



猪星状病毒分型与检测方法研究进展

申艳梅,姜永厚

(浙江理工大学生命科学与医药学院,杭州 310018)

摘要:猪星状病毒(Porcine astrovirus, PAsV)是猪群中广泛存在的一种病原体,已确定的 5 种主要基因型(PAsV1—PAsV5)在遗传进化、流行特征及致病性方面差异显著,且部分基因型具有潜在的人畜共患风险。PAsV 主要引起仔猪腹泻与发育障碍,常与其他肠道病原体混合感染,持续危害养猪业,目前尚无特效疫苗或抗病毒药物。开发快速、准确的检测技术对疫情防控和公共卫生评估至关重要,现有检测方法已从传统病原学技术发展到现在以实时荧光定量 PCR 为核心的分子诊断体系。该文系统综述了 PAsV 的基因型多样性、分子进化特征与各类检测技术的原理与应用进展,旨在为 PAsV 的流行病学研究、实验室诊断与综合防控提供参考。

关键词:猪星状病毒;基因型;分子分型;实时荧光定量 RT-PCR;流行病监测

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2026) 09-0680-10

引文格式:申艳梅,姜永厚. 猪星状病毒分型与检测方法研究进展[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2026,55(5):680-689.

Reference Format: SHEN Yanmei, JIANG Yonghou. Research progress on typing and detection methods of porcine astrovirus[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(5): 680-689.

Research progress on typing and detection methods of porcine astrovirus

SHEN Yanmei, JIANG Yonghou

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Porcine astrovirus (PAsV) is a widely prevalent pathogen in swine populations, with five identified major genotypes (PAsV1—PAsV5) exhibiting significant genetic diversity, distinct epidemiological characteristics, and varying pathogenic potential. Some genotypes additionally pose potential zoonotic risks. The virus primarily causes diarrhea and growth retardation in piglets and often co-infects with other enteric pathogens, posing persistent challenges to the swine industry. Currently, no specific vaccines or antiviral treatments are available, underscoring the critical need for rapid and accurate detection methods to support epidemic control and public health risk assessment. Diagnostic approaches have evolved from conventional etiological techniques to molecular systems centered on real-time quantitative PCR. This review systematically summarizes the genetic diversity and molecular evolutionary traits of PAsV as well as the principles and applications of current detection technologies, aiming to provide reference for epidemiological studies, laboratory diagnosis, and integrated prevention strategies related to this virus.

Key words: porcine astrovirus; genotype; molecular genotyping; real-time quantitative RT-PCR; epidemiological surveillance

收稿日期: 2026-01-19 网络出版日期: 2026-05-08

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LGC21C180002)

作者简介: 申艳梅(1998—),女,云南昭通人,硕士研究生,主要从事病毒分子生物学与诊断技术方面的研究。

通信作者: 姜永厚, E-mail: yonghoujiang@zstu.edu.cn

0 引 言

猪星状病毒(Porcine astrovirus, PAsV)属于星状病毒科(Astroviridae)哺乳动物星状病毒属(Mamastrovirus),是一种无包膜的单股正链 RNA 病毒^[1]。星状病毒科分 2 个属,哺乳动物星状病毒属与禽星状病毒属(Avastrovirus),二者分别特异性感染哺乳动物和鸟类^[1]。基于高变衣壳蛋白(Capsid protein, CP)基因的遗传差异,这 2 个属可进一步划分为 2 个基因群^[2]。Bridger 等^[3]于 1980 年首次通过电镜在 3 周龄腹泻仔猪粪便中检出 PAsV;Shimizu 等^[4]在猪胚肾细胞中首次成功分离出一株能够诱导细胞病变效应的 PAsV 毒株,但该病毒的分子特征直至 2001 年才得以解析^[5]。迄今为止,全球范围内已鉴定出 5 种流行程度各异的 PAsV 基因型(PAsV1—PAsV5)^[6-7]。PAsV 的系统发育分析揭示,PAsV1—PAsV5 基因型在进化树上并非聚集为一个单系群,而是形成了数个独立的分支;其中,部分分支与牛、羊等其他动物星状病毒的亲缘关系更为接近,并非与 PAsV 的其他基因型聚集^[8-9]。全基因组序列分析进一步证实,PAsV3 的开放阅读框 1b(Open reading frame 1b, ORF1b)和开放阅读框 2(ORF2)区域分别与猪源和牛源星状病毒存在重组信号,表明其可能起源于跨物种传播^[9]。综上所述,PAsV 的不同基因型可能并非起源于单一的共同祖先,是存在多系起源,在进化历史上可能发生了多次独立的跨物种传播事件。

