

罗毅, 徐发荣, 徐莹, 等. 1 株高致病性基因 2 型猪流行性腹泻病毒毒株的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (10): 94-100.

LUO Y, XU F R, XU Y, et al. Isolation and characterization of a highly pathogenic genotype 2 porcine epidemic diarrhea virus strain [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (10): 94-100.

1 株高致病性基因 2 型猪流行性腹泻病毒毒株的分离鉴定

罗毅¹, 徐发荣², 徐莹¹, 张乐乐¹, 王郁捷¹, 尹灵丹¹, 刘平黄^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193;

2. 北京市动物疫病预防控制中心, 北京 102600)

摘要: 为了研究猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 流行毒株的生物学特性, 采集仔猪临床腹泻病料进行病毒分离, 结果显示, 接种病料的 Vero 细胞连续盲传 3 代后可观察到明显的细胞病变, 通过间接免疫荧光试验确定导致细胞病变的病毒为 PEDV, 毒株命名为 JMS。通过 RT-PCR 扩增 JMS 毒株 S 基因并进行系统进化树分析发现, JMS 属于 G II b 基因型。采用 500 TCID₅₀ (半数组织细胞感染量) 的剂量对 3 日龄仔猪进行攻毒发现, 攻毒仔猪表现出严重的临床症状, 并在 48 h 内死亡, 致死率为 100%。对仔猪剖检和病理组织切片检查发现, 攻毒仔猪肠壁变薄, 绒毛结构破损、变短甚至脱落。综上, 本研究分离到 1 株高致病性 PEDV 毒株, 为后续探究 PEDV 流行毒株生物学特性以及相关疫苗研发奠定了基础。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; G II b 型; 高致病性

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2024)10-0094-07

Isolation and characterization of a highly pathogenic genotype 2 porcine epidemic diarrhea virus strain

LUO Yi¹, XU Farong², XU Ying¹, ZHANG Lele¹, WANG Yujie¹, YIN Lingdan¹, LIU Pinghuang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Beijing Animal Disease Prevention and Control Center, Beijing 102600, China)

Abstract: To study the biological characteristics of the circulating strain of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), Vero cells were used to isolate the virus from piglet diarrheal samples, and the results showed that cytopathies could be obviously observed after three consecutive blind passages of Vero cells inoculated with the diseased material, and the virus that led to the cellular lesions was determined to be PEDV (named JMS) by indirect immunofluorescence assay. The S gene of the JMS strain was amplified by RT-PCR, and the phylogenetic tree analysis revealed that JMS belonged to the G II b genotype. Then, the 3-day-old piglets were attacked with a dose of 500 TCID₅₀, and it was found that the attacked piglets showed severe clinical symptoms and died within 48 h, with a lethality rate of 100%. Subsequent autopsy and histopathological examination of the piglets revealed that the intestinal wall of the poisoned piglets became thinner, and the villi structure was damaged, shortened or even detached. These results indicated that a highly pathogenic strain of PEDV was isolated in this study, which laid a foundation for investigation of the biological characteristics of the clinically prevalent strain of PEDV and for the development of related vaccines.

Keywords: porcine epidemic diarrhea virus; G II b genotype; high pathogenicity

病毒性腹泻严重危害仔猪健康, 相关研究表明, 导致仔猪腹泻常见的病毒包括猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪 δ 冠状病毒 (PDCoV)、猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 和猪轮状病毒 (PoRV)^[1-2]。多个临床数据分析指出, PEDV 在临床样本中检出的阳性

率远高于其他几种病毒, 是造成仔猪腹泻最主要的病原^[3-4]。

PEDV 属于 α 冠状病毒属 (*Alphacoronavirus*), 是有囊膜的单链正股 RNA 病毒^[5]。PEDV 主要靶向猪的小肠绒毛上皮细胞, 导致绒毛脱落进而造成仔猪营养吸收障碍, 继发腹泻, 严重者脱水死亡。根据 S 基因的不同, PEDV 分为 2 个基因型, 分别为经典型 (G I) 和变异型 (G II), 目前中国流行的毒株主要为变异型, 占 90% 以上^[6-7]。变异株的致病能力和危害远高于经典株, 对仔猪的致死率最高可达 100%, 其高流行率和高致死率的特征使 PEDV 成为影响养猪

