



一株猪流行性腹泻病毒 G2b 亚型细胞适应性毒株的复制特性及致病性

杨帆¹, 胡国芳¹, 魏子文¹, 周莹珊¹, 宋厚辉¹, 何海健^{2*}, 董婉玉^{1*}, 王晓杜^{1*}

(1. 浙江农林大学动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室/动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心/浙江省动物医学与健康国际科技合作基地/同一健康和食品安全“一带一路”国际联合实验室/中澳动物健康大数据分析联合实验室, 杭州 311300; 2. 金华职业技术大学农学院, 金华 321017)

摘要: 旨在探究猪流行性腹泻病毒(PEDV)流行株细胞适应后的复制特性及致病性, 本研究将分离自某规模化猪场的 PEDV 流行毒株在 Vero 细胞中连续传代至不同代次, 分别评价该毒株在细胞上的生物学特性, 并将第 25 代和第 141 代病毒接种至 3 日龄仔猪, 以比较其致病性差异。结果表明: 临床病料接种液盲传至第 4 代时, 在 Vero 细胞上形成 PEDV 典型合胞体病变; 传代至 25 代时, 细胞病变形态与病毒滴度趋于稳定; 传代至 141 代时, 病毒滴度显著提高, 并诱发更快速的细胞病变效应。间接免疫荧光试验(IFA)可特异性检出 PEDV N 蛋白表达, 序列分析表明该毒株为 G2b 型。仔猪攻毒试验表明, 与亲本低代次毒株(YJH/2017/F25)相比, YJH/2017/F141 接种组未出现明显临床症状或组织病理损伤, 且肛拭子病毒排放量显著减少, 各项指标与 DMEM 对照组无显著差异, 该毒株的致病性较低而具有较好安全性。以上结果说明该流行毒株在体外连续传代后获得了更好的细胞适应性且对新生仔猪的致病性降低, 本研究为 PEDV 弱毒疫苗研发提供新的候选毒株, 其全基因组序列和生物学特征也为后续重组病毒研究奠定了基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; G2b 型; 细胞适应毒株; 生物学特性

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0955-10

Replication Characteristics and Pathogenicity of a Cell-Adapted Porcine Epidemic Diarrhea Virus G2b Strain

YANG Fan¹, HU Guofang¹, WEI Ziwen¹, ZHOU Yingshan¹, SONG Houhui¹, HE Haijian^{2*},
DONG Wanyu^{1*}, WANG Xiaodu^{1*}

(1. Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Engineering Research Center for Veterinary Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, “Belt and Road” International Joint Laboratory for One Health and Food Safety, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Veterinary Medicine of Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China; 2. College of Agriculture, Jinhua University of Vocational Technology, Jinhua 321017, China)

收稿日期: 2025-06-03

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY23C180003); 浙江省领雁计划项目(2023C02023; 2023C02022); 浙江省自然科学基金基础公益项目(LTGN24C180001); 金华市科技计划项目(2023-2-022)

作者简介: 杨帆, 主要从事猪流行性腹泻病毒复制机制研究, E-mail: 17615848963@163.com

* 通信作者: 王晓杜, 主要从事猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪流行性腹泻病毒等病毒的病毒学和免疫学研究, E-mail: xdwang@zafu.edu.cn; 董婉玉, 主要从事猪冠状病毒入侵及复制机理研究, E-mail: wanyudong@zafu.edu.cn; 何海健, 主要从事动物疫病防控技术研究, E-mail: 853431627@qq.com

Abstract: The aim of this study was to investigate the replication characteristics and pathogenicity of a cell-adapted strain derived from a prevalent PEDV isolate. The viral strain isolated from a large-scale pig farm was serially passaged in Vero cells to different generations. The biological characteristics of the virus were evaluated *in vitro*, and the 25th (F25) and 141st (F141) passages were inoculated into 3-day-old piglets to compare their pathogenic differences. The results showed that typical syncytial cytopathic effects (CPE) caused by PEDV were observed in Vero cells at the 4th blind passage of the clinical inoculum. By the 25th passage, both the CPE morphology and viral titers had stabilized. Upon reaching the 141st passage, the viral titer increased significantly and induced a more rapid cytopathic effect. Indirect immunofluorescence assay (IFA) specifically detected the expression of the PEDV N protein, and genomic sequence analysis identified the strain as genotype G2b. Pig challenge experiments demonstrated that, compared with the low-passage parental strain (YJH/2017/F25), the YJH/2017/F141-inoculated group showed no significant clinical symptoms or histopathological lesions, along with a significant reduction in viral shedding via anal swabs. All assessed parameters showed no significant difference from those of the DMEM control group, indicating reduced pathogenicity and favorable safety profile of the strain. These findings indicate that after serial *in vitro* passaging, the prevalent PEDV strain acquired enhanced cell adaptability while exhibiting decreased pathogenicity in neonates. This study provides a promising candidate strain for the development of an attenuated PEDV vaccine, and its complete genomic sequence and biological characteristics establish a foundation for further research on recombinant viruses.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; G2b genotype; cell-adapted strain; biological characteristics

* **Corresponding authors:** WANG Xiaodu, E-mail: xdwang@zafu.edu.cn; DONG Wanyu, E-mail: wanyudong@zafu.edu.cn; HE Haijian, E-mail: 853431627@qq.com

猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是一种猪肠道致病性冠状病毒, 是冠状病毒科的重要成员, 具有约 28 kb 长的单链正义 RNA 基因组^[1]。PEDV 可导致 3~10 日龄仔猪出现严重的水样腹泻和脱水, 致死率可高达 100%^[2]。PEDV 于 20 世纪 70 年代首次在英国发现, 并迅速传播至全球各地, 给养猪业带来了巨大的经济损失^[3]。当前, PEDV 是导致我国猪群病毒性腹泻的主要病原体, 检出率大于 40%, 其流行率显著高于其他相关病毒^[4]。

PEDV 在疫苗的免疫压力下不断变异, 不同地区流行的毒株基因型差异大, 甚至同一个场可能同时感染两种以上基因型。PEDV 分为 G1 和 G2 两种基因型^[5], 其中 G2 型毒株又分为 G2a、G2b 和 G2c 三个亚型, 2010 年后出现的 G2 亚型是目前流行的主要毒株类型^[4,6-7], G2 基因型毒株的毒力显著高于 G1 基因型毒株。此外, G2b 毒株在我国部分地区呈现较高流行趋势^[8]。

疫苗接种是防控 PEDV 的主要策略之一^[9]。目

前, 预防猪流行性腹泻 (porcine epidemic diarrhea, PED) 的疫苗种类繁多, 包括灭活疫苗、减毒活疫苗、核酸疫苗和基因工程疫苗等, 其中应用最多的疫苗仍为弱毒疫苗^[1]。与早期的 G1 基因型相比, G2b 毒株在 S 基因等关键抗原位点上存在大量突变, 导致其抗原性发生显著变化, 这些突变使得 G2b 毒株能够有效逃逸基于 CV777、DR13 和 KPEDV-9 等 G1 基因型疫苗^[10]及 G2a 基因型疫苗^[11]诱导的免疫反应。这也是导致现有疫苗保护效力减弱的关键因素之一^[7]。因此, 分离 PEDV 流行毒株并基于流行毒株研发新疫苗已成为当前亟待解决的问题。基于以上, 本研究将一株 G2b 亚群流行毒株连续传代至 141 代, 评价其在细胞和靶动物上的生物学特性, 为 PEDV 流行毒株疫苗的研发提供新的候选毒株。

1 材料与方法

1.1 阳性样品与细胞系

在某规模化养殖场中采集的腹泻仔猪肠道组

织,经 RT-PCR 检测 TGEV (transmissible gastro enteritis virus, TGEV)、PDCoV (porcine deltacoronavirus, PDCoV)、PoRV (porcine rotavirus, PoRV) 和 SADS-CoV (swine acute diarrhea syndrome coronavirus)均为阴性,PEDV 为阳性。用含有青链霉素($100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和胰酶($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的维持液匀浆该 PEDV 阳性样本, 4°C $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心取上清液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器过滤后,置于一 80°C 备用;非洲绿猴肾细胞 (Vero-E6) 细胞购自上海细胞库(编号:CBP60972)。

1.2 主要试剂及耗材

$2\times$ Phanta Flash Master Mix (Dye Plus)、ReverTra Ace- α - ® 长片段反转录试剂盒,购自东洋

纺(上海)生物科技有限公司;HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR、 $2\times$ Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PEDV-N 蛋白单克隆抗体,为实验室自制;荧光标记二抗,购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;引物合成及测序服务均由浙江有康生物科技有限公司提供。

1.3 实验动物

6 头 1 日龄未吃初乳的健康仔猪购自浙江省某猪场,攻毒前采集直肠拭子,并提取直肠拭子 RNA,反转录后通过 RT-qPCR 检测 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PoRV^[12],检测结果显示均呈阴性,引物信息见表 1。此外,仔猪粪便及精神状态在攻毒前均无异常。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences	长度/bp Length
PEDV-F	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGGTTC	124
PEDV-R	CCACTTGAAGGTGTTACGGACGTTTCTT	
TGEV-F	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGGTTC	138
TGEV-R	CACGTGGTTCGTTCCAATCCCCGTGGTCG	
PDCoV-F	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGG	117
PDCoV-R	CTGGCTGCGTTACACCAGACAAA	
PoRV-F	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGGGTTCC	131
PoRV-R	TAATAATTACTATCGGCGCTGC	

1.4 病毒分离

取处理好的样品上清与病毒维持液(胰酶终浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DMEM 培养基)按照 1:1 接种至汇合度 80%~90% 的 6 孔板 Vero 细胞中, 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中吸附 2 h,弃上清后加入含有胰酶的维持液,放置在 37°C 细胞培养箱中培养,48 h 后于一 80°C 冻融三次后收上清,按照此步骤继续接种至 6 孔板中,连续传代直至出现典型合胞体病变。将分离出的病毒进行两轮噬斑纯化,纯化后的病毒命名为 PEDV YJH/2017(“YJH”代表毒株分离地,“2017”指毒株样本采集的年份),继续进行传代培养。从第 70 代开始,每 10 代次进行 1 轮噬斑纯化,挑取单斑扩增后用于后续传代。将传至 25 代的病毒和 141 代的病毒分别命名为 YJH/2017/F25、YJH/2017/F141,并于一 80°C 保存。