不同 PAsV 基因型具有明显的遗传多样性,呈现出特征各异的致病性。其中,PAsV3 具有嗜神经性,可突破血脑屏障并损伤中枢神经系统^[10];常见的 PAsV1、PAsV2、PAsV4 和 PAsV5 则主要定位于肠道,引起以呕吐、水样腹泻和脱水为主要特征的胃肠炎^[11]。断奶仔猪是 PAsV 肠道致病基因型感染的核心易感群体,感染后常因肠道损伤和营

养吸收障碍,引发仔猪发育迟滞与体重减轻,进而影响生长性能^[12]。在养殖现场,PAsV 常与轮状病毒、冠状病毒等肠道病原体形成复合感染,协同加剧肠道损伤与临床症状,给全球养猪业造成重大经济损失^[13-16]。此外,PAsV 还表现出潜在的人畜共患风险,在人腹泻患者粪便中检测到动物源性的病毒株,说明该病毒可能通过污染源或直接接触途径传播^[17-18]。但目前尚无针对 PAsV 的特异性药物或疫苗。为此建立有效的 PAsV 主动监测体系,对于保障畜牧业的可持续发展与防范公共卫生风险具有双重重要意义。为应对 PAsV 基因组高度的多样性带来的诊断挑战,本文系统阐述了其基因组特征与分类,并分析了现有检测技术因遗传变异所致的局限性及对不同基因型的检出偏差,以期为实现精准监测与防控提供理论参考。

1 基因组结构与分类体系

PAsV 作为星状病毒科的典型成员,其基因组为长约 6.8~7.2 kb 的单股正链 RNA,3'端具 poly(A)尾,而 5'端含短非翻译区(Untranslated region, UTR)^[19],基因组包含 3 个保守 ORF,ORF1a 编码参与多聚蛋白加工的非结构蛋白酶(Nonstructural protein 1a, NSP1a),ORF1b 通过-1 核糖体移码机制(依赖 AAAA 滑动序列及假结构)与 ORF1a 融合表达 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[19-20]。ORF2 则经亚基因组 RNA(Subgenomic RNA, sgRNA)独立转录,编码衣壳前体蛋白(见图 1),该前体蛋白需经细胞内 caspase 及细胞外胰蛋白酶等多步骤加工后,形成成熟的病毒 CP^[21-23]。值得注意的是,ORF2 的 C 端高变区驱动抗原多样性及宿主适应性进化,与病毒毒力密切相关,这为诊断靶标设计提供了关键分子基础;同时,ORF2 中完整衣壳蛋白编码序列的遗传差异,是构成现行分类标准的依据^[6,24]。

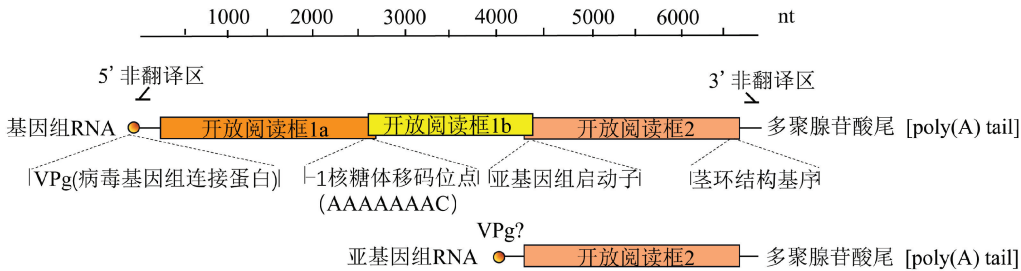


图 1 星状病毒基因组和亚基因组 RNA 组织示意图

注:基因组 RNA 的 5'端(黄色)共价连接病毒基因组连接蛋白(VPg);亚基因组 RNA 可能亦携带 VPg,但尚未得到证实。3 个开放阅读框编码病毒蛋白:ORF1a 编码蛋白酶及 VPg(橙色),ORF1b 编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp,黄色),ORF2 编码衣壳蛋白、刺突蛋白及结构蛋白(粉色)。基因组 3'端为多聚腺苷酸尾(poly(A) tail)。