收稿日期: 2023-10-11; 修回日期: 2024-07-30

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1801104)

第一作者: 罗毅, 男, 博士

* 通信作者: 刘平黄, 博士, 教授, 主要从事动物冠状病毒的致病机理和免疫保护机制, 抗体工程等方面的研究, E-mail: liupinghuang@cau.edu.cn。

行业最主要的病原之一，每年给养猪行业造成了巨大的经济损失^[8]。

疫苗免疫是防控病毒感染的最有效的措施之一，上世纪90年代，科研人员成功研发出CV777的灭活疫苗和弱毒苗，疫苗免疫母猪所产生的母源抗体对仔猪保护率可达90%以上，有效地减轻了PEDV对猪群的危害^[9-10]。然而，在2010年出现高致病性流行毒株之后，经典株的疫苗对变异毒株交叉保护效果较差，经典株的疫苗已不能防控变异株。近年来虽有针对流行株的疫苗上市，但是免疫保护效果不理想，PEDV仍时常暴发，因此市场上迫切需要研发新型有效的疫苗。

为了更好地研究PEDV变异株的生物学特性，为疫苗研发奠定基础，本实验室从黑龙江某猪场的腹泻仔猪病料中进行PEDV分离，并对其基因组和致病特征进行了相关研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞和病料

Vero细胞和猪肠道类器官由本实验室保存；PEDV仔猪腹泻病料采自黑龙江某猪场。

1.1.2 主要试剂

总RNA提取试剂盒购自博日公司，Oligo d(T)、dNTP、MLV反转录酶、RNA酶抑制剂均购自TaKaRa公司，青霉素-链霉素（双抗）购自碧云天公司，0.25%胰酶、DMEM和血清购自Gibco公司，PBS购自索莱宝公司，高保真酶购自诺唯赞公司，PEDV-N多抗血清由本实验室制备。

1.1.3 主要仪器

组织匀浆仪购自赫得科技有限公司，离心机和倒置显微镜购自Eppendorf公司，二氧化碳细胞培养箱购自Thermo公司，荧光倒置显微镜购自尼康公司，荧光定量PCR仪购自罗氏公司。

1.1.4 试验动物

筛选2头PEDV抗原抗体双阴性，猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）、伪狂犬病病毒（PRV）、猪瘟病毒（CSFV）、猪流感病毒（SIV）、非洲猪瘟病毒（ASFV）抗原阴性怀孕母猪，从其所产的仔猪中挑选6头大小匀称的3日龄长白仔猪用于试验。

1.2 病料处理

通过PCR检测选取PEDV阳性而TGEV、PDCoV和PoRV为阴性的病料。在无菌环境下取适量腹泻仔猪的空肠组织置于2 mL离心管中，并加入500 μ L预冷的无菌PBS，用组织匀浆仪研磨，离心收取上清液，同时取1 mL空肠内容物于2 mL离心管中，离心

收取上清液，将上清液用0.22 μ m滤器过滤除菌。

1.3 病毒分离

将Vero细胞传代至6孔板中，待细胞100%长满后弃上清液并用DMEM洗2次，每孔加入100 μ L组织匀浆上清液、100 μ L内容物上清液、800 μ L DMEM和4‰的胰酶；对照孔加1 mL DMEM和4‰的胰酶；将细胞置于细胞培养箱中孵育2 h，然后弃上清液；DMEM洗1次，加入2 mL DMEM和3‰的胰酶，每天观察细胞病变效应（CPE）；若细胞无明显病变，根据细胞状态在72~96 h之间收取细胞并反复冻融3次，3 000 g、4 $^{\circ}$ C离心5 min，收获上清液；取400 μ L病毒液、600 μ L DMEM和3‰的胰酶充分混匀，继续接种6孔板中100%长满的Vero细胞，连续传代3~5次并观察CPE。

1.4 半数组织细胞感染量（TCID₅₀）测定

细胞出现明显病变后，反复冻融3次收集上清液，将病毒液用含3‰的胰酶DMEM倍比稀释，从 10^{-1} ~ 10^{-7} ；将稀释好的病毒液接种于长满单层Vero细胞的96孔细胞培养板中，每个稀释度进行8个孔的平行重复，每孔接种病毒液100 μ L；同时设正常细胞作为空白对照，每孔加100 μ L含3‰的胰酶DMEM；每日观察并记录，连续观察5~7 d，并将观察得到的数据按照Reed-Muench两氏法进行计算分析。