1.5 病毒滴度测定

将 Vero 细胞铺至 96 孔细胞培养板,于 37°C 5% CO_2 恒温培养箱培养 12~16 h,待细胞汇合度达到 80%~90% 后弃去培养上清,PBS 清洗 1 次,含胰酶($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的维持液清洗 1 次。随后将经噬斑纯化后的 PEDV YJH25 与 PEDV YJH141 按照 10^{-1} ~ 10^{-6} 稀释比例稀释,将稀释后的病毒液接种至 96 孔板的 Vero 细胞中,检测病毒的 TCID_{50} ,计算病毒滴度。

1.6 全基因组测序

取 PEDV YJH/2017/F25 及 YJH/2017/F141 的病毒液,用 Trizol 法提取样品总 RNA。按照反转录试剂盒说明书对样品进行反转录,取 cDNA 进行 PCR 检测,引物信息见表 2,随后将扩增片段克隆至克隆载体,转化后挑取阳性质粒送浙江有康生物科技有限公司测序。

表2 全基因组测序引物信息

Table 2 Primer information for whole genome sequencing

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences	长度/bp Length
PEDV Complete-01-F	GATTTTCTATCTACGGATAGTTAG	2 043
PEDV Complete-01-R	GCAACACTAGCGGCCACAGGCA	
PEDV Complete-1951-F	CACCACTGGTCGTACAGTTG	2 347
PEDV Complete-1951-R	AATGGCCTTTGCTATGCC	
PEDV Complete-4061-F	TGATGGTGATGCTAATTATG	3 286
PEDV Complete-4061-R	GTCGTCATCAGATAAAGT	
PEDV Complete-6934-F	AATCCTTCTACGTACATGC	3 541
PEDV Complete-6934-R	AAATGCTCTGCCAAATAGT	
PEDV Complete-10245-F	TCTGACTTTCTTTTGGTC	2 966
PEDV Complete-10245-R	TCCTGATTATCTAATGTGAC	
PEDV Complete-12959-F	GTGTTACGCTTTACGTAAC	3 368
PEDV Complete-12959-R	AATCGACCGCTGCATGAG	
PEDV Complete-16116-F	TATTCCACTATACATAAGTTG	2 279
PEDV Complete-16116-R	CCATTACAACCCTCCAAG	
PEDV Complete-17938-F	ATGAGCATTGTAATGTACAT	2 697
PEDV Complete-17938-R	TTACGTTGACCAAATGAT	
PEDV S1-20480-F	AGCAAGTTCAATTGTAAGCAT	2 151
PEDV S1-20480-R	CAACACAGAAAGAACTAAAC	
PEDV S2-22039-F	CTCAAGTGTTCTCAGGT	2 951
PEDV S2-22039-R	GCGCCTCAAAGAAGAC	
PEDV ORF3-24687-F	ACGGGTTGTTGTGGATGC	1 910
PEDV ORF3-24687-R	CAATTGGAAGGTTGTTCA	
PEDV Complete-26132-F	TAGTGGTACATTGCTTGTAG	1 909
PEDV Complete-26132-R	TATCCATATCAACACCGTC	

1.7 病毒多步生长曲线测定

将 Vero 细胞铺至 12 孔细胞培养板,于 37 °C 培养箱中培养 12~16 h,待细胞汇合度达到 80%~90% 后弃去培养上清,PBS 清洗 1 次,含胰酶(5 mg·L⁻¹)的维持液清洗 1 次。随后以 0.01MOI 每孔的感染量将病毒接种 12 孔板的 Vero 细胞中,并于感染后 12、18、24、36、48 和 60 h 收取孔内的培养上清,每个时间点设置 3 个重复孔,检测病毒的 TCID₅₀,绘制病毒的生长曲线。

1.8 空斑试验

将 Vero 细胞铺于 6 孔板,置于 37 °C 培养箱培养 12~16 h,直至细胞汇合度达到 80%~90%。将待测病毒液用病毒维持液于灭菌 1.5 mL EP 管中作 10 倍浓度梯度稀释,每个梯度三个重复。弃去 6 孔板中培养上清,PBS 清洗 2 次,将稀释后的病毒液覆

盖于单层 Vero 细胞,吸附 2 h 后,加入胰酶终浓度为 5 μg·mL⁻¹的 2×DMEM 与 2% 低熔点琼脂糖混合培养基。4 °C 静置 10 min 后放入培养箱倒置培养 48 h。加入 4% 的多聚甲醛室温固定 2 h,随后使用结晶紫染色,观察噬斑形态。

1.9 致病性试验

选取 9 头未吃初乳的 3 日龄健康仔猪,随机均分到 PEDV YJH25 攻毒组、PEDV YJH141 攻毒组和 DMEM 对照组,各组仔猪独立隔离饲养,饲喂商品代乳粉(无菌),每 6 h 一次。攻毒前,仔猪接受 1 d 的适应性饲养以缓解应激。随后,攻毒组仔猪(现为 3 日龄)每头灌服 2×10⁵ TCID₅₀ 的病毒液,对照组灌服等体积的 DMEM 培养基。攻毒后每 12 h 观察仔猪的粪便情况及精神状态,并按照以下评分标准进行打分,粪便状态:正常“0”,软便“1”,软便夹