PAstV 是由多个高度分化的遗传谱系构成的病毒类群,自国际病毒分类委员会第九次报告发布,近十年来该病毒分类体系尚未全面更新。根据既往分类情况,感染猪的星状病毒分属于多个不同的物种,即 MAstV 3、MAstV 22、MAstV 24、MAstV 26、MAstV 27、MAstV 31 及 MAstV 32。在研究与诊断中,常依据其 CP 编码基因的序列差异,进一步划分为 5 个主要基

因型(PAstV1—PAstV5)^[1,25]。为了在全基因组层面阐明 PAstV 各基因型间的系统发育关系,基于从 GenBank 数据库中获得涵盖 PAstV1—PAstV5 的代表性全长基因组序列,构建系统发育树(见图 2),所有分析序列被清晰地划分为 5 个主要进化枝,与基于 ORF2 序列的传统分类结果高度一致,印证了目前 5 大基因型(PAstV1—PAstV5)划分的可靠性。

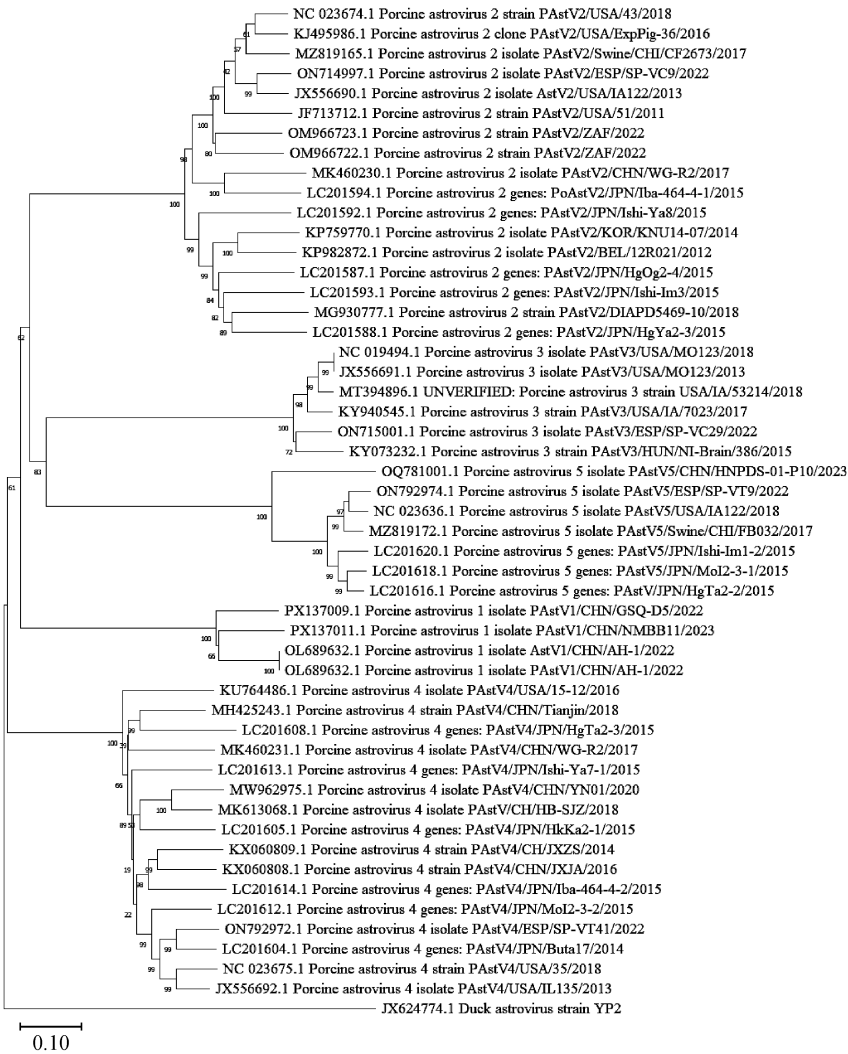


图 2 猪星状病毒全基因组序列的系统发育树

注:树形基于 *P*-distance 模型构建,分支上的数字表示 Bootstrap 值($\geq 70\%$ 显示),标尺代表每个位点的核苷酸替换数。

PAstV2 与 PAstV4 进化枝拥有最丰富的基因组序列数据,这与其作为全球范围内(特别是亚洲与欧洲地区)主导流行基因型的流行病学地位相符^[26-28]。相比之下,PAstV1 与 PAstV5 的可用公共序列资源相对有限,这可能源于其在实际种群中的流行率较低,也反映了当前针对这 2 个基因型的研究关注与测序尚不充分^[29]。值得注意的是,PAstV3 的可用序列数量有限,但因其明确的嗜神经性而成为研究焦点,获得了相较其他基因型更为

深入的分析和更高质量的代表性序列^[30-31]。这也意味着对 PAstV1 与 PAstV5 的遗传多样性、进化动力学及其潜在致病风险的深入解析,仍是未来研究的重要方向。基于进化树所揭示的全基因组亲缘关系不仅验证了 5 大基因型划分的可靠性,也为理解其全球分布格局与起源演化提供了进化框架。不同 PAstV 基因型在全球范围内呈现出鲜明的地理分布差异,同时,其显著的基因多样性直接形成了复杂的临床表现谱系,这对检测技术的设计提出了明确