1.5 间接免疫荧光试验（IFA）

病毒按照感染比（MOI） 8×10^{-3} 感染96孔板中Vero细胞，同时设立细胞对照，37 $^{\circ}$ C孵育2 h；弃病毒液，每孔用DMEM洗涤2次，加入100 μ L含3‰的胰酶DMEM在37 $^{\circ}$ C孵育36 h；弃上清液，每孔加入100 μ L 4%多聚甲醛，4 $^{\circ}$ C作用30 min；弃甲醛，每孔PBST洗涤3次；然后每孔加入100 μ L 0.2% Triton室温作用20 min；弃Triton，每孔PBST洗涤3次；加入200 μ L封闭液37 $^{\circ}$ C封闭2 h；弃封闭液，每孔PBST洗涤3次；每孔加入100 μ L小鼠抗PEDV-N蛋白血清（1:1 000）；37 $^{\circ}$ C孵育1.5 h；弃一抗，每孔PBST洗涤3次；山羊抗小鼠抗体（Invitrogen公司，货号A11003）1:800倍稀释，每孔加入100 μ L，37 $^{\circ}$ C孵育1 h；弃二抗，每孔PBST洗涤3次；每孔加入100 μ L 0.5 μ g/mL的DAPI，室温孵育10 min；每孔PBST洗涤3次；每孔加入100 μ L PBS，荧光显微镜观察结果。

1.6 病毒生长特性分析

Vero细胞铺48孔板，待细胞100%长满后，然后收集3孔细胞-80 $^{\circ}$ C冻存，其余孔按照 8×10^{-3} MOI加入病毒液，同时设立细胞对照（Mock），37 $^{\circ}$ C孵育2 h；收集3孔感染病毒的细胞-80 $^{\circ}$ C冻存，其余

孔用 DMEM 洗涤 2 次, 加入维持液 37 °C 孵育, 分别在 24、48 和 72 h 收集 3 孔感染病毒的细胞-80 °C 冻存, 然后通过荧光定量 PCR 检测不同时间点病毒拷贝数。空肠类器官铺 48 孔板, 100% 长满后按照 1 000 TCID₅₀ 每孔加入病毒液并在 37 °C、1 200 g 离心 1 h, 然后 37 °C 孵育 2 h, 以接毒时间点为标准分别在 0、2、6、12、24、48 h 收取样品。

1.7 病毒 RNA 提取

采用博日 RNA 提取试剂盒按照说明书提取 RNA; 使用紫外分光光度计对 RNA 进行浓度测定, 取 2 μg RNA 为模板进行反转录获取 cDNA。

1.8 荧光定量 PCR

根据 PEDV 的 ORF3 和 GAPDH (登录号: AF017079.1) 设计引物, 采用荧光实时 PCR 相对定量法对反转录的 cDNA 进行检测, 检测试剂采用 Power SYBR Green PCR Master Mix, 引物见表 1。

表 1 相对定量 PCR 检测引物

基因	引物序列 (5'→3')
ORF3	F: CACTTATGGCAGGCTCTTT
	R: CCATTGAGAAAAGAAAGTGTAGTAG
GAPDH	F: CCTTCCGTGTCCTACTGCCAAC
	R: GACGCCTGCTTACCACCTTCT

1.9 PEDV S 基因扩增及序列分析

从 NCBI 数据库中下载不同 PEDV 基因型序列, 从 ORF1 和 ORF3 中筛选保守区域设计 S 基因的上下游扩增引物。采用高保真酶 (诺唯赞, 货号 P515-AA) 从病毒 cDNA 中扩增, 引物 F: 5'-TGATGTTGTGTTAGGTTTGTGAAG-3'; R: 5'-AATGGATTTGCCGTCATAATAAGCT-3'。然后将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳验证片段大小, 并通过胶回收将 PCR 产物回收并进行测序; 使用 Jones-Taylor-Thornton (JTT) model 对序列进行 Maximum Likelihood Tree 分析, 进而确定分离毒株基因型。参考毒株见表 2。

