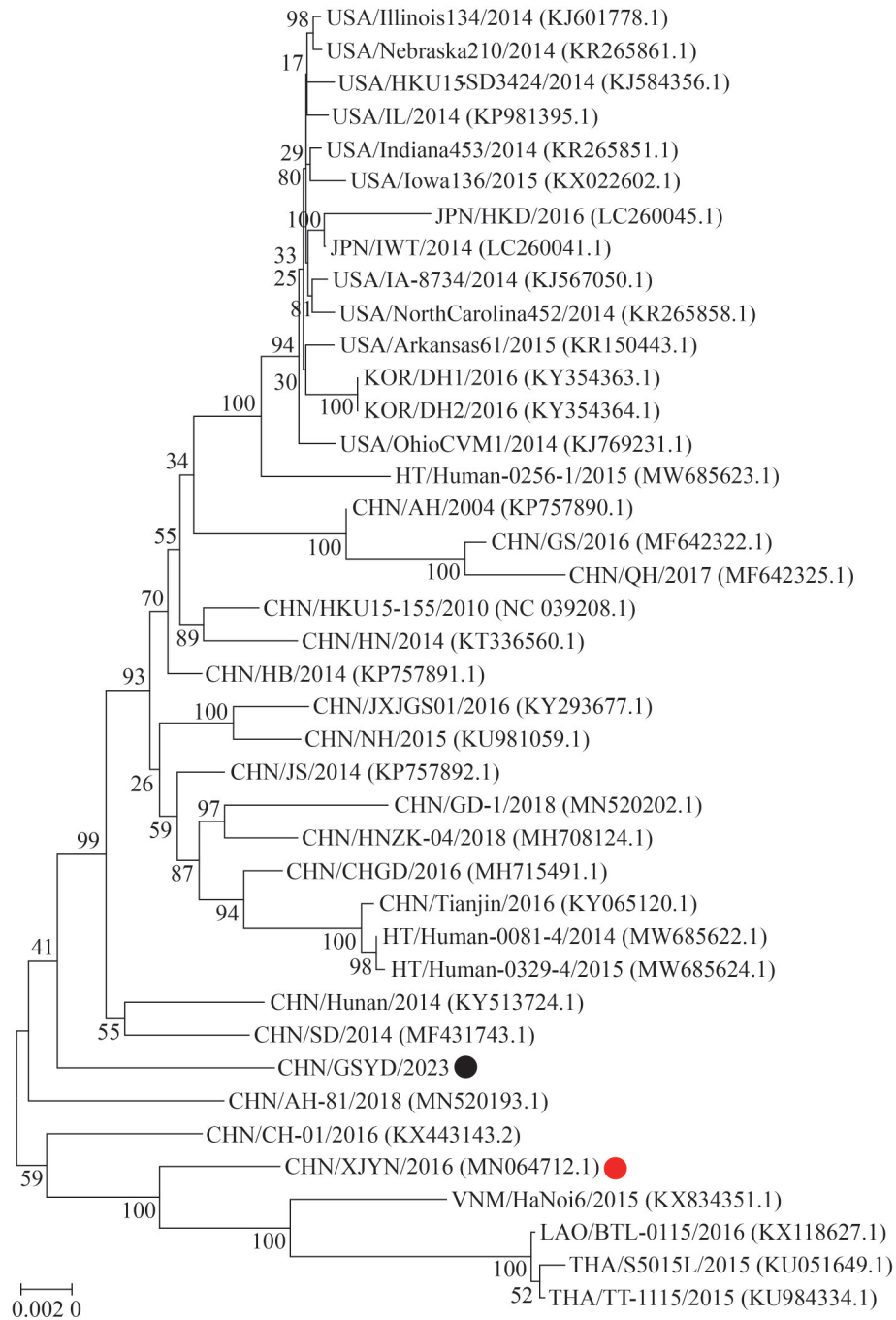


图3 PDCoV CHN/GSYD/2023毒株系统发育树分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of PDCoV CHN/GSYD/2023 strain. The phylogenetic tree was constructed based on multiple sequence alignment, and the neighbor-joining method was used for inference. The number on each node in the figure represents the bootstrap value (percentage) of the branch, reflecting the confidence of the corresponding branch. The serial number in the brackets is the GenBank accession number, which is used to identify each strain. The strain labeled with black dots is the strain isolated in this study. The scale represents the genetic distance.