而多元的要求。PAstV2 在亚洲流行广泛且致病性强,要求检测方法必须具备高灵敏度与可靠的病原载量定量能力^[32];PAstV3 具有跨洲传播潜力与嗜神经性,且存在人畜共患风险,故检测中需兼顾其特异性识别与潜在公共卫生风险的评估;新近发现的 PAstV4 与 PAstV5 则提示,检测体系应具备识别新发或区域性变异株的灵活性^[33]。同时,PAstV 常与轮状病毒、冠状病毒等形成混合感染,进一步要求检测技术能够实现多病原同步鉴别与共感染情况解析^[34]。由此可见,PAstV 的基因多样性不仅决定了其复杂的临床表现与流行病学格局,更直接驱动了对检测技术广谱性、分型准确性、定量可靠性及多病原联检能力的综合需求,这构成了发展下一代诊断方法的根本出发点。

2 PAstV 主要检测技术

PAstV 的持续流行及其复杂的感染生态,对建立兼具广谱性、精准性与实用性的检测体系提出了明确需求。当前,针对 PAstV 的检测主要依赖 3 大类技术:传统病原学技术、免疫学技术与分子诊断技术,这些技术在检测目标、灵敏度、操作流程及信息输出维度上构成互补。

2.1 传统诊断方法

2.1.1 病毒的分离培养

PAstV 的分离培养是明确其病原生物学特性、研究致病机制及开发针对性防控技术的基础。但 PAstV 的体外分离培养面临显著挑战,这主要归因于其严格的宿主细胞嗜性、体外细胞复制效率有限以及非溶解性胞吐方式释放病毒粒子等特性,使得感染通常不产生明显的细胞病变效应(Cytopathic effect, CPE)^[35-36]。在早期的研究中,Shimizu 等^[4]利用猪胚肾细胞首次从急性胃肠炎病猪中成功分离出一株能够诱导 CPE 的毒株,其特征包括细胞增大和胞浆内出现细颗粒样变化。在后续研究中,猪肾来源的细胞系(尤其是 PK-15 细胞)已成为体外培养 PAstV 的关键模型,该细胞系为病毒复制提供了高度相容的细胞内环境,感染后通常可观察到细胞圆缩、碎裂及脱落等典型的病变现象^[6,37]。分离获得的病毒需通过电子显微镜、免疫荧光或反转录 PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)等技术进行进一步鉴定。整个分离流程耗时较长、成功率不稳定,且对操作条件要求严格,难以适用于临床快速诊断。目前,该技术