杂水样稀粪“2”,水样腹泻“3”。精神状态:良好“0”,嗜睡“1”,沉郁“2”。

1.10 攻毒后病毒载量检测

攻毒后每 12 h 采集一次肛拭子,并将肛拭子加入至 1 mL 的 PBS 中,充分震荡混匀、4 ℃ 离心收取

上清液,于 -80 ℃ 保存;取 300 μL 上清液提取总 RNA,取 1 μg RNA 进行反转录获得 cDNA。采用绝对荧光定量 PCR 检测样品中的病毒拷贝数。引物信息见表 3。

表 3 绝对定量 qPCR 引物信息

Table 3 Primer information for absolute quantitative qPCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences	长度/bp Length
PEDV-N-F	ACTAATAAAGGAAATAAGGACCAG	207
PEDV-N-R	GTTAGTGGGTTTCAGTCTTTGC	

1.11 组织病理学和免疫组化研究

攻毒第 7 天对未死亡的仔猪进行安乐死。剖检时拍照肠道大体照片,并采集攻毒仔猪的空肠及回肠组织,用 4% 多聚甲醛固定 36 h,常规制备石蜡切片,随后进行 HE 染色及免疫组化检测,在光学显微镜下观察。

2 结 果

2.1 病毒分离及鉴定

将 PEDV 阳性病料接种 Vero 细胞,盲传至第 4 代时开始出现合胞体样典型病变,经 RT-PCR 检测为 PEDV 阳性(图 1),随后将其传代至 25 代及 141 代并分别感染 Vero 细胞,与未感染的细胞相比,感染组细胞出现合胞体、细胞破裂和脱落等典型的病变(图 2),且随着病毒代次的增加,病毒对 Vero 细胞的感染能力显著增强。分别将病毒的第 25 代与第

141 代接种 Vero 细胞,感染 18 h 后进行 IFA 检测,可观察到 PEDV 感染细胞呈现特异性绿色荧光(数据未显示),以上结果说明成功分离 PEDV。

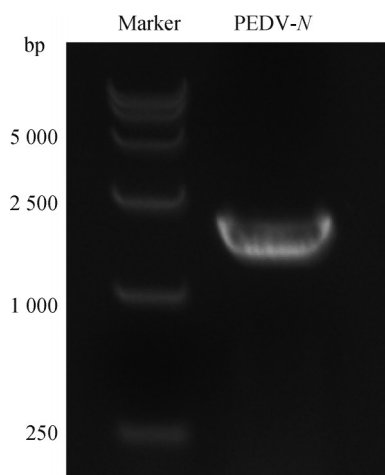


图 1 PEDV N 基因片段扩增结果

Fig. 1 Amplification results of the PEDV N gene fragment

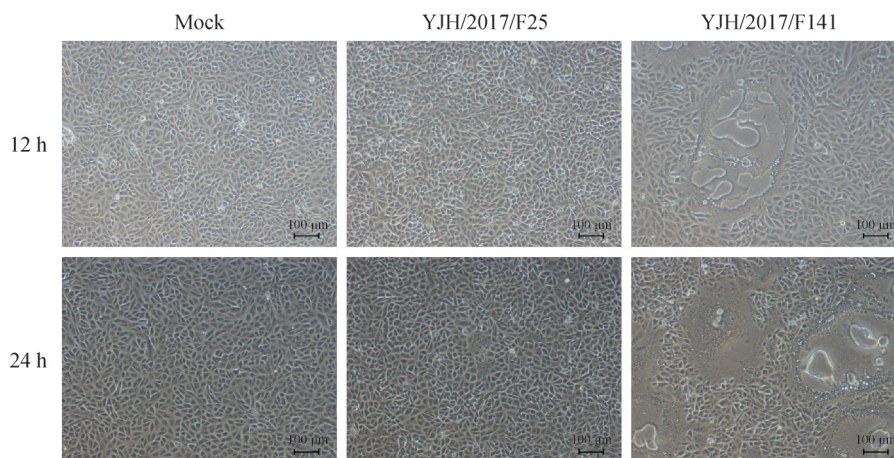


图 2 YJH/2017/F25、YJH/2017/F141 感染 Vero 细胞的 CPE 结果

Fig. 2 Cytopathic effects (CPE) in Vero cells infected with YJH/2017/F25 or YJH/2017/F141

2.2 S基因同源性比对及系统发育分析

为了确定分离毒株的基因型,从病毒保守区域设计引物对 YJH/2017/F25、YJH/2017/F141 毒株的基因片段进行扩增和测序(引物信息见表2),随后对测序结果进行拼接,YJH/2017/F141序列已上传至 GenBank 数据库,登录号为 OR596889.1。根据测序结果比对 YJH/2017/F25、YJH/2017/F141 的氨基酸序列差异,结果显示 YJH25 与 YJH141 共存在 17 处氨基酸位点的差异,分别位于非结构蛋白

Nsp3,结构蛋白 S、E、M 以及辅助蛋白 ORF3。其中有 13 处氨基酸位点突变位于结构蛋白中的 S 蛋白(表4)。随后通过最大似然法分析,对该毒株 S 基因组氨基酸序列进行系统发育树分析。结果显示该毒株属于毒力较高的 G2b 亚群(图3)。S 基因相似性比对显示该毒株与国内流行株 GD-B 的相似性最高,为 98.6%,与经典毒株 CV777 的相似性较低,仅为 92.78%。