选有代表的毒株对其 S 蛋白氨基酸序列进行比对分析, 结果发现 S 蛋白变异位点主要集中在 NTD、CTD 及 S1 和 S2 亚基裂解位点附近(图 4)。根据突变位点在 S 蛋白三维结构中的位

置分析(图 5), 这些突变位点多位于 S 蛋白结构表面, 而表面氨基酸对抗体识别至关重要, 其频繁突变可能有助于病毒免疫逃逸。本研究分离的 CHN/GSYD/2023 毒株 S 蛋白存在 11 个独

	14	34	38	40	42	44	45	46	52	57	64	100	107	111
CHN/GSYD/2023	V	F	L	S	S	N	L	H	—	I	K	H	L	V
CHN/XJYN/2016	V	L	P	G	S	T	L	Y	N	V	K	H	L	I
USA/OhioCVM1/2014	V	F	P	R	S	S	L	Y	N	V	K	H	L	I
THA/TT-1115/2015	A	F	P	R	D	S	L	Y	—	V	K	Q	Q	I
CHN/HKU15-155/2010	V	F	L	S	S	S	L	Y	—	V	K	H	Q	I
CHN/Tianjin/2016	V	F	L	S	S	S	F	Y	—	V	E	H	L	I
HT/Hunan-0081/2014	V	F	L	S	S	S	F	Y	—	V	E	H	L	I
	125	136	137	140	149	159	162	178	229	231	235	276	291	326
CHN/GSYD/2023	T	I	A	H	R	E	Y	E	H	A	V	E	V	I
CHN/XJYN/2016	S	T	A	H	H	E	N	E	H	S	A	E	A	V
USA/OhioCVM1/2014	T	T	A	H	H	E	N	E	H	S	A	E	A	V
THA/TT-1115/2015	T	I	A	R	A	D	N	Q	Q	S	A	Q	A	V
CHN/HKU15-155/2010	T	T	A	H	H	E	N	E	H	A	A	E	A	V
CHN/Tianjin/2016	T	T	V	H	R	E	N	E	H	S	A	E	A	V
HT/Hunan-0081/2014	T	T	V	H	R	E	N	E	H	S	A	E	A	V
	336	348	350	527	530	534	551	553	571	590	624	639	642	666
CHN/GSYD/2023	V	M	T	A	F	E	A	T	V	A	A	N	Q	I
CHN/XJYN/2016	V	M	T	T	F	K	A	T	V	A	A	N	Q	L
USA/OhioCVM1/2014	V	M	T	A	F	K	V	I	V	A	A	N	K	L
THA/TT-1115/2015	V	L	R	A	L	K	A	T	I	A	V	S	K	L
CHN/HKU15-155/2010	V	M	T	A	F	K	A	T	V	S	A	N	Q	L
CHN/Tianjin/2016	A	M	T	A	F	K	A	T	V	A	A	N	Q	L
HT/Hunan-0081/2014	A	M	T	A	F	K	A	T	V	A	A	N	Q	L
	668	670	698	702	867	887	907	947	955	956	1 000	1 016	1 146	1 150
CHN/GSYD/2023	P	I	A	D	T	I	S	S	T	R	N	V	Y	Q
CHN/XJYN/2016	T	L	A	D	T	I	P	F	T	R	T	V	Y	L
USA/OhioCVM1/2014	T	I	S	D	T	I	S	S	T	R	T	I	Y	Q
THA/TT-1115/2015	S	V	S	N	N	I	P	S	T	R	T	V	Y	Q
CHN/HKU15-155/2010	T	L	A	D	T	V	S	S	T	R	T	V	S	Q
CHN/Tianjin/2016	T	L	A	D	T	I	S	S	I	K	T	I	Y	Q
HT/Hunan-0081/2014	T	L	A	D	T	I	S	S	I	K	T	I	Y	Q

图4 PDCoV不同毒株S蛋白氨基酸序列比对分析

Figure 4 Amino acid sequence alignment analysis of S protein of different PDCoV strains.