1.10 PEDV 分离毒株感染试验

将 6 头仔猪随机分为 2 组, 其中 1 组每头猪口服感染 500 TCID₅₀ PEDV 病毒液, 另 1 组作为空白对照。在攻毒前 1 d 和攻毒后 4 d, 每天采集猪肛拭子, 同时每天对攻毒组和对照组仔猪进行临床症状打分: 呕吐打 1 分, 腹泻打 2 分, 水样腹泻打 3 分, 水样腹泻并脱水打 4 分。死亡仔猪立即解剖并采集肠道, 进行组织固定, 同时采集肠内容物。

1.11 病毒载量检测

用 500 μL 预冷的 PBS 加入肛拭子中, 充分涡

旋、离心收上清液; 取 100 μL 上清液提取 RNA, 然后取 13 μL RNA 进行反转录获得 cDNA。采用绝对荧光定量 PCR 对样品病毒拷贝数进行检测。

表 2 系统发育树参考毒株

编号	毒株序列号	国家	日期	基因型
1	AF353511	瑞士	1993	G I a
2	GU937797	韩国	2011	G I a
3	JQ023161	韩国	2012	G I a
4	JQ023162	韩国	2012	G I b
5	JX560761	中国	2012	G I b
6	KC210146	中国	2013	G I b
7	KC140102	中国	2012	G II a
8	KC210145	中国	2012	G II a
9	KF468752	美国	2013	G II a
10	KJ020932	中国	2013	G II a
11	KF468754	美国	2013	G II a
12	KF760557	中国	2013	G II a
13	JX188454	中国	2011	G II b
14	JX489155	中国	2011	G II b
15	JX524137	中国	2011	G II b
16	JX647847	中国	2011	G II b
17	KF384500	中国	2012	G II b
18	KM089829	中国	2012	G II b
19	KJ399978	美国	2014	G II c
20	KJ645695	美国	2013	G II c
21	KR003452	比利时	2015	G II c
22	KM392232	美国	2013	G II c
23	KM403155	韩国	2014	G II c
24	KM975738	美国	2013	G II c

1.12 组织切片染色

将样品用 4% 的多聚甲醛固定 36 h, 然后分级乙醇脱水后用石蜡包埋, 将石蜡包埋样品切片后固定于载玻片上, 并进行脱蜡、水化和 HE 染色, 最后在光学显微镜进行观察。

1.13 数据统计分析

用软件 GraphPad Prism 8.0 分析试验结果。试验数据用“平均值±标准差”的形式表示。

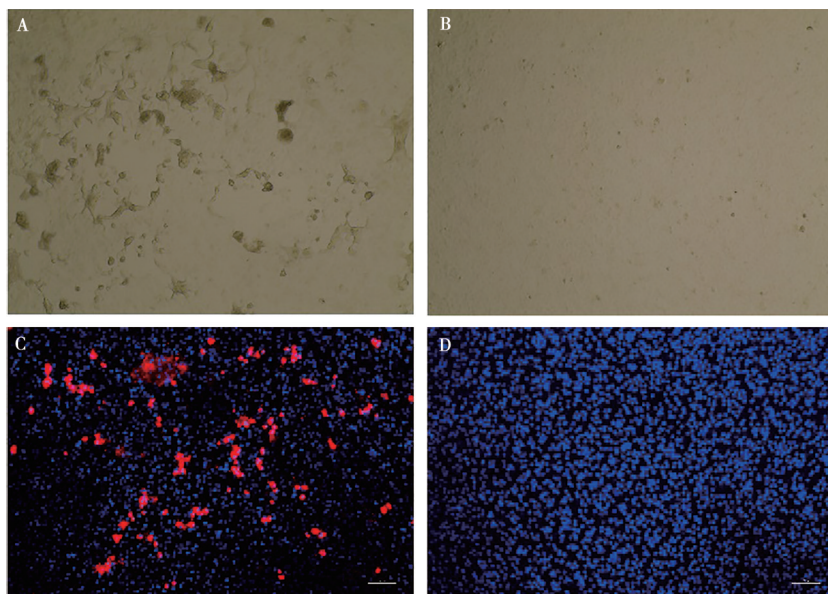
2 结果

2.1 毒株分离与鉴定

将 PEDV 阳性病料接种 Vero 细胞, 连续盲传 3 代。结果显示, 盲传 3 代后部分细胞在 36 h 出现明显脱落、皱缩等 (图 1A), 与 PEDV 感染细胞导致