主要用于病毒生物学特性研究,或者作为验证分子检测方法的参考标准。

2.1.2 电镜技术

电子显微镜技术是病毒形态学鉴定的经典方法,在 PAstV 的发现史上具有奠基性作用,PAstV 于 1975 年首次通过电镜被观察^[38],电子束的高分辨率可直接显示直径 28~35 nm 的病毒颗粒,PAstV 衣壳表面的独特星状突起是关键形态学鉴别依据^[4]。不过,该方法存在显著局限性:在灵敏度方面,通常要求样本病毒浓度高于一定的数值($\geq 10^6$ 个/mL)时才能检出,在低浓度病毒量时易出现假阴性;特异性方面,仅约 10% 的颗粒呈现典型星状形态,易造成检出率低,电镜无法进行血清型或基因型分型,限制了其在分子流行病学调查中的应用;设备昂贵、通量低、耗时长特点也使其不适用于临床常规筛查。目前,电镜在 PAstV 诊断中主要用于病毒形态的验证、细胞培养物质量控制等科研场景,也可在未知病原暴发初期作为重要的筛查工具,其诊断作用已在很大程度上被更灵敏和更特异的分子检测技术取代。

2.2 免疫学检测

2.2.1 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)作为一种经典的免疫学检测技术,自 20 世纪 70 年代问世以来,已在病毒感染的血清学诊断中得到了广泛应用^[52]。该技术的基本原理是将抗原与抗体的高特异性识别与酶对底物的高效催化放大作用相结合,实现目标物的定量或定性分析^[39-40]。然而,基于 ELISA 的 PAstV 检测路径,仍面临显著挑战,其核心障碍在于病毒存在高度的基因型多样性,基于单一型类别抗原开发的检测方法往往对其他型别敏感性不足,且存在交叉反应,致使特异性受限^[41]。当前,PAstV 的 ELISA 检测主要依赖于针对病毒 CP 开发的试剂,基于重组表达的 PAstV4 CP(或其表面刺突结构域)建立的间接 ELISA,已成功用于特异性抗体的血清学筛查^[31];针对 PAstV5 CP 制备的单克隆抗体及其鉴定出的线性表位,为开发高特异性的夹心 ELISA 用于抗原检测奠定了基础,共同推动了 PAstV 血清学与病原学诊断工具的进步。ELISA 在 PAstV 分型检测中具有重要价值,但其在特异性与灵敏度方面的局限^[42],难以满足广谱、高效筛查的实用需求,在当前检测体系中主要承担辅助性角色。

表 1 PAstV 检测方法比较

技术类别	具体方法	主要优点	主要缺点/挑战	典型适用范围	参考文献
传统检测技术	病毒的分离培养	可用于开展病毒生物学特性(如复制与致病机制)研究,或作为验证分子检测方法的参考标准	耗时长(数天至数周)、成功率低、需要特定细胞系、成本高	病毒生物学特性研究、毒株库与标准品建立	[36-37]
	电镜技术	直观,无需预设靶标,适用于未知病原的初步形态鉴定	灵敏度极低(需 $\geq 10^6$ 个/mL)、设备昂贵、仅能鉴别至科/属水平,无法分型或定量	疫情暴发初期的快速筛查与辅助诊断	[4]
血清学方法	酶联免疫吸附试验(ELISA)	通量高、操作相对简单、有商业化试剂盒、适合大规模筛查	灵敏度与特异性通常低于分子方法,无法区分近期与既往感染(抗体检测)	群体免疫水平监测、流行病学回顾性调查	[39-41]
	免疫荧光技术(IFA)	可进行组织定位,直观显示病毒感染部位与病理变化关系	主观性强、需要高质量样本和抗体,无法定量、操作复杂	病毒分离株的实验室鉴定、病理机制研究、病毒的组织嗜性分析	[21,42]
分子检测技术	单重 RT-PCR	特异性强、成本低廉、是分子检测的基础方法	灵敏度低于 qPCR、无法定量、易发生交叉污染、操作繁琐	实验室初步筛查、特定基因型的验证	[30,43]
	多重 RT-PCR	高效率:一次反应完成多目标检测,显著节省时间和样本	引物设计复杂,需优化以避免相互干扰;灵敏度可能不均一;仍无法定量	混合感染病因的快速排查、常见腹泻病原的联合筛查	[21,44-45]
	实时荧光定量 RT-PCR	灵敏度与特异性极高、可精确定量、速度快(2~3 h)、通量高,被视为分子诊断“金标准”	引物/探针设计需精准应对病毒多样性,对抑制剂敏感,需要标准品及严格的实验室质量控制	临床确诊、病毒载量动态监测、疗效评估、分子流行病学定量研究	[46-48]
	原位杂交(ISH)	空间分辨率高,可直观显示病毒在组织与细胞中的原位分布及感染靶点	灵敏度通常低于 PCR,操作复杂,对样本及实验条件要求高,定量能力有限	组织嗜性与致病机制研究(如确定病毒的细胞嗜性与病变定位)	[31,49]
	高通量测序(HTS)	广谱非靶向检测,无需预设靶标,一次性完成病毒发现、全基因组解析及病毒组多样性分析	成本高、数据分析复杂、样本质量要求严格、难以区分活病毒与灭活病毒	新基因型发现、全基因组解析、病毒组学分析、疫情溯源、进化与重组检测	[50-51]