有突变位点(图 5A、5B), 主要集中在 NTD、CTD 和膜融合肽附近, 这些位点可能对该毒株的致病性具有重要影响。

2.4 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株对哺乳仔猪具有高致病性

为确定 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株对仔猪的致病性, 以 P6 对 5 日龄哺乳仔猪进行攻毒试验, 并以本实验室保存的 CHN/XJYN/2016 毒

株作为对照。结果显示, G1 组和 G2 组所有仔猪均出现水样腹泻、呕吐、精神抑郁等临床症状, 直肠拭子样本检测 PDCoV RNA 阳性; G3 对照组所有仔猪健康状态良好, 无腹泻、呕吐等临床症状, 直肠拭子样本检测 PDCoV RNA 阴性(表 2, 图 6)。剖检大体病理学检查发现, G1 组和 G2 组仔猪小肠肠壁变薄, 肠腔内含大量积液和气体(图 7B、7F); G3 对照组仔猪肠道

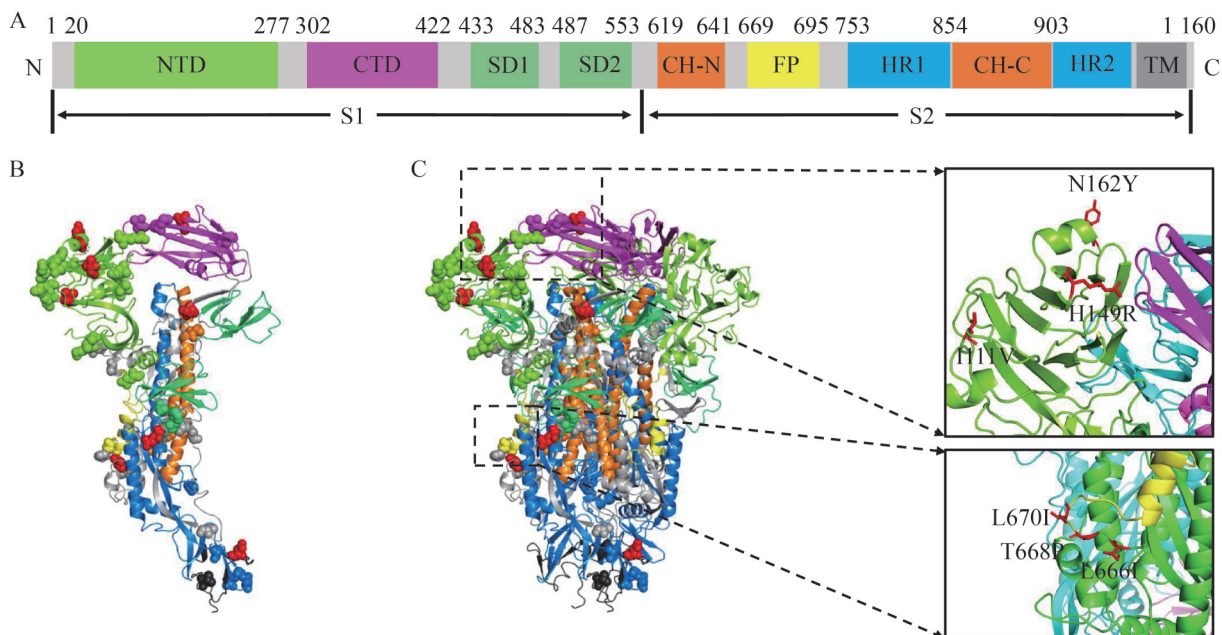


图5 PDCoV CHN/GSYD/2023毒株S蛋白氨基酸突变位点分析

Figure 5 Analysis of amino acid mutation sites of S protein of PDCoV CHN/GSYD/2023 strain. A: Schematic diagram of the PDCoV S protein; B–C: The S protein mutation site of PDCoV CHN/GSYD/2023 strain was displayed in the three-dimensional structure of S protein, and the amino acid mutation residues were displayed in a spherical structure, in which the red spherical structure represented the unique mutation of CHN/GSYD/2023 strain. Important amino acid mutations are shown by local amplification schematics.