表4 YJH/2017/F25 与 YJH/2017/F141 氨基酸差异位点

Table 4 Amino acid difference sites between YJH/2017/F25 and YJH/2017/F141

开放阅读框 ORFs	编码蛋白(氨基酸数/aa) Encoding protein (aa)	aa 位置(aa) aa position(aa)	氨基酸突变(YJH25→YJH141) Amino acid mutation
ORF1a	Nsp3(1 621)	1 563	T→K
ORF2	S(1 386) S1(792)	27	S→L
		55,56	I,G→缺失
		57	E→K
		258	N→H
		286	A→T
		383	T→I
		389	A→G
	S2(594)	801	N→T
		887	S→R
		961	M→I
		1 020	A→T
		1 250	R→K
		1 378	E→TAA(STOP)
ORF3	ORF3(224)	146	I→V
ORF4	E(76)	42	H→Y
	M(226)	208	A→V

2.3 YJH/2017 毒株多步生长曲线

为探究分离毒株在 Vero 细胞上的生长特性,分别将 YJH/2017/F25、YJH/2017/F141 的病毒以 0.01 MOI 感染 Vero 细胞,绘制病毒的多步生长曲线。结果显示,YJH/2017/F141 在 24 h 时病毒滴度达到峰值,在 12~24 h 时病毒迅速复制,滴度上升较快,最高滴度可达 $10^{7.026}$ TCID₅₀·mL⁻¹。而 YJH/2017/F25 则于 36 h 左右病毒滴度达到峰值,最高滴度为 $10^{4.27}$ TCID₅₀·mL⁻¹,病毒复制速率显著低于 YJH/2017/F141(图4)。以上结果说明该毒株在连续传代过程中显著增强了其在 Vero 细胞中的适应性。

2.4 YJH/2017 毒株噬斑试验

为评估分离毒株对 Vero 细胞的感染能力,分别

以相同 MOI 的 YJH/2017/F25 和 YJH/2017/F141 毒株感染细胞,经结晶紫染色后观察噬斑形态,试验结果显示,YJH/2017/F141 的噬斑明显大于 YJH/2017/F25(图5),说明 YJH/2017/F141 在 Vero 细胞上的适应性强于 YJH/2017/F25。以上结果说明在该毒株连续传代后在 Vero 细胞上产生病变的能力增强。

2.5 YJH/2017/F141 致病性试验

为评估 YJH/2017/F141 对仔猪的致病力,将 2×10^5 TCID₅₀ 剂量的 YJH/2017/F141、YJH/2017/F25 病毒液口服接种 3 日龄仔猪,并设置 DMEM 对照组。结果显示在攻毒后,YJH/2017/F141 攻毒组仔猪粪便状态与精神状态均正常,未出现任何症状,与 DMEM 对照组一致,在肛拭子中未检测到明