的病变相似；而细胞对照没有出现细胞病变（图1B）。将第3代感染细胞反复冻融4次收取上清液，用DMEM进行50倍稀释后感染96孔板中100%长满的Vero细胞，36 h后进行IFA检测，结果显示该感

染细胞孔能够与PEDV-N蛋白小鼠多抗血清产生特异性结合，并呈现红色荧光（图1C），而细胞对照孔无特异性红色荧光（图1D），表明感染孔含有PEDV，分离毒株命名为JMS。



A、B. PEDV-JMS 感染 Vero 细胞病变和细胞对照；C、D. 间接免疫荧光检测 PEDV-JMS 和细胞对照。

图1 PEDV-JMS 分离与验证

2.2 PEDV-JMS 分离毒株生长特性分析

为了分析 PEDV-JMS 的生长特性，将 F9 代 ($10^{4.75}$ TCID₅₀/mL) 病毒分别感染 Vero 细胞和猪空肠类器官，然后在不同时间点收集样品并测定病毒拷贝数。结果显示，分离毒株感染 Vero 细胞后在 24 h 内病毒拷贝数迅速上升，随后增殖速度减缓（图 2A）。

而在猪空肠类器官中，病毒拷贝数在 0~12 h 迅速上升，在随后的 12~24 h 出现平台期，并在 24~48 h 呈现出略微下降的趋势（图 2B）。表明分离的 PEDV 毒株在不同细胞中可以很好地增殖，但是其病毒拷贝数随着细胞种类的不同而呈现出不同的增长模式。

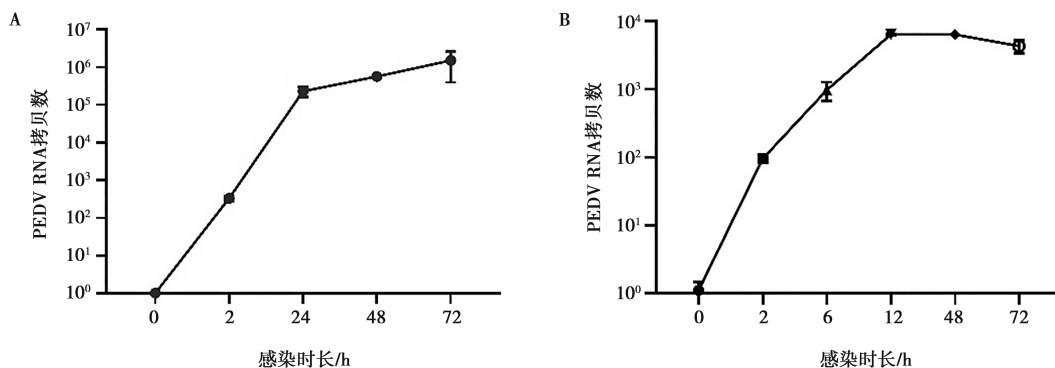
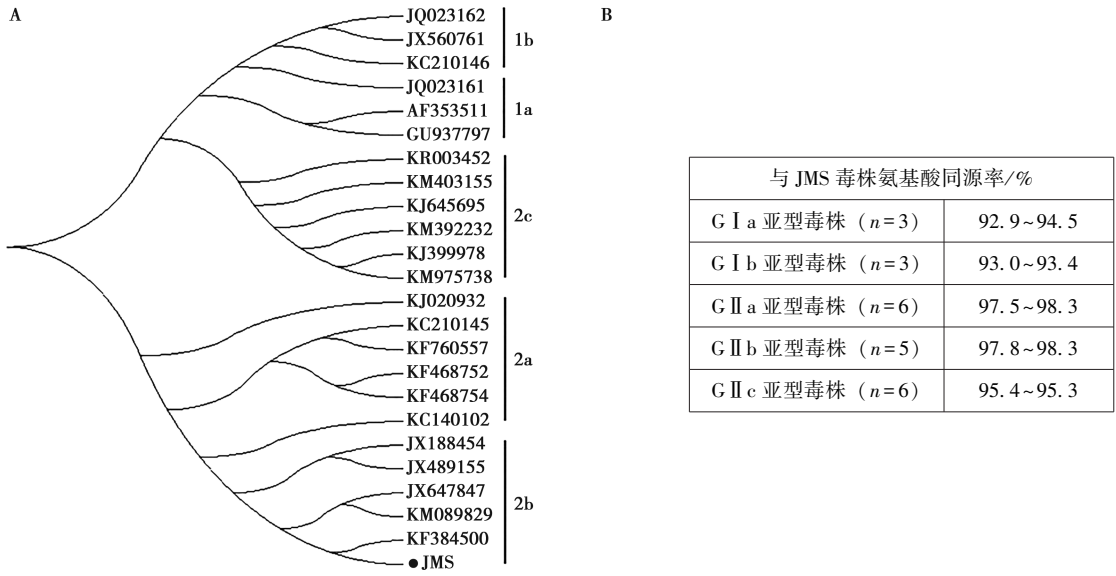


