

罗睿玺, 李怡萱, 林欢, 等. 猪 δ 冠状病毒检测技术研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 122-128.

LUO R X, LI Y X, LIN H, et al. Progress in research on detection techniques of porcine deltacoronavirus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 122-128.

猪 δ 冠状病毒检测技术研究进展

罗睿玺¹, 李怡萱¹, 林欢¹, 黄小波^{1,2,3*}

(1. 四川农业大学动物医学院猪病研究中心, 四川 温江 611130;

2. 农业农村部兽用药物与兽医诊断技术四川科学观测实验站, 四川 温江 611130;

3. 四川农业大学国家级动物类实验教学示范中心, 四川 温江 611130)

摘要: 猪 δ 冠状病毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV) 属于冠状病毒科 δ 冠状病毒属, 主要感染仔猪, 引起腹泻、脱水 and 死亡。PDCoV 在我国猪群流行不断增多, 严重威胁养猪业的健康发展。近年, PDCoV 的诊断技术取得较大进展, 在本病的防控中发挥了重要作用。本文重点对 PDCoV 的分离培养、血清学诊断技术、分子生物学诊断技术等进行了综述, 将为 PDCoV 新型检测技术的研究及其感染的临床防控提供参考。

关键词: 猪 δ 冠状病毒; 病毒分离; 血清学; 分子生物学; 进展

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)11-0122-07

Progress in research on detection techniques of porcine deltacoronavirus

LUO Ruixi¹, LI Yixuan¹, LIN Huan¹, HUANG Xiaobo^{1,2,3*}

(1. Research Center for Swine Diseases, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China;

2. Sichuan Science-observation Experiment Station of Veterinary Drugs and Veterinary Diagnostic Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wenjiang 611130, China;

3. National Animal Experiments Teaching Demonstration Center, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China)

Abstract: Porcine deltacoronavirus (PDCoV) belongs to the genus Deltacoronavirus of the Coronaviridae family. It mainly infects piglets and causes diarrhea, dehydration, and death in them. The epidemic of PDCoV is becoming more and more widespread in pig herds in China, which has caused serious economic losses to the pig industry. Rapid and accurate diagnostic techniques play a crucial role in prevention and control of diseases in pigs. Recently, the diagnostic techniques of PDCoV have achieved great progress. In this review, we have summarized the latest progress in research on PDCoV isolation and culture, serological diagnostic techniques, molecular biology diagnostic techniques, etc. which will be helpful for development of new diagnostic techniques and scientific prevention and control of PDCoV.

Keywords: PDCoV; virus isolation; serology; molecular biology diagnosis; research progress

猪 δ 冠状病毒 (porcine deltacoronavirus, PDCoV), 也称猪丁型冠状病毒, 属于套式病毒目、冠状病毒科、 δ 冠状病毒属。PDCoV 可感染各个日龄的猪, 但主要引起哺乳仔猪急性腹泻、脱水、死亡^[1]。2012 年, PDCoV 在中国香港首次被报道, 随

后美洲的美国、加拿大、墨西哥和秘鲁等, 以及亚洲的韩国、中国、泰国、老挝、越南、日本都有报道^[2]。我国大部分养猪省份均有 PDCoV 发生, 近年呈不断蔓延的趋势, 严重威胁养猪业健康发展^[3]。PDCoV 具有广泛的跨宿主传播特性, 可感染猪、小鼠、犊牛、鸡和火鸡等多种动物, 2021 年首次在海地儿童血浆中发现 PDCoV, 提示其具有潜在的公共卫生风险^[4]。PDCoV 感染猪的临床症状与猪流行性腹泻病毒 (porcine epidemic diarrhea virus, PEDV), 猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 和猪急性腹泻综合征病毒 (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV) 等

收稿日期: 2025-04-09; 2025-08-26

基金项目: 四川省大学生创新训练计划项目 (S202410626012); 四川省“十四五”川猪重大科技专项 (2021ZDZX0010); 四川省产教融合示范项目“饲料工业全产业链转型升级产教融合创新示范”