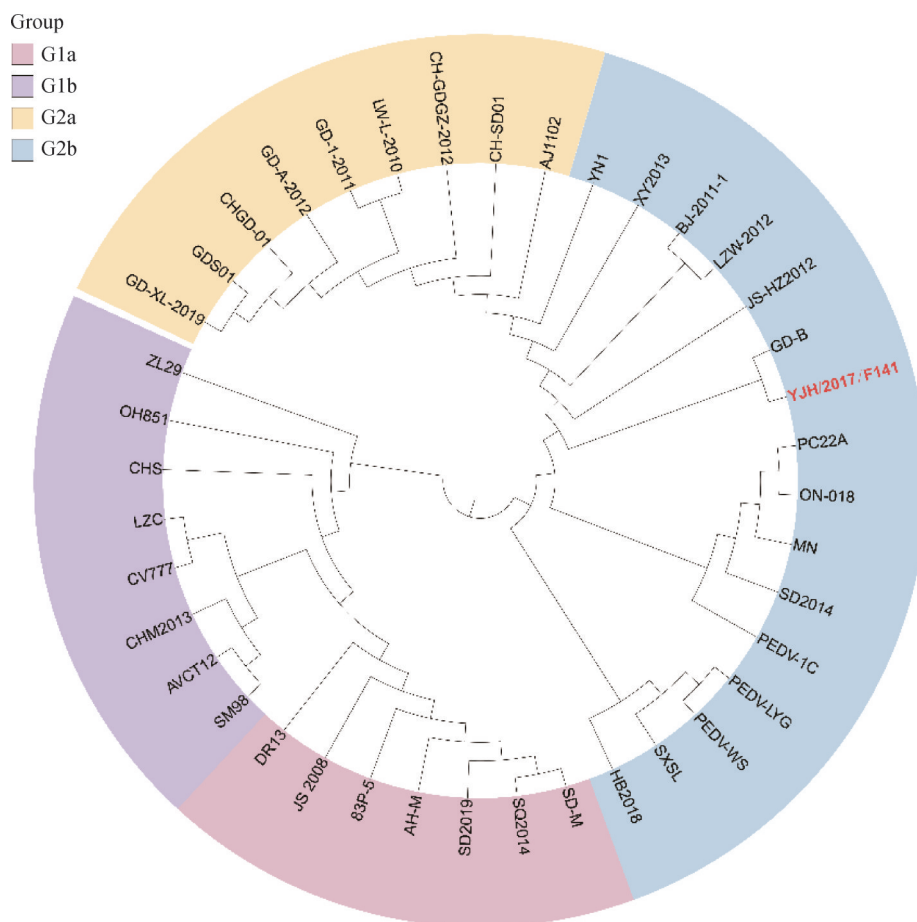


图3 PEDV S基因系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the PEDV S gene

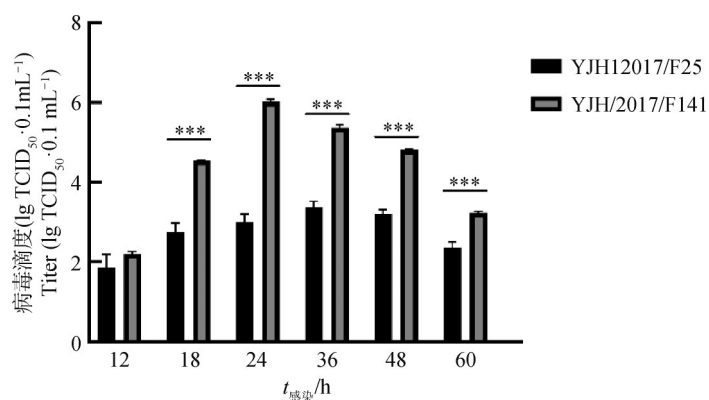
***. $P < 0.001$, 数据间有极显著差异***. $P < 0.001$, extremely significant difference

图4 YJH/2017/F141、YJH/2017/F25 多步生长曲线

Fig. 4 Multi-Step Growth Curves of YJH/2017/F141 and YJH/2017/F25

显排毒;而 YJH/2017/F25 攻毒组仔猪出现腹泻及精神萎靡,在肛拭子中可以检测到明显排毒(图 6A)。对仔猪进行剖检,剖检结果显示 YJH/2017/F141 攻毒组仔猪小肠外观正常,与对照组基

本一致,YJH/2017/F25 攻毒组仔猪肠组织充血变薄(图 6B)。以上结果表明 YJH/2017/F141 毒株对新生仔猪没有致病性。采集仔猪肠道组织进行肠组织切片检查。结果显示 YJH/2017/F141 攻毒组

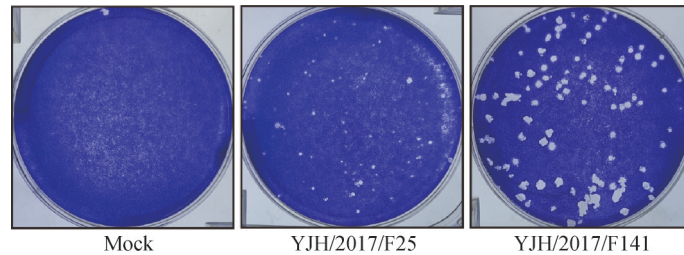
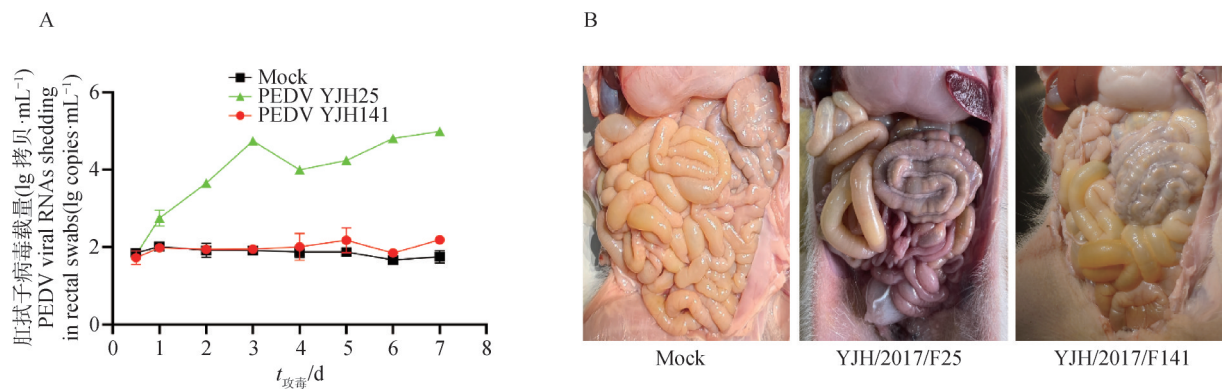


图5 YJH/2017/F141、YJH/2017/F25噬斑形态

Fig. 5 Plaque Morphology of YJH/2017/F141 and YJH/2017/F25

仔猪未见严重的肠绒毛损伤,小肠绒毛结构基本完整,与DMEM对照组一致,YJH/2017/F25攻毒组仔猪可见小肠绒毛萎缩、脱落(图7A)。免疫组化染色结果显示,YJH/2017/F141攻毒组仔猪未在小肠

上皮细胞中检测到PEDV-N抗原,与DMEM对照组一致,YJH/2017/F25攻毒组仔猪在小肠绒毛上可检测到大量PEDV抗原(图7B),说明YJH/2017/F141对新生仔猪基本没有致病性。