图2 PEDV-JMS 感染 Vero 细胞 (A) 和空肠类器官 (B) 增长曲线

2.3 PEDV-JMS 分离毒株基因型分析

为了确定分离毒株的基因型，从 ORF1b 和 ORF3 中保守区域设计引物，扩增分离毒株 S 基因并进行测序，然后通过 Maximum Likelihood（最大似然法）将

S 基因氨基酸序列进行系统进化树分析。结果显示，JMS 与 G II b 基因型毒株聚类在一个分支（图 3A），且氨基酸序列同源性最高，为 97.8%~98.3%（图 3B），表明 JMS 属于 G II b 基因亚型。



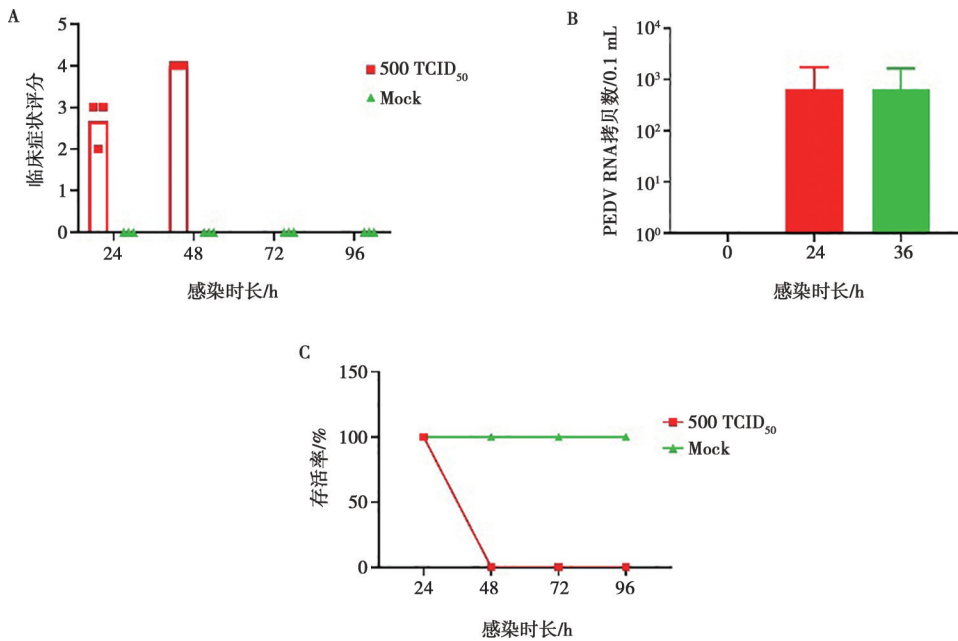
A. JMS 毒株系统进化树分析, ●表示本试验分离株; B. JMS 毒株与不同 PEDV 基因型毒株氨基酸同源性分析。

图 3 PEDV-JMS 分离株的基因型分析

2.4 PEDV -JMS 致病性试验

为了探究分离毒株的致病性, 取 JMS F9 代 500 TCID₅₀ 的病毒去感染仔猪, 并观察仔猪临床症状。结果显示, 攻毒仔猪第 1 天就出现水样腹泻 (图 4A)

且肛拭子中能检测到大量的病毒 (图 4B), 第 2 天仔猪全部死亡 (图 4C)。表明该毒株在较低的剂量下就能导致仔猪感染发病, 且 48 h 内造成仔猪死亡, 对仔猪致病性较强。