表2 仔猪感染PDCoV CHN/GSYD/2023毒株后的临床症状

Table 2 Clinical symptoms of piglets infected with PDCoV strain

Group	Number	PDCoV strain	Incidence	C_T value
G1	5	PDCoV CHN/GSYD/2023	5/5 (100)	20.37±3.25
G2	5	PDCoV CHN/XJYN/2016	5/5 (100)	21.37±2.78
G3	5	MEM	0/5 (0)	34.15±1.27

A cutoff point was set at 30; C_T values greater than 30 were considered negative or below the detection limit of real-time reverse transcription quantitative PCR.

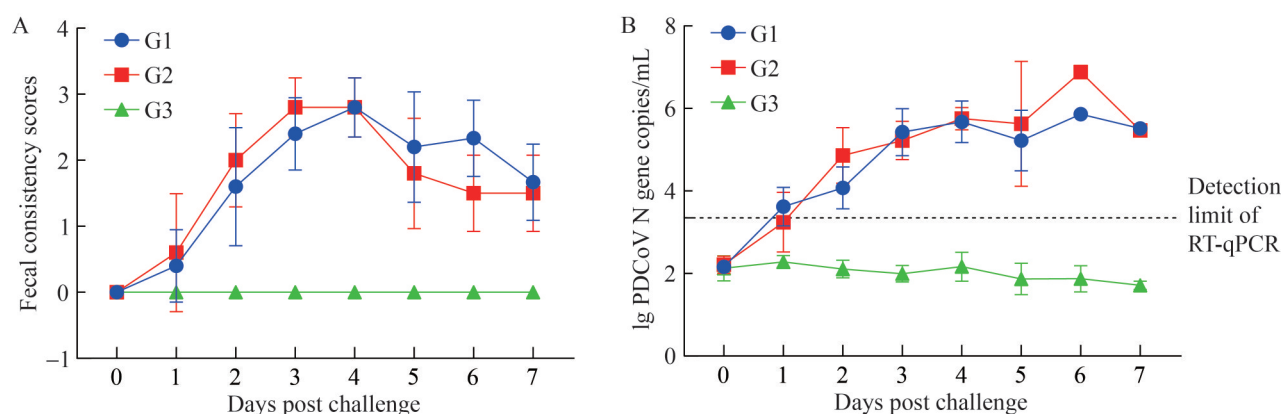


图6 仔猪腹泻评分及排毒动力学曲线

Figure 6 The fecal consistency scores and detoxification kinetics curve of piglets. A: The fecal consistency scores of piglets. Clinical signs of diarrhea were scored as normal=0; pasty=1; semiliquid=2; liquid=3; B: The detoxification kinetics curve of piglets. PDCoV copies was calculated according to formula $\lg X = (41.58 - C_T \text{ value})/3.46$.