第一作者: 罗睿玺, 男, 本科生

* 通信作者: 黄小波, 教授, 研究方向为动物传染病与猪病学,

E-mail: rsgbh110@126.com。

病毒感染相似^[5]。本文从 PDCoV 的分离培养、血清学和分子生物学等诊断技术进行综述,为现有方法的优化和新技术的研究提供参考。

1 病毒分离培养

PDCoV 具有广泛的细胞嗜性,可在猪肾近曲小管上皮细胞 (LLC-PK1)、猪肠上皮细胞 (IPI-2I)、猪睾丸细胞 (ST) 和猪肾细胞 (PK-15) 等细胞上培养,分离效果受细胞类型、培养基添加物和样本类型等多因素影响。相同条件下相比 IPI-FX 和 ST 细胞, PDCoV 在 LLC-PK1 细胞增殖更快,是分离 PDCoV 最理想的细胞模型^[6]。PDCoV 从肠道内容物分离最佳,培养基添加胰酶有利于病毒增殖^[7]。李厚伟等^[8]发现 PDCoV 在 LLC-PK1 细胞中培养,病毒滴度与胰酶浓度先呈正相关而后呈负相关,高浓度的胰酶可能使细胞提前脱落而降低了病毒滴度。不添加胰酶时病毒在 LLC-PK1 细胞中也可复制,但病毒滴度较低且病变不明显^[9]。石迎等^[10]发现经过 ST 细胞分离的 PDCoV 可感染猪肠道细胞 IPEC-J2 并稳定传代,适应 IPEC-J2 细胞的 PDCoV 对仔猪表现较强的肠致病性。从自然感染样品分离 PDCoV 时,通常要盲传至第 3 代才可出现轻微的细胞病变 (cytopathic effect, CPE),细胞先变大聚集,随后皱缩坏死脱落,并且培养时需注意自然毒株对细胞系的适应性、培养基中的血清因子对病毒与细胞结合的抑制、细胞对胰酶的耐受能力等因素可能导致病毒分离失败^[11]。病毒分离培养对设备和人员操作要求较高,耗时较长,不适合临床诊断,分离病毒多用于致病机理、诊断试剂、疫苗开发等相关研究。

2 血清学诊断方法

2.1 病毒中和试验

病毒中和试验 (virus neutralization, VN) 通过抗体与病毒的特异性结合来阻止病毒感染宿主细胞,是检测 PDCoV 抗体的经典方法,包括传统 CPE 法和荧光焦点中和法 (fluorescent focus neutralization, FFN),但耗时均较长,条件要求高,结果易受主观因素影响^[12],而将 VN 微量化和利用荧光标记优化,可有效提高试验效率和灵敏度。Chen 等^[13]通过对病毒附着 ST 细胞前后分别进行中和试验验证抗体的中和能力,结果显示制备的单抗阻断病毒附着细胞前感染的效果是附着后的 10 倍,可能与单抗破坏 PDCoV S1 亚基和细胞受体之间的相互作用,从而抑制了 S 蛋白的构象变化而阻碍其感染宿主细胞有关。VN 检测的是所有具有中和活性的抗体,具有很强的特异性,这种中和抗体能与病毒粒子结合并阻止病毒感染

细胞。因此, VN 更能体现抗体对机体的免疫保护能力。

2.2 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

目前,已研发的 PDCoV 的特异性 ELISA 方法多是基于 N、M 或 S 蛋白建立的 ELISA 方法。N 蛋白刺激产生的抗体产生早、滴度高且持续时间长,刘磊等^[14]以重组 N 蛋白作为包被抗原,针对血清免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) G 检测建立了间接 ELISA 方法,与 VN 的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 86.36%、96.43% 和 92.00%,用该法检测 456 份广西地区不同阶段猪血清样品,阳性率为 40.40%。M 蛋白保守性较高并能介导 α 干扰素产生,张艺璇等^[15]用原核表达的 M 蛋白建立了一种间接 ELISA IgG 抗体检测方法,与 VN 总符合率为 95%,特异性和重复性良好。刘思雨等^[16]截短表达 NSP14 蛋白并建立间接 ELISA 抗体检测方法,其与 Western blot 的符合率为 94.4%。IgG 在血清中的含量较高,且半衰期较长^[17],而 IgA 在阻止肠道病原体吸附,介导黏膜免疫方面发挥重要作用。S1^b 是 S 蛋白的受体结合域,可通过糖基化修饰介导病毒免疫逃逸^[18],秦秋英等^[17]用原核表达的 S1^b 蛋白为抗原,建立了检测血清 IgA 抗体的间接 ELISA,与 Western blot 总符合率为 96.66%,对 486 份血清样品检测阳性率为 32.72%。Lu 等^[19]借助 HEK-293T 细胞表达 PDCoV S1 蛋白建立了检测 IgA 的 ELISA,对乳汁中病原检测较 IgG 检测方法更准确,适用于黏膜免疫的机制研究和疫苗效果评估。双抗体夹心 ELISA 较间接 ELISA 有更高特异性与灵敏度,可在蛋白水平实现定量测定^[20]。Bai 等^[21]用两种靶向 S 蛋白的单抗分别作为捕获和检测抗体,建立了双抗体夹心 ELISA 抗原检测方法,对重组 S 蛋白和 PDCoV 的检测限分别为 0.12 ng/mL 和 1.96×10^3 copies/ μ L,与实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 符合率为 91.03%,Kappa 值为 0.814。Wang 等^[20]用 N 蛋白特异性单抗和兔抗 PDCoV 多抗,建立的双抗夹心 ELISA 可检测灭活病毒的抗原,最低可检测 0.5 ng/mL 的 N 蛋白和 10^3 TCID₅₀/mL 病毒,敏感性和特异性为 80.8% 和 95.6%。对检测 219 份广西部分地区不同阶段猪群的血清样品的总体阳性率达 73.51%,其中日龄较大的猪群阳性率更高。Wang 等^[22]用重组 N 蛋白作为包被抗原,与 N 蛋白特异性单抗配对作为检测抗体,开发了一种阻断 ELISA 方法,对除猪以外的动物样本的诊断和流行病学调查也适用,诊断敏感性与特异性分别为 98.79% 和 100%。Yu 等^[23]以 CHO 细胞系统表达的 S 蛋白免疫羊驼,并筛选表达纳米抗体建立了