A. 临床症状打分; B. 不同时间点肛拭子病毒拷贝数; C. 存活率统计。

图 4 仔猪感染 PEDV-JMS 临床症状评估

2.5 感染仔猪病理学检测

将仔猪进行剖检,可观察到感染仔猪小肠肠壁变薄呈半透明状,肠内充满水样内容物(图5A),而对照组肠道正常无明显病变(图5B)。采取肠道组织

进行组织切片检查,结果显示感染仔猪小肠绒毛萎缩并大量脱落(图5C),而对照组小肠绒毛结构完整(图5D)。

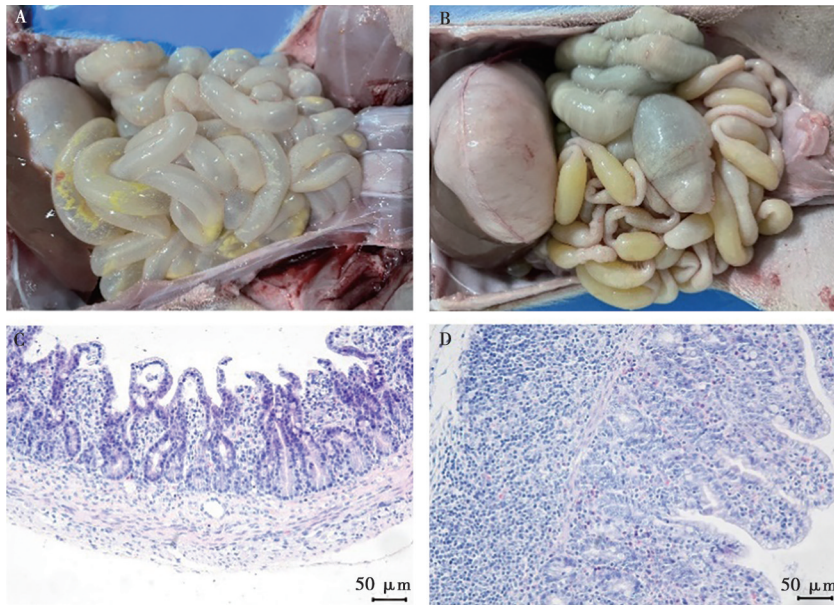


图5 仔猪剖检变化和和组织病变评估

3 讨论

PEDV早期流行的毒株为CV777,最早于1971年在英国发现,之后扩散至欧洲、亚洲、美洲,对养猪行业造成较大危害^[11]。

1988年,Hoffmann等^[12]研究人员经长期的研究发现,PEDV可在Vero细胞上生长与繁殖,并成功分离出PEDV,这一突破使得对PEDV的研究进入了一个全新的阶段;此后,研究人员陆续发现PEDV也可在猪肠上皮细胞(IEC)、猪膀胱细胞(SB1)和猪肾细胞(SK)生长与繁殖^[13-14]。在本次研究中,将仔猪腹泻病料处理后孵育Vero细胞,成功导致细胞病变,且病变细胞能与PEDV特异性抗体结合,表明成功分离出PEDV。但是本实验室在分离病毒时发现有些病料病毒Ct值很低却不易分离出病毒,后经过反复的试验发现病料经过冻融后分离病毒的概率明显降低。因此,在分离病毒时保证病料新鲜且不被反复冻融或许是成功分离病毒的关键。

PEDV S蛋白介导病毒的吸入与入侵,是诱导宿主产生中和抗体的主要靶标蛋白,根据S基因的不同可分为G I a、G I b、G II a、G II b、G II c和S-INDEL等6个基因亚型,目前中国主要流行G II a、

G II b、G II c等基因型^[15]。Sun等^[16]研究表明,PEDV-S基因进化树分析与整个病毒基因组进化树分析结果相一致。为了确定PEDV-JMS的基因型,将JMS S基因序列与NCBI数据库下载的参考序列进行Maximum Likelihood Tree分析,发现PEDV-JMS与G II b基因型毒株氨基酸序列同源性最高,为97.8%~98.3%,进化树结果显示PEDV-JMS毒株属于G II b基因型。值得注意的是,PEDV-JMS与G II a基因型氨基酸序列同源性也比较高,为97.5%~98.3%;当采用Minimum Evolution Tree分析时,PEDV-JMS毒株属于G II a基因型;采用Neighbor-Joining Tree分析时,PEDV-JMS毒株处于G II a和G II b之间(结果未展示),这或许表明PEDV-JMS可能为G II a和G II b的重组毒株。