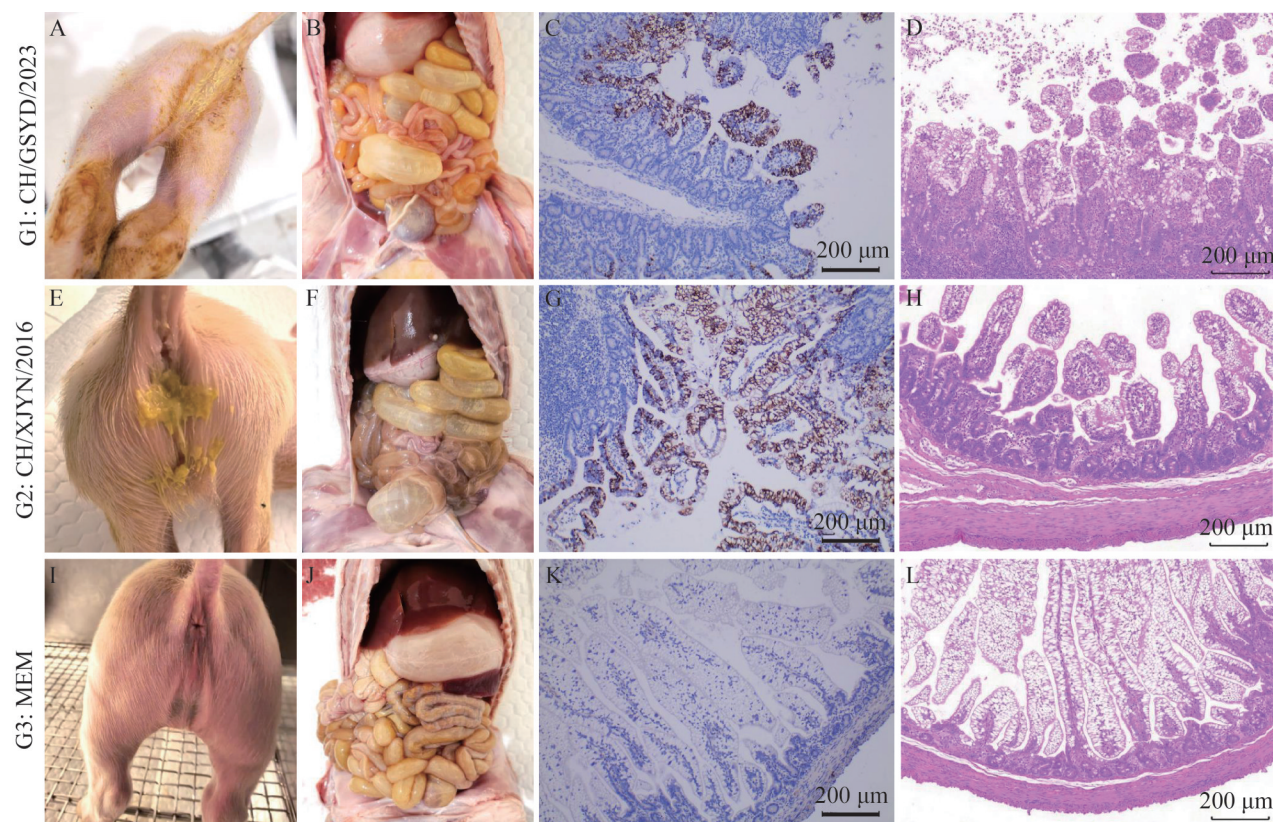


图7 仔猪临床症状、剖检、组织病理学和免疫组化分析

Figure 7 Clinical symptoms, necropsy, histopathological and immunohistochemical analysis of piglets. A–D: Examination of piglets in PDCoV CHN/GSYD/2023 group; E–H: Examination of piglets in PDCoV CHN/XJYN/2016 group; I–L: Examination of piglets in MEM group.

组织正常, 未见病理变化(图 7J)。免疫组化分析结果显示, G1 组和 G2 组仔猪回肠肠上皮细胞上可见大量 PDCoV 抗原(图 7C、7G); G3 组仔猪回肠肠上皮细胞未观察到 PDCoV 抗原(图 7K)。组织病理学结果显示, G1 组和 G2 组仔猪回肠可见肠绒毛坏死、固有层细胞坏死、黏膜下水肿、淋巴细胞和中性粒细胞浸润等病理损伤(图 7D、7H); 而 G3 组仔猪回肠组织未观察到病理损伤(图 7L)。G1 组和 G2 组仔猪回肠组织肠绒毛高度与隐窝深度的比值均显著低于 G3 组(图 8)。