竞争 ELISA 抗体检测方法, 其与间接免疫荧光符合率高并与 VN 呈显著正相关, 适用于中和抗体检测, 并且纳米抗体具有高亲和力与特异性, 稳定性强, 有利于实现快速诊断。

ELISA 具有高特异性和敏感性, 适用于大规模临床样品检测。目前 PDCoV 的 ELISA 尚无商品化试剂盒。S 蛋白具有高变异性且分子量较大, 存在糖基化修饰而影响原核表达效果; N 蛋白保守性高可能与 PEDV、TGEV 发生交叉反应; M 蛋白存在表达量较少, 蛋白难以纯化且活性较低的问题。现有研究多采用原核表达系统, 能快速制备较多的抗原蛋白, 但存在蛋白修饰不足和形成包涵体蛋白难以纯化的问题, 而真核表达的蛋白更接近天然构象, 生物活性以及稳定性更强, 近期已有针对 PEDV^[24]、SADS-CoV^[25] 真核表达的抗原蛋白建立 ELISA, 可进一步提升诊断的敏感性和特异性。

2.3 荧光微球免疫分析 (fluorescence microsphere immunoassay, FMIA)

FMIA 是一种基于微球载体的高通量检测技术, 灵敏度高, 可实现同时高通量检测多种病原体, 能适应大量样本检测。Okda 等^[26] 基于重组 N 蛋白抗原开发了 FMIA 检测方法, 可高通量检测猪血清样品并具有良好的特异性和敏感性, 与间接 ELISA 和 IFA 符合率高。FMIA 是一种较新的血清学方法, 但依赖特定仪器和耗材成本较高, 并且微球和抗原间可能会发生非特异性结合或交叉反应, 临床实用性较低, 因此近年针对 PDCoV 的 FMIA 研究较少。而在 PEDV 上有报道将荧光微球结合时间分辨荧光免疫层析技术建立的检测方法可以实现定量测定, 检测线性范围宽能更好避免假阴性结果, 其最低可检测 1 : 512 倍稀释的阳性血清, 病毒效价与试纸条 T/C 值之间的线性关系良好, 对应可检测的最低病毒效价为 389 699.7 TCID₅₀/0.1 mL, 并具有较好的稳定性, 可在 4 °C 和室温至少保存 8 个月, 37 °C 则可保存 10 d^[27]。

2.4 免疫胶体金技术 (immune colloidal gold technique, GICT)

GICT 是通过带负电荷的胶体金与带正电荷的抗原或抗体静电结合形成复合物, 并保持蛋白质活性, 在免疫层析中参与反应显色^[28]。张敏等^[29] 基于原核表达 N 蛋白获得的单抗和羊抗小鼠 IgG 作为检测线和质控线制备了免疫胶体金检测试纸条, 特异性良好, 其检测病毒的最低限为 100 TCID₅₀。张玲娟^[30] 采用 CHO 细胞表达 N 蛋白免疫原性高并通过煮沸充分打开蛋白线性表位, 提升了胶体金技术敏感性, 其检测的最低病毒限度为 10^{1.67} TCID₅₀, 与其他的猪腹泻病毒的四重 RT-qPCR 阳性结果符合率为 96.4%。Wang

等^[31] 同样用特异性识别 N 蛋白的单抗开发胶体金试纸, 其与 RT-qPCR 不同结果说明 PCR 抑制效应和检测中核酸的降解会影响 qPCR 的准确性。与 ELISA 抗原检测方法比较, 免疫胶体金试纸条具有微量、快速、操作简单、结果更直观、结果肉眼可判等优点, 但易受环境和样本成分干扰, 所以更适用于疫病初筛和现场快速诊断。此外已有手持的胶体金定量分析设备可对胶体金显色情况转化为具体数值进行定量或半定量测定^[28], 有利于客观量化分析, 纳米荧光材料等新型材料替代胶体金颗粒结合可增强结果的可视化, 使结果的量化分析更细致准确。