PEDV攻毒剂量对于攻毒保护试验的成功与否至关重要。先前有研究报道PEDV 56.2 TCID₅₀病毒量即可导致仔猪发病,而PEDV感染猪场每立方米的空气中病毒Ct值约为22.7~26.3,文献报道56.2 TCID₅₀ Ct值为28.22、562 TCID₅₀ Ct值为24.22,因此每立方米空气中的病毒约为100~5 000 TCID₅₀^[17-18]。考虑到病毒并不会完全被仔猪吸入,本试验模拟临床病毒载量采用了500 TCID₅₀病毒对仔

猪进行攻毒, 结果仔猪表现出严重的临床症状, 且所有仔猪在攻毒后 2 d 全部死亡。对仔猪进行病理剖检发现, 感染仔猪肠壁明显变薄, 结合病料组织学检查发现肠绒毛萎缩、脱落等, 这表明 PEDV 对仔猪感染效率极强, 仅 500 TCID₅₀ 的病毒量即可导致仔猪腹泻脱水。在攻毒保护试验中过高的攻毒剂量或许对动物机体造成过大的压力从而影响试验结果, 采用合适的攻毒剂量或许是攻毒保护试验评估的重要参考标准之一, 而本研究中采用的攻毒剂量能够为后期的攻毒保护试验提供参考。

综上, 本研究成功分离到 1 株 G II b 基因型的 PEDV 毒株, 并且对仔猪攻毒剂量进行了相应的探索性研究, 为后期疫苗或治疗药物的研发奠定一定的基础。

参考文献:

- [1] 朱子健, 闫丽辉, 鞠妍, 等, 2015—2016 年我国东北地区猪病病毒性腹泻流行病学调查 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39 (5): 356-360.
- [2] 李媛, 程兰玲, 张慧敏, 等, 2018 年—2019 年新疆部分地区猪病毒性腹泻病原检测与分析 [J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43 (5): 477-481.
- [3] 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.
- [4] 常新见, 周金柱, 殷杰, 等, 2017—2019 年华东地区猪场主要病毒性腹泻病原调查 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51 (12): 3141-3150.
- [5] PENSART M B, DE BOUCK P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine [J]. Arch Virol, 1978, 58 (3): 243-247.
- [6] WANG D, FANG L, XIAO S. Porcine epidemic diarrhea in China [J]. Virus Res, 2016, 226: 7-13.
- [7] 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.
- [8] LI W, LI H, LIU Y, et al, New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (8): 1350-1353.
- [9] 钱永清, 闻人楚, 唐永兰, 等, 猪流行性腹泻病毒的分离培养与鉴定 [J]. 上海农业学报, 1999 (2): 41-44.
- [10] KWEON C H, KWON B J, LEE J G, et al, Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate [J]. Vaccine, 1999, 17 (20/21): 2546-2553.
- [11] SONG D, PARK B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. Virus Genes, 2012, 44 (2): 167-175.
- [12] HOFMANN M, WYLER R. Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26 (11): 2235-2239.
- [13] KUSANAGI K, KUWAHARA H, KATOH T, et al, Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate [J]. J Vet Med Sci, 1992, 54 (2): 313-318.
- [14] SONG D S, YANG J S, OH J S, et al, Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3 [J]. Vaccine, 2003, 21 (17/18): 1833-1842.
- [15] WANG H, ZHANG L, SHANG Y, et al, Emergence and evolution of highly pathogenic porcine epidemic diarrhea virus by natural recombination of a low pathogenic vaccine isolate and a highly pathogenic strain in the spike gene [J]. Virus Evol, 2020, 6 (2): veaa049.
- [16] SUN M, MA J, WANG Y, et al, Genomic and epidemiological characteristics provide new insights into the phylogeographical and spatiotemporal spread of porcine epidemic diarrhea virus in Asia [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53 (5): 1484-1492.
- [17] THOMAS J T, CHEN Q, GAUGER P C, et al, Effect of porcine epidemic diarrhea virus infectious doses on infection outcomes in naive conventional neonatal and weaned pigs [J]. PLoS One, 2015, 10 (10): e139266.
- [18] ALONSO C, GOEDE D P, MORRISON R B, et al, Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds [J]. Vet Res, 2014, 45 (1): 73.