3 讨论与结论

PDCoV 作为一种新发猪肠道冠状病毒, 已给全球生猪养殖业带来巨大经济损失。对于病毒性疾病的防控, 疫苗接种仍是目前最有效的手段, 但目前尚无针对 PDCoV 的有效商品化疫苗^[18]。为尽快研发能有效防控 PDCoV 的疫苗, 本研究从腹泻仔猪病料中分离出 1 株具有高致病性的 PDCoV 毒株 CHN/GSYD/2023。

PDCoV 的体外分离中, 细胞系的选择至关重要。已有研究表明, PDCoV 可在 LLC-PK1 细

胞(ATCC 编号为 CL-101)或 ST 细胞(ATCC 编号为 CRL1746)中稳定增殖和传代^[19-21]。因此, 根据本实验室已有的细胞系资源, 本研究选择 LLC-PK1 细胞对 PDCoV 流行毒株进行分离鉴定和连续传代培养。将处理后的阳性病料接种 LLC-PK1 细胞后, 连续盲传至 P6, 细胞出现变大、变圆, 继而皱缩脱落成单个或成簇存在的密集颗粒等典型 CPE (图 1B), 这与 Gao 等^[16]的研究结果一致。随后, 通过 IFA 检测 P5、P6 和 P7 病毒 S 蛋白在 LLC-PK1 细胞中的表达, 可见特异性荧光信号(图 1D-1F), 表明成功分离到 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株。TCID₅₀ 测定结果(图 2)表明, PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株可在 LLC-PK1 细胞中稳定增殖, 60 hpi 时病毒 TCID₅₀ 达峰值($10^{4.91}$ TCID₅₀/mL), 随后有所下降, 与 CHN/XJYN/2016 毒株相比差异不显著。

截至目前, PDCoV 已在中国、美国、日本、韩国和东南亚地区分化出 3 个遗传分支^[22-23]。自 2014 年以来, 中国谱系一直是 PDCoV 进化传播的主要分支; 同时, 作为现有疫苗研发的参考谱系, 紧跟其流行趋势和演变规律极为重要^[24-25]。本研究对分离的 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株进行了全基因组测序, 并与 GenBank 中 39 株 PDCoV 全基因组序列进行了比对和系统发育分析。结果表明, CHN/GSYD/2023 毒株与中国毒株亲缘关系更近, 与本实验室保存的 CHN/XJYN/2016 毒株位于不同的进化分支上, 而 CHN/XJYN/2016 毒株与越南毒株亲缘关系更为接近(图 3)。S 蛋白氨基酸序列比对和突变位点分析表明, CHN/GSYD/2023 毒株 S 蛋白存在 11 个独有突变位点(图 5A、5B), 主要集中在 NTD、CTD 和膜融合肽附近, 这些位点的突变是否影响其致病性, 有待后续试验进一步验证。

已有研究表明, PDCoV 毒株在临床致病性上存在差异, 某些高致病毒株可引起新生仔猪急性水样腹泻、脱水甚至死亡, 从而对养猪业造成重大经济损失^[26]。本研究中, PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株和 CHN/XJYN/2016 毒株均可

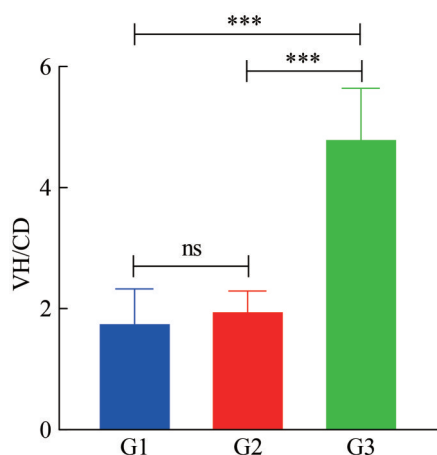


图8 仔猪回肠组织的肠绒毛高度和隐窝深度的比值

Figure 8 Ratio of villus height to crypt depth in ileum of piglets. ns: $P > 0.05$; ***: $P < 0.001$.