3 分子生物学方法

3.1 逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 及其衍生技术

RT-PCR 灵敏、快速、成本较低, 是目前诊断 PDCoV 最常用的方法之一, 但不能区分样品中的活病毒或死病毒。已有根据 N、M、S 基因建立的 RT-PCR 方法, 其中 M、N 基因保守并能与 PEDV、TGEV 等区分, 且 N 基因建立的方法灵敏度更高, 有报道可达到 10³ copies/μL, S 基因易变异, 可用于病毒进化分析^[11]。董志珍等^[32] 在反应体系中添加纳米颗粒, 有效提升扩增效率, 其检测最低限度为 10² copies/μL, 具有较常规 RT-PCR (10³ copies/μL) 更高的敏感性。由于 PDCoV 和其他肠道病毒引起的临床症状相似且常混合感染, 为提高结果准确性并实现病毒鉴别诊断, 近年方法多朝建立灵敏度更高的多重 RT-PCR 发展, 如陈见兴等^[33] 基于 PDCoV 和 SADS-CoV 的 N 基因、A 型塞内卡病毒 (SVA) 的 L/P1 基因建立了同步检测这些病毒的重重 RT-PCR, 对 3 种病毒重组质粒标准品最低检测限度分别为 1、1 和 10 copies/μL, 并对 273 份临床样品和其他已报道同种病毒检测方法结果一致。Li 等^[34] 根据 PEDV 和 PDCoV 的 N 基因各设计 2 对引物, 建立了双重套式 RT-PCR (duplex nested RT-PCR, dnRT-PCR), 对两种病毒的最低检测限度均为 10 copies/μL, 较常规 RT-PCR 符合率更高, 能抵抗混合模板干扰准确检测, 并且可对结果进行测序以利于开展分子流行病学调查。为适应现场检测, 候闻闻等^[35] 建立了检测 PEDV、TGEV、PDCoV 和猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 的恒温隔绝式荧光 RT-PCR 方法 (reverse transcription - insulated isothermal PCR, iiRT-PCR), 对 4 种病毒的检测下限分别为 10²、10²、10³、10³ TCID₅₀, 敏感性略低于 RT-qPCR, iiRT-PCR 仪器更轻小便携, 操作简单, 并避免了琼脂糖凝胶电泳导致的交叉污染。

RT-qPCR 与普通 PCR 相比, RT-qPCR 可实时监控 DNA 扩增的量, 且具有更高灵敏度和特异性^[36], 常用于实验室检测 PDCoV。目前, 针对 PDCoV 的 RT-qPCR 技术的研究可分为 SYBR 染料法和 TaqMan 探针法两大类, 前者会与引物二聚体等非特异性扩增产物结合导致假阳性, 而 TaqMan 探针法灵敏度更高且检测时间更短^[37]。刘德清等^[38]根据 N 基因建立了 TaqMan RT-qPCR, 敏感性比普通 PCR 高 100 倍, 用时 1.5 h, 较普通 PCR (4 h) 更快, 并能避免因开盖或电泳过程中的气溶胶污染。但普通 RT-PCR 有利于扩增后测序用于病毒分型或溯源, 因此可两种方法联用, 快速筛选后再扩增测序从而达到更好的诊断效果。同 RT-PCR, 为实现更准确的鉴别诊断, 也开发了基于 TaqMan 探针法的多重 RT-qPCR, 如刘如月等^[39]基于 PEDV M 基因和 PDCoV N 基因, 建立了同步检测 PEDV 和 PDCoV 的双重 TaqMan RT-qPCR, 检测 PDCoV 的最低下限是 3.17×10^1 copies/ μL , 对 118 份粪样检测结果显示 PEDV 阳性率为 56.8%, PDCoV 阳性率为 33.1%, 二者共感染率为 16.1%。Hou 等^[40]建立了检测 PEDV、PoRV 和 PDCoV 的三重 TaqMan RT-qPCR。高艺祥等^[41]建立检测 PDCoV、TGEV、PoRV 和 PEDV 的四重 TaqMan RT-qPCR, 两者检测 PDCoV 最低量分别为 6.0×10^1 copies/ μL 、 1.17×10^3 copies/ μL , 特异性好。与 RT-PCR 相似, 这些方法多基于敏感性更高的 N 基因设计引物, 多重 RT-PCR 可实现对猪群中混合感染情况的监测, 但这些方法引物设计较为复杂, 扩增体系和条件较难优化。未来可进一步结合免疫层析等技术, 为现场快速诊断提供思路。

刘影等^[42]开发了检测 PDCoV 的微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR), 该方法不依赖于标准曲线, 最低检出量可达 1.37 copies/ μL , 敏感性高于荧光 PCR 方法。本方法虽然有利于早期诊断, 但微滴式数字 PCR 也存在设备和试剂昂贵的问题, 不利于大规模应用。

3.2 等温扩增技术

核酸扩增技术主要包括变温检测 (如 PCR) 和等温检测两大类, 其中等温检测技术无复杂温控, 更适用于资源受限场景的检测需求^[43]。常见的等温检测技术有环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 重组酶聚合扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA), 滚环等温扩增 (rolling circle amplification, RCA), 重组酶介导链置换等温扩增 (recombinase aided chain displacement isothermal amplification, RAA), 依赖解旋酶等温扩增技术 (helicase-dependent amplification, HDA)

和单引物等温扩增技术 (single primer isothermal amplification, SPIA) 等^[11]。目前 PDCoV 已建立 LAMP、RPA 和 RAA 方法, 并注重多技术融合创新。