2.2.2 免疫荧光技术

免疫荧光技术(Immunofluorescence assay, IFA)是一项基于抗原-抗体特异性结合,通过荧光素标记的抗体对靶标进行示踪,在荧光显微镜下实现待检病毒蛋白在细胞或组织中的可视化定位与检测的技术。该技术以其直观、能在亚细胞水平反映感染状况的优势,在 PAstV 的基础研究与临床诊断中起到一定的作用。作为一项直观的检测手段,IFA 常被用于 PAstV 分离株的实验室鉴定,通过检测感染细胞中的特异性荧光信号,为病毒的成功分离与生物学特性研究提供关键支持^[21]。针对新型 PAstV5 毒株的分离研究,正是通过 IFA 在细胞模型中确认了病毒抗原的表达,为后续揭示氧化应激对其复制的增强效应提供了形态学依据^[33]。利用 IFA 筛选并鉴定出针对 PAstV1 CP 的基因型特异性单克隆抗体及 B 细胞表位,为建立分型检测方法奠定了试剂基础^[42]。IFA 在 PAstV 研究中具有可视化优势,但其应用

存在明显的局限:操作繁琐、标准化程度低、结果判读主观性强,难以实现高通量检测,对低载量样本灵敏度不足,无法定量或提供基因分型信息。这些缺陷使其主要适用于机制研究,难以满足临床快速诊断或大规模筛查需求。

2.3 分子诊断技术

逆转录-聚合酶链式反应结合凝胶电泳技术的建立与应用,标志着 PAstV 检测进入了分子诊断时代。该技术通过特异性引物直接靶向病毒基因组进行逆转录与扩增,再经凝胶电泳对扩增产物进行可视化分析,实现了对病毒核酸的高灵敏度、高特异性检测,极大地推动了 PAstV 的流行病学调查与传播规律研究^[53]。为应对日益复杂的诊断需求,PAstV 的 RT-PCR 检测技术逐步从单重检测向多重检测发展。这一演进实现了从“单一靶标定性检测”到“多靶标同步鉴别”的技术升级,使其能够在一轮反应中同时鉴别多种 PAstV 基因型或其他共存病原,提升检测效率与诊断覆盖范围。

2.3.1 单重 RT-PCR

单重 RT-PCR 是 PAstV 分子检测中最基础、应用最早的技术。其核心原理是针对 PAstV 基因组特定保守区域(如编码 RNA 依赖性 RNA 聚合酶的 ORF1b 区)或特定基因型的独特序列设计引物,通过一轮 PCR 扩增实现靶标序列的特异性检测。目前,该技术主要运用于以下几个方面。