致 5 日龄哺乳仔猪 100% (5/5) 发病。剖检和组织病理学结果显示, 仔猪小肠肠壁变薄, 肠腔内含大量积液, 回肠肠绒毛坏死, 固有层细胞坏死, 黏膜下水肿, 淋巴细胞和中性粒细胞浸润等病理损伤。对照组仔猪健康状态良好, 剖检未见肠道组织损伤。然而, 本研究样本量较小 ($n=5$), 具有一定局限性, 后续研究将考虑增大样本量(如 15 头/组或设置多个重复组), 以获得更为稳健的数据。

综上所述, 本研究从甘肃地区某猪场 PDCoV 阳性样品中成功分离出 PDCoV CHN/GSYD/2023 毒株。该毒株可在 LLC-PK1 细胞中稳定增殖传代, 全基因组系统发育分析表明其与中国毒株亲缘关系更近, 与本实验室保存的 CHN/XJYN/2016 毒株位于不同的进化分支上。该毒株感染 5 日龄哺乳仔猪可致 100% (5/5) 发病, 并引起严重的肠道组织病理损伤。

作者贡献声明

于瑞明: 实验设计、实验操作、初稿写作; 张莉萍: 数据收集和处理; 周鹏: 数据分析、动物实验操作; 张中旺: 数据分析及文献查找; 潘丽、郭慧琛: 监督指导、经费支持; 袁莉刚: 监督指导、稿件润色修改; 刘新生: 数据分析、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 181-192.
- [2] Kesheh MM, Hosseini P, Soltani S, Zandi M. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2022, 32(2): e2282.
- [3] Jung K, Hu H, Saif LJ. Porcine deltacoronavirus infection: etiology, cell culture for virus isolation and propagation, molecular epidemiology and pathogenesis[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 50-59.
- [4] Shan XT, Li R, Ma X, Qiu GQ, Xiang Y, Zhang XJ, Wu D, Wang L, Zhang JH, Wang T, Li WF, Xiang Y, Song HH, Niu D. Epidemiology, pathogenesis, immune evasion mechanism and vaccine development of porcine Deltacoronavirus[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2024, 24(3): 79.
- [5] Shang J, Zheng Y, Yang Y, Liu C, Geng QB, Tai WB, Du LY, Zhou YS, Zhang W, Li F. Cryo-electron microscopy structure of porcine deltacoronavirus spike protein in the prefusion state[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(4): e01556-17.
- [6] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annual Review of Virology*, 2016, 3: 237-261.
- [7] Du WJ, Debski-Antoniak O, Drabek D, van Haperen R, van Dortmond M, van der Lee J, Drulyte I, van Kuppeveld FJM, Grosveld F, Hurdiss DL, Bosch BJ. Neutralizing antibodies reveal cryptic vulnerabilities and interdomain crosstalk in the porcine deltacoronavirus spike protein[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 5330.
- [8] Ye X, Chen YJ, Zhu XY, Guo JH, Xie D, Hou ZZ, Xu SG, Zhou JW, Fang LR, Wang D, Xiao SB. Cross-species transmission of deltacoronavirus and the origin of porcine deltacoronavirus[J]. *Evolutionary Applications*, 2020, 13(9): 2246-2253.
- [9] Woo PCY, Lau SKP, Lam CSF, Lau CCY, Tsang AKL, Lau JHN, Bai R, Teng JLL, Tsang CCC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(7): 3995-4008.
- [10] Zhang JQ. Porcine deltacoronavirus: overview of infection dynamics, diagnostic methods, prevalence and genetic evolution[J]. *Virus Research*, 2016, 226: 71-84.
- [11] Wang QH, Vlasova AN, Kenney SP, Saif LJ. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs[J]. *Current Opinion in Virology*, 2019, 34: 39-49.
- [12] Zhang FF, Luo YY, Lin C, Tan MF, Wan PW, Xie BB, Xiong LG, Ji HY. Epidemiological monitoring and genetic variation analysis of pathogens associated with porcine viral diarrhea in Southern China from 2021 to 2023[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1303915.
- [13] Boley PA, Alhamo MA, Lossie G, Yadav KK, Vasquez-Lee M, Saif LJ, Kenney SP. Porcine deltacoronavirus infection and transmission in poultry, United States[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(2): 255-265.
- [14] Jung K, Hu H, Saif LJ. Calves are susceptible to infection with the newly emerged porcine deltacoronavirus, but not with the swine enteric alphacoronavirus, porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(8): 2357-2362.
- [15] Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, Elbadry MA, Alam MM, Stephenson CJ, Bonny TS, Loeb JC, Telisma T, Chavannes S, Ostrov DA, Mavian C, Beau De Rochars VM, Salemi M, Morris JG Jr. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children[J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 133-137.