LAMP 技术基于 Bst DNA 聚合酶的链置换活性, 在 65 °C 恒温条件下通过 4 个特异性引物识别靶基因 6 个区域, 形成哑铃状 DNA 模板进行指数扩增^[43]。LAMP 操作简便, 结果肉眼可见, 对仪器的需求低^[44], 在基层养殖场应用前景广泛, 但较 PCR 更易出现“假阳性”结果且易因反应颜色不明显而误判^[45]。为优化结果判读, 赵云环等^[46]在反应管中加入羟基苯酚蓝显色剂, 使颜色反应更直观, 最低可以检出含 5.1×10^1 copies/ μL 的 PDCoV 的样品, 与普通 RT-PCR 一致。邓可辉等^[44]建立了可同时检测 PEDV、TGEV、PDCoV 的反转录环介导等温扩增技术 (reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP), 对临床样本检测阳性率均高于常规 RT-PCR。为提高检测的选择性和灵敏度, 肖利亭^[47]将 LAMP 与电化学阻抗联用检测 PDCoV, 扩大了 LAMP 检测范围 ($10^2 \sim 10^7$ copies/ μL), 检出下限达 33.33 copies/ μL 。EL-THOLOTH 等^[48]结合微流控技术, 开发了一种低成本、快速、半定量并可现场部署的 3D 打印的微流控装置, 该装置能够实现样本自动分配、闭管、实时检测及 RT-LAMP, 检测效果同 RT-qPCR。Shen 等^[49]建立了以裂解探针为基础的逆转录环介导的等温扩增 (CP-RT-LAMP) 方法, 当裂解探针与目标序列特异性互补时才产生荧光信号, 可减少假阳性结果, 对 PDCoV 临床样本检出率 (26%) 高于 RT-qPCR 法 (17%)。传统 LAMP 限制扩增较长基因片段的使用, 并可能产生非特异性扩增导致假阳性, 通过与微流控、裂解探针等技术结合能够有效提高结果的准确性, 但制作工艺或操作更难, 更依赖高质量芯片和酶, 对样本纯度要求更高。

RPA 技术是在 37~42 °C 下进行的指数级扩增, 引物设计比 LAMP 简单, 扩增性能与 PCR 相当, 能够满足单拷贝检测^[50]。肖帅等^[51]开发的 RPA 检测方法在 38 °C 15 min 内可完成对样品的检测, 灵敏度达 10^3 copies/ μL 。RPA 在病毒检测中结合侧流层析试纸条便于结果直接判读, 魏语泽等^[52]结合侧流层析试纸条建立的 LF-RT-RPA 法在 37 °C 12 min 内即可出可视化的结果, 较 RT-PCR 检出率更高, 检测时间更短。在食源性病毒检测中单一 RPA 检测往往不能满足检测需求, 舒佳新等^[53]建立了可同时检测非洲猪瘟病毒 (ASFV)、PDCoV 及 SVA 的多重实时荧光 RPA 检测方法, 对 PDCoV 的灵敏度达 770 copies/ μL 。RPA 技术具有方便、快速、特异性较高的优点^[54], 已广泛用于病毒核酸检测。但是 RPA 依

赖多种酶的协同作用,对试剂保存和稳定性有更高要求,其扩增效率影响因素较多,缺乏温度对引物结合的控制,试验时要避免非特异性扩增。

CRISPR/Cas 等温级联扩增技术引入了新型核酸识别与扩增体系,为病毒检测提供了新的可能性。CRISPR/Cas 系统是存在于原核生物中的一种应对外来入侵的免疫机制^[55],已应用于建立 PEDV 和 ASFV 的检测方法。Luo 等^[56]结合 RPA 和 CRISPR/Cas13a 建立 PDCoV 检测方法,可在 90 min 内完成检测,并具有高特异性和灵敏度,其最低检测限度为 5.7×10^1 copies/ μ L。CRISPR/Cas13a 可补足 RPA 较低的敏感性,并减少对仪器设备的依赖,较 qPCR 更加便捷,可为普通养殖场应用提供参考。

RAA 技术是利用重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶在 37~42 °C 条件下实现靶序列快速扩增的技术,原理与 RPA 有相似,检测时间通常不超过 60 min^[57]。Ye 等^[58]结合反转录核酸等温扩增 (reverse transcription recombinase-aided amplification, RT-RAA) 的快速性和侧流层析分析 (lateral flow assay, LFA) 的可见性和便携性,建立了一种三重核酸检测方法 RT-RAA-LFA,能特异性鉴别 PEDV、PDCoV 和 TGEV,其中检测 95% 的 PDCoV 下限是 478 copies/ μ L。RAA 技术具有很高的特异性和扩增效率,较 RT-qPCR 具有快速和对温度控制设备要求低的优势,但操作中要注意避免气溶胶污染并排除抑制剂影响。