A. RT-qPCR检测肛拭子病毒载量;B. 仔猪肠道剖检结果

A. Viral load detection in anal swabs by RT-qPCR; B. Results from intestinal postmortem examination in piglets

图6 肛拭子排毒量检测及肠道剖检变化

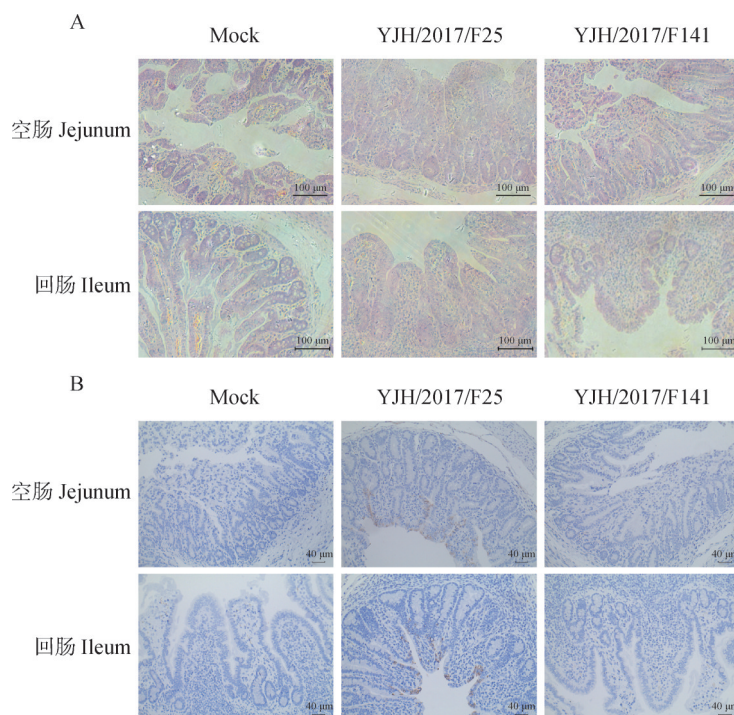
Fig. 6 Viral shedding in anal swabs and Intestinal autopsy lesions

3 讨论

近年来,PED在全球养殖场的流行率、传播范围、发病率和死亡率显著上升,对养殖行业造成了严重经济损失^[13]。PEDV的高变异性是其传播能力和毒力增强的关键因素^[14]。研究表明,PEDV基因组中的频繁突变,尤其是S基因等关键抗原位点的变异,导致了不同毒株之间的遗传多样性,这种变异不仅使得PEDV能够在宿主免疫系统的压力下生存,还导致了流行毒株的免疫逃逸现象^[14]。特别是自2010年G2b亚型毒株出现以来,该亚型在PEDV的流行株中逐渐占据主导地位,其与早期G1基因型相比,表现出更强的传播能力和毒力差异,使得传统毒株研发的疫苗保护效果受到质疑^[15]。

疫苗接种仍是目前防控猪流行性腹泻的主要手段^[16],现有疫苗类型主要包括灭活疫苗、弱毒疫

苗、基因工程疫苗等。其中减毒活疫苗临床应用多,它将病毒的致病力降低但仍保留其复制能力,免疫效果更持久,且无需任何佐剂,成本效益高,但是对安全性要求高,毒株选择要求严格。目前,国内防控PEDV流行株的弱毒活疫苗主要通过将流行毒株体外连续传代致弱后,筛选免疫效果和细胞适应性最佳的毒株制备^[17]。尽管毒株分离是疫苗开发的关键步骤,但PEDV的临床分离却极具挑战性^[18]。以常用的Vero细胞为例,当前的分离率不足40%,而且成功分离的毒株通常滴度较低^[16,19]。PEDV体外分离效率低下是严重制约疫苗的研发速度的重要原因。本研究从浙江某规模化养殖场收集阳性病料,分离病毒。在Vero细胞上成功分离到YJH/2017毒株,并对其全基因组测序,并从S基因水平分析其与其他经典PEDV毒株和流行PEDV毒株之间的系统发育关系,分析结果显示该毒株属



A. 肠道组织苏木精-伊红(HE)染色;B. 肠道组织免疫组化分析

A. Hematoxylin and eosin (HE) staining of intestinal tissue; B. Immunohistochemical analysis of intestinal tissue

图7 肠道组织HE染色及免疫组化结果

Fig. 7 HE staining and immunohistochemical analysis of intestinal tissue

于G2b亚型,是近年来我国部分地区常见的流行毒株之一。

Lin等^[20]研究发现,体外连续传代可以显著增加病毒的细胞适应性,并提高滴度,Peng等^[21]在文章中也提到了相同的结论。为了研究YJH/2017是否适合作为弱毒疫苗载体,将其在Vero细胞上连续传代至第141代,得到YJH/2017/F141病毒。在对YJH/2017/F141的生物学特性的研究中,发现其在连续传代的过程中,对Vero细胞的适应性增强,病毒滴度升高,这与Lin等^[20]、Peng等^[21]的研究结果一致。致病性试验结果表明3日龄的仔猪感染YJH/2017/F141毒株后没有症状出现,说明体外连续传代后的高代次毒株对仔猪没有致病性,这与Wu等^[22]发现的P120代次的毒株相对于P64、P10代毒株可以显著减少仔猪的临床症状、组织病理病变和肠道PEDV抗原分布的研究结果一致。