- [16] Gao X, Zhao DH, Zhou P, Zhang LP, Li MX, Li WY, Zhang YG, Wang YL, Liu XS. Characterization, pathogenicity and protective efficacy of a cell culture-derived porcine deltacoronavirus[J]. *Virus Research*, 2020, 282: 197955.
- [17] Bai YJ, Yu RM, Zhou GQ, Zhang LP, Wang TT, Liu Y, Wang DS, Zhang ZW, Wang YL, Guo HC, Pan L, Liu XS. A novel double-antibody sandwich ELISA based on monoclonal antibodies against the viral spike protein detects porcine deltacoronavirus infection[J]. *Microbiology Spectrum*, 2025, 13(4): e02854-24.
- [18] Liu Q, Wang HY. Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis[J]. *Veterinary Research Communications*, 2021, 45(2/3): 75-86.
- [19] Dong N, Fang LR, Yang H, Liu H, Du T, Fang PX, Wang D, Chen HC, Xiao SB. Isolation, genomic characterization, and pathogenicity of a Chinese porcine deltacoronavirus strain CHN-HN-2014[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 196: 98-106.
- [20] Hu H, Jung K, Vlasova AN, Chepngeno J, Lu ZY, Wang QH, Saif LJ. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(5): 1537-1548.
- [21] Xu ZC, Zhong HL, Zhou QF, Du YP, Chen L, Zhang Y, Xue CY, Cao YC. A highly pathogenic strain of porcine deltacoronavirus caused watery diarrhea in newborn piglets[J]. *Virologica Sinica*, 2018, 33(2): 131-141.
- [22] He WT, Ji X, He W, Dellicour S, Wang SL, Li GR, Zhang LT, Gilbert M, Zhu HN, Xing G, Veit M, Huang Z, Han GZ, Huang YW, Suchard MA, Baele G, Lemey P, Su S. Genomic epidemiology, evolution, and transmission dynamics of porcine deltacoronavirus[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(9): 2641-2654.
- [23] Li B, Gao YH, Ma Y, Shi KC, Shi YW, Feng SP, Yin YW, Long F, Sun WC. Genetic and evolutionary analysis of porcine deltacoronavirus in Guangxi Province, Southern China, from 2020 to 2023[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(2): 416.
- [24] Yao X, Lu WH, Qiao WT, Zhang YQ, Zhang BY, Li HX, Li JL. The highly pathogenic strain of porcine deltacoronavirus disrupts the intestinal barrier and causes diarrhea in newborn piglets[J]. *Virulence*, 2025, 16: 2446742.
- [25] Wang YN, Ma XY, Zhang H, Xue XH, Li JX, Jiang YP, Cui W, Liu DD, Zhou B, Wang L. Molecular characterization and pathogenicity of a novel Chinese porcine deltacoronavirus strain CH/HLJ/20 isolated from diarrheic piglets[J]. *Virulence*, 2026, 17: 2605366.
- [26] Zhang YQ, Wang B, Wei WQ, Lu W, Du EZ, Liu Y, Yang YL, Huang YW. Genetic and pathogenic characterization of a porcine deltacoronavirus strain isolated in Zhejiang Province, China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2025, 2025: 4084814.