3.3 基因芯片

基因芯片是基于核酸杂交原理,将固定在载玻片或其他载体上的探针分子与标记的样品分子进行杂交,通过检测杂交信号强度获取样品分子的数量和序列信息^[59]。Jia 等^[60]开发了一种基于双引物寡核苷酸 (dual priming oligonucleotide, DPO) 的多重实时 SYBR Green RT-PCR,能区分 PEDV、TGEV、PDCoV 和 PRoV,最低检测限度分别为 8.63×10^2 copies/ μ L, 1.92×10^2 copies/ μ L, 1.74×10^2 copies/ μ L 和 1.76×10^2 copies/ μ L,此方法使用 DPO 引物,特异性较常规引物更高,可降低不同引物之间的竞争而间接提升扩增效率,并较传统 RT-PCR 显示出更高准确性。基因芯片能实现同时对多种疾病的鉴别诊断,但需要专门的仪器设备进行数据的读取分析,定量准确性受到探针饱和度和背景噪声的影响,存在探针制作门槛较高,仪器设备昂贵等问题,不便于推广。

4 小结

PDCoV 主要引起哺乳仔猪的腹泻和死亡。由于 PDCoV 感染的病猪症状和其他腹泻病相似,且混合

感染比较普遍,因此鉴别诊断非常重要。目前采用的病毒分离培养方法耗时费力,不适于临床快速诊断。血清学检测方法更适用于大规模抗体检测,一般不适合早期诊断,早期诊断多采用 RT-PCR 和 RT-qPCR 诊断。dd PCR 与基因芯片设备昂贵,不便临床推广;LAMP、RPA 和 RAA 等不依赖专业设备,但固定的反应体系和较高的成本影响其普适性,易造成气溶胶污染和非特异性扩增;利用 CRISPR/Cas 系统建立的检测方法尚未临床应用。

上述现有方法均存在各自的优点和局限性,未来需要继续研发灵敏性高、特异性好、快速价廉和简便的检测技术。单一技术有局限,可结合 CRISPR/Cas 系统、纳米颗粒、纳米荧光素酶等不同方法和新型材料进行优化设计,进一步提升诊断准确性和实用性。现已有 PDCoV 灭活疫苗上市,未来可开发鉴别疫苗免疫和感染抗体的方法。此外,PDCoV 存在基因变异风险^[61],分子检测技术应随病原变异而不断优化。随着对 PDCoV 基因组、致病机理等的深入研究和学科交叉融合,将不断有针对 PDCoV 的新型检测技术出现,为 PDCoV 感染的诊断和防控提供更好的技术支撑。

参考文献:

- [1] LIU Q, WANG H Y. Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis [J]. *Vet Res Commun*, 2021, 45 (2/3): 75-86.
- [2] YEN L, MAGTOTO R, MORA-DÍAZ J C, et al. The N-terminal subunit of the porcine deltacoronavirus spike recombinant protein (S1) does not serologically cross-react with other porcine coronaviruses [J]. *Pathogens*, 2022, 11 (8): 910.
- [3] WANG Z, QU K, LI J, et al. Prevalence and potential risk factors of PDCoV in pigs based on publications during 2015-2021 in China: comprehensive literature review and meta-analysis [J]. *Microb Pathog*, 2023, 179: 106118.
- [4] LEDNICKY J A, TAGLIAMONTE M S, WHITE S K, et al. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children [J]. *Nature*, 2021, 600 (7887): 133-137.
- [5] 陈梦茹,王悦,冯华朋,等.猪急性腹泻综合征冠状病毒的流行、致病机制及防控研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2024, 52 (10): 26-34.
- [6] XIAO W, WANG X, WANG J, et al. Replicative capacity of four porcine enteric coronaviruses in LLC-PK1 cells [J]. *Arch Virol*, 2021, 166 (3): 935-941.
- [7] 秦毅斌,何莘萍,卢冰霞,等.猪丁型冠状病毒 CH/GX/1468B/2017 的分离鉴定及全基因组序列分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46 (7): 1907-1916.
- [8] 李厚伟,王蕾,张先锋,等.猪丁型冠状病毒在悬浮培养猪肾细胞 LLC-PK1 上的增殖特性分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53 (6): 2024-2028.