4 结论

本研究成功分离并纯化出一株PEDV毒株(YJH/2017),经S基因序列分析,该毒株属于G2b型。在Vero细胞上的连续传代使其获得了显著的

细胞适应性,病毒滴度显著提高且细胞病变效应加速。同时,仔猪攻毒试验结果表明,传至141代的YJH/2017/F141对3日龄仔猪的致病力明显减弱,未引起显著的临床症状和组织病理损伤,且病毒排放量显著降低,表现出优异的生物安全性。该研究结果为PEDV疫苗的研制奠定了基础,并为后续PEDV G2b流行毒株弱毒疫苗及灭活疫苗的研发提供了一株新的候选毒株。

参考文献(References):

- [1] WEI M Z, CHEN L, ZHANG R, et al. Overview of the recent advances in porcine epidemic diarrhea vaccines[J]. *Vet J*, 2024, 304: 106097.
- [2] SU M, LI C, QI S, et al. A molecular epidemiological investigation of PEDV in China: Characterization of co-infection and genetic diversity of S1-based genes[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2020, 67(3): 1129-1140.
- [3] PIZZURRO F, CITO F, ZACCARIA G, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) in Abruzzi region, central-Italy[J]. *Vet Med Sci*, 2018, 4(2): 73-79.
- [4] ZHANG H, ZOU C, PENG O, et al. Global dynamics

- of porcine enteric coronavirus PEDV epidemiology, evolution, and transmission[J]. *Mol Biol Evol*, 2023, 40(3):msad052.
- [5] CHEN J, LIU X, SHI D, et al. Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. *Viruses*, 2013, 5(10):2601-2613.
- [6] 段群棚, 秦毅斌, 何文娜, 等. 2017—2021年广西腹泻猪群主要病毒性腹泻病原检测[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(10):1-8.
- DUAN Q P, QIN Y B, HE W N, et al. Detection of major pathogens leading to porcine viral diarrhea in Guangxi from 2017 to 2021[J]. *China Animal Health Inspection*, 2021, 38(10):1-8. (in Chinese)
- [7] 齐海涛, 王利, 颜忠, 等. 2017—2020年华北地区猪流行性腹泻病毒分子流行病学调查[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(22):91-96.
- QI H T, WANG L, YAN Z, et al. Molecular epidemiological survey of porcine epidemic diarrhea virus in North China from 2017 to 2020 [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2022(22):91-96. (in Chinese)
- [8] WEN Z, LI J, ZHANG Y, et al. Genetic epidemiology of porcine epidemic diarrhoea virus circulating in China in 2012-2017 based on spike gene [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(3):883-889.
- [9] LEIDENBERGER S, SCHRÖDER C, ZANI L, et al. Virulence of current German PEDV strains in suckling pigs and investigation of protective effects of maternally derived antibodies[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):10825.
- [10] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(1):161-163.
- [11] SONG X, LI Y, WANG C, et al. Efficacy evaluation of a bivalent subunit vaccine against epidemic PEDV heterologous strains with low cross-protection [J]. *J Virol*, 2024, 98(10):e0130924.
- [12] 李博建. 吉林省 PEDV 流行株的分离鉴定及鸡尾酒卵黄抗体的实验室试制[D]. 延吉: 延边大学, 2024.
- LI B J. Isolation and identification of PEDV epidemic strains in Jilin Province and laboratory trial production of cocktail yolk antibodies [D]. Yanji: Yanbian University, 2024. (in Chinese)
- [13] LIN C M, SAIF L J, MARTHALER D, et al. Evolution, antigenicity and pathogenicity of global porcine epidemic diarrhea virus strains[J]. *Virus Res*, 2016, 226:20-39.
- [14] SUN J, LI Q, SHAO C, et al. Isolation and characterization of Chinese porcine epidemic diarrhea virus with novel mutations and deletions in the S gene [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221:81-89.
- [15] LÓPEZ-FIGUEROA C, CANO E, NAVARRO N, et al. Clinical, pathological and virological outcomes of tissue-homogenate-derived and cell-adapted strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in a neonatal pig model[J]. *Viruses*, 2023, 16(1):44.
- [16] PARK J E, KANG K J, RYU J H, et al. Porcine epidemic diarrhea vaccine evaluation using a newly isolated strain from Korea [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221:19-26.
- [17] 丁小燕, 张海涛, 尹丽萍, 等. 猪流行性腹泻病毒变异株传代致弱株的免疫效率研究[J]. 中国预防兽医学报, 2024, 46(11):1159-1165.
- DING X Y, ZHANG H T, YIN L P, et al. Study on the immune efficiency of porcine epidemic diarrhea virus attenuation strain by serial passage [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2024, 46(11):1159-1165. (in Chinese)
- [18] HOFMANN M, WYLER R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture [J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(11):2235-2239.
- [19] BAEK P S, CHOI H W, LEE S, et al. Efficacy of an inactivated genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus vaccine in neonatal piglets [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2016, 174:45-49.
- [20] LIN C M, HOU Y, MARTHALER DG, et al. Attenuation of an original US porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A via serial cell culture passage [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 201:62-71.
- [21] PENG O, WU Y, HU F, et al. Transcriptome profiling of Vero E6 cells during original parental or cell-attenuated porcine epidemic diarrhea virus infection [J]. *Viruses*, 2023, 15(7):1426.
- [22] WU Y, LI W, ZHOU Q, et al. Characterization and pathogenicity of Vero cell-attenuated porcine epidemic diarrhea virus CT strain [J]. *Virol J*, 2019, 16(1):121.

(编辑 白永平)