- [9] HU H, JUNG K, VLASOVA A N, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53 (5): 1537-1548.
- [10] 石迎, 陶洁, 李本强, 等. 适应肠道细胞的猪德尔塔冠状病毒对仔猪的致病性分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2024, 29 (5): 56-64.
- [11] 强桃艳, 成温玉, 张彝, 等. 猪 δ 冠状病毒病原检测方法研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42 (4): 83-88.
- [12] 张玉杨. 猪流行性腹泻病毒基因组和诊断方法研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2024, 53 (10): 12-20.
- [13] CHEN R, ZHOU G, YANG J, et al. A novel neutralizing antibody recognizing a conserved conformational epitope in PDCoV S1 protein and its therapeutic efficacy in piglets [J]. *J Virol*, 2025, 99 (2): e02025-24.
- [14] 刘磊, 秦毅斌, 陈忠伟, 等. 基于猪丁型冠状病毒重组蛋白 N 间接 ELISA 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国兽医科学*, 2022, 52 (11): 1347-1354.
- [15] 张艺璇, 任豪杰, 闫瑞杰, 等. 基于猪丁型冠状病毒重组 M 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立与应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (1): 84-88.
- [16] 刘思雨, 何颖, 卢冰霞, 等. 猪丁型冠状病毒 NSP14 蛋白截短表达及其间接 ELISA 抗体检测方法的建立 [J]. *南方农业学报*, 2024, 55 (4): 1238-1248.
- [17] 秦秋英, 张政, 黄夏玲, 等. 猪丁型冠状病毒截短 S 蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立与应用 [J]. *中国兽医科学*, 2024, 54 (1): 48-55.
- [18] XIONG X, TORTORICI M A, SNIJDER J, et al. Glycan shield and fusion activation of a deltacoronavirus spike glycoprotein fine-tuned for enteric infections [J]. *J Virol*, 2018, 92 (4): e01628-17.
- [19] LU M, LIU Q, WANG X, et al. Development of an indirect ELISA for detecting porcine deltacoronavirus IgA antibodies [J]. *Arch Virol*, 2020, 165 (4): 845-851.
- [20] WANG W, LI J, FAN B, et al. Development of a novel double antibody sandwich ELISA for quantitative detection of porcine deltacoronavirus antigen [J]. *Viruses*, 2021, 13 (12): 2403.
- [21] BAI Y, YU R, ZHOU G, et al. A novel double-antibody sandwich ELISA based on monoclonal antibodies against the viral spike protein detects porcine deltacoronavirus infection [J]. *Microbiol Spectr*, 2025, 13 (4): e02854-24.
- [22] WANG W, ZHANG Y, YANG H. Development of a nucleocapsid protein-based blocking ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus antibodies [J]. *Viruses*, 2022, 14 (8): 1815.
- [23] YU R, ZHANG L, BAI Y, et al. Development of a nanobody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the sensitive detection of antibodies against porcine deltacoronavirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2025, 63 (3): e01615-24.
- [24] 邓瑞德, 陈志雄, 胡泽奇, 等. 基于 PEDV IgA 间接 ELISA 方法对母猪产前血清与初乳中 IgA 相关性的研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2024, 46 (12): 1245-1254.
- [25] 杨小曼, 时洪艳, 张燎原, 等. 猪急性腹泻综合征冠状病毒 S1 蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2024, 46 (6): 608-613.
- [26] OKDA F, LAWSON S, LIU X, et al. Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of porcine deltacoronavirus [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12: 95.
- [27] 王华俊, 赵雪丽, 闫若潜, 等. 猪流行性腹泻病毒时间分辨荧光免疫层析检测方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43 (1): 40-45.
- [28] 李雨芮, 刘晓雅, 张文劲, 等. 免疫层析技术及应用的研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41 (1): 192-198.
- [29] 张敏, 孔冬妮, 李建, 等. 猪 δ 冠状病毒胶体金试纸条检测方法的建立 [J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55 (12): 1-8.
- [30] 张铃娟. 猪德尔塔冠状病毒 N 蛋白单抗研制及胶体金检测技术建立 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
- [31] WANG W, FAN B, ZHANG X, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic assay strip using monoclonal antibody for rapid detection of porcine deltacoronavirus [J]. *Front Microbiol*, 2023, 13: 1074513.
- [32] 董志珍, 张霞, 柴铭骏, 等. 猪德尔塔冠状病毒纳米 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2019, 36 (8): 91-95.
- [33] 陈见兴, 王豪杰, 潘喻, 等. PDCoV、SADS-CoV 与 SVA 三重 RT-PCR 检测方法的建立与应用 [J]. *微生物学通报*, 2023, 50 (12): 5439-5448.
- [34] LI C Q, HU L Q, LIU G P, et al. A duplex nested RT-PCR method for monitoring porcine epidemic diarrhea virus and porcine delta-coronavirus [J]. *BMC Vet Res*, 2023, 19 (1): 151.
- [35] 侯闻闻, 余良政, 樊毛迪, 等. 4 种猪腹泻病毒恒温隔绝式荧光 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55 (9): 83-88.
- [36] 张森, 杨伟, 汤德元, 等. 猪 δ 冠状病毒基因组学及诊断技术研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40 (7): 1429-1432.
- [37] 陆婧, 李敏, 王艳, 等. 鸭呼肠孤病毒 TaqMan 与 SYBR Green 荧光定量检测方法的建立及比较 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (2): 237-243.
- [38] 刘德清, 王艳午, 孙思扬, 等. 猪德尔塔冠状病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立及初步应用 [J]. *中国动物传染病学报*, 2022, 30 (3): 127-132.
- [39] 刘如月, 刘涛, 柳珊, 等. 猪流行性腹泻病毒和猪丁型冠状病毒双重 TaqMan qRT-PCR 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43 (7): 734-738, 758.
- [40] HOU W, FAN M, ZHU Z, et al. Establishment and application of a triplex real-time RT-PCR assay for differentiation of PEDV, PoRV, and PDCoV [J]. *Viruses*, 2023, 15 (6): 1238.
- [41] 高艺祥, 王金凤, 张倩, 等. 同时检测 PDCoV、TGEV、PoRV 和 PEDV 的四重实时荧光 RT-PCR 方法的建立及应用 [J]. *中国兽医学报*, 2023, 43 (3): 448-454, 461.
- [42] 刘影, 周建浩, 王东方, 等. 猪丁型冠状病毒微滴式数字 PCR 定量检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2025, 55 (3): 369-374.
- [43] 廖怡雯, 叶景芬, 武绍碧, 等. 环介导等温扩增技术的发展及其在耐药基因检测中的应用 [J]. *畜牧兽医学报*, 2025, 56 (4): 1621-1631.
- [44] 邓可辉, 陈志飞, 俞婷, 等. 基于 N 基因的 RT-LAMP 技术检测 PEDV、TGEV、PDCoV 三种猪腹泻冠状病毒的研究 [J]. *中国动物传染病学报*, 2025, 33 (2): 70-79.
- [45] 李林岳, 李任峰, 袁嘉康, 等. 猪流行性腹泻病毒可视化 RT-LAMP 检测方法的建立与初步应用 [J]. *中国预防兽医学报*,

- 2023, 45 (8): 814-821, 828.
- [46] 赵云环, 罗尚星, 顾文源, 等. 猪丁型冠状病毒可视化 LAMP 检测方法的建立与应用 [J]. 中国兽医科学, 2022, 52 (1): 19-24.
- [47] 肖利亭. 环介导等温扩增-电化学联用或基于纳米酶的酶联免疫法检测猪德尔塔冠状病毒研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2023.
- [48] EL-THOLOTH M, BAI H, MAUK M G, et al. A portable, 3D printed, microfluidic device for multiplexed, real time, molecular detection of the porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine deltacoronavirus at the point of need [J]. *Lab Chip*, 2021, 21 (6): 1118-1130.
- [49] SHEN H, WANG S, HUANG J, et al. A novel, cleaved probe-based reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for specific and sensitive detection of porcine deltacoronavirus [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 896416.
- [50] 肖航, 王小燕, 邓兆佳, 等. 核酸等温扩增技术在病毒检测中的应用 [J]. 高等学校化学学报, 2024, 45 (7): 1-17.
- [51] 肖帅, 刘新生, 方玉珍, 等. 猪德尔塔冠状病毒重组聚合酶扩增检测方法的建立与应用 [J]. 动物医学进展, 2019, 40 (3): 9-14.
- [52] 魏语泽, 孟凡茹, 裴志花, 等. 猪 δ 冠状病毒 Basic RT-RPA 和 LF-RT-RPA 方法的建立与应用 [J]. 经济动物学报, 2024, 28 (4): 311-318.
- [53] 舒佳新, 陈传君, 谢礼, 等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测猪肉及其制品中 ASFV、PDCoV 和 SVA [J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35 (7): 1013-1020.
- [54] ZHOU C, LIU L, CHEN J, et al. Rapid authentication of characteristic milk powders by recombinase polymerase amplification assays [J]. *Food Chem*, 2024, 443: 138540.
- [55] 陈秀琴, 林魁, 张世忠, 等. 基于 CRISPR/Cas 系统的生物传感器在动物疫病诊断中的应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55 (7): 2859-2876.
- [56] LUO R, CHENG Z, WANG H, et al. CRISPR/Cas13a-based rapid detection method for porcine deltacoronavirus [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1429486.
- [57] 刘晴晴, 王宁宁, 成军, 等. 基于重组酶介导等温扩增技术检测人腺病毒 4 型方法的建立与评价 [J]. 山东大学学报 (医学版), 2023, 61 (10): 74-82.
- [58] YE H, WANG X, ZHOU L, et al. Development of a triplex RT-RAA-LFA assay for the rapid differential diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus, porcine deltacoronavirus and transmissible gastroenteritis virus [J]. *Microb Pathog*, 2024, 195: 106885.
- [59] 张雪冰, 潘纹玉, 陈丽丽. 新型冠状病毒实验室检测方法研究进展 [J]. 病毒学报, 2021, 37 (2): 428-434.
- [60] JIA S, FENG B, WANG Z, et al. Dual priming oligonucleotide (DPO) - based real - time RT - PCR assay for accurate differentiation of four major viruses causing porcine viral diarrhea [J]. *Mol Cell Probes*, 2019, 47: 101435.
- [61] XU X, SUN J, ZHENG H, et al. Isolation and characterization of a novel S-gene mutation porcine deltacoronavirus with high pathogenicity from diarrhea piglet in Zhejiang Province, China, 2022 [J]. *Microb Pathog*, 2024, 197: 107095.