第一,特定基因型的确认与分子流行病学调查。该方法基于基因型特异性引物对临床样本进行分型,是明确流行株特征的基础。早期研究利用针对 CP 或 ORF2 区的引物,成功鉴定了新毒株,并揭示了猪源与人源星状病毒之间的遗传联系^[54-55]。后续的全球及区域性调查进一步拓展了该技术的应用。针对中欧地区和南亚地区的研究分别报道了 PAstV2 和 PAstV4 在匈牙利和印度的流行趋势^[13,56];中国的流行病学调查发现,四川与云南地区的流行基因型以 PAstV2 和 PAstV5 为主^[57-58],广西地区则存在全部 5 种基因型,其中以 PAstV2 (47.7%)、PAstV1 (26.2%) 和 PAstV5 (21.5%) 为主^[59],这些系统性的工作凸显了单重 RT-PCR 在 PAstV 分型鉴定与分子溯源中的关键作用。

第二,新毒株的发现与基因组解析,通过对未知样本进行保守区扩增和测序,可以发现新的遗传变异。Shan 等^[60]通过该技术首次在中国鉴定并报道了 PAstV1 型的完整基因组序列;Li 等^[61]则利用序列非依赖的单引物扩增结合特异性 PCR,从健康仔猪中鉴定出新型的 PAstV2 和 PAstV5 毒株;Lee 等^[43]首次在韩国报道了一株 PAstV2 型毒株的完整基因组序列,增强了对病毒地理传播与基因组多样性的认识。

第三,病毒血症及组织分布研究,通过对血液、中枢神经及呼吸道等肠外组织的特异性靶标扩增与鉴定,能够明确 PAstV 的全身性感染潜力及其与特定病变的病原学关联。该方法不仅首次在健康猪血清中检出 PAstV2 与 PAstV4 RNA,证实了无症状病毒血症的存在^[62],还在呼吸道病变组织中检测到 PAstV4,提示其潜在的呼吸道嗜性^[63]。更重要的是,该技术为确认 PAstV3 的神经侵袭性提供了直接证据,不仅从患神经症状仔猪的中枢神经组织检出病毒 RNA^[10],还从中枢神经分离到病毒,明确了其作为脑脊髓炎潜在病原体的地位^[30]。但单重 RT-PCR 一次反应仅能检测一个靶标,通量低。在面对临床常见的多基因型 PAstV 共感染,或需要同时排查多种腹泻病原体时,需进行多次独立反应,不

仅耗费样本、试剂和时间,也增加了操作误差和污染的风险^[64]。

2.3.2 多重 RT-PCR

为克服单重 PCR 通量不足的缺陷,多重 RT-PCR 技术应运而生。该技术在同一反应体系中加入 2 对或以上针对不同靶标的特异性引物,通过优化反应条件后,既可用于鉴别 PAstV 不同基因型,也可实现 PAstV 与猪流行性腹泻病毒、轮状病毒等其他病原的同步检测。在 PAstV 检测中,多重 RT-PCR 技术的演进始终以提升多基因型共感染鉴别效率为核心。早期研究建立了可同步检测 5 种 PAstV 基因型的多重 PCR 方法,为其应用奠定了基础^[27]。Liu 等^[26]通过持续优化引物与反应体系,提高了方法的稳定性和特异性。为克服传统多重 PCR 中引物干扰与灵敏度不足的局限,Zhang 等^[64]引入了通用引物介导的 2 步扩增策略,该技术通过嵌合引物与通用引物的协同作用,对 5 种基因型的检测灵敏度均达到 5 拷贝/ μL ,并在临床验证中与单重 PCR 结果高度一致,展现出显著优势。该技术的实用价值在国内外流行病学调查中也得到充分体现,在西班牙猪场腹泻疫情中,多重 RT-PCR 快速鉴定出包括 PAstV 在内的多种病原,并结合测序分析助力疫情溯源^[44]。类似地,中国监测研究也借助该技术系统揭示了包括猪星状病毒在内的猪腹泻病原的复杂共感染现状^[45,65],多重 RT-PCR 已成为猪场疫病监测与疫情诊断中不可或缺的高效工具。常规 RT-PCR 与凝胶电泳作为 PAstV 分子检测的经典方法,因其成本低廉、结果直观、无需复杂设备等优势,至今仍在众多实验室中作为基础检测方案发挥着重要作用,并为后续更先进的定量检测技术的发展奠定了方法学基础。

2.3.3 实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)

实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应(Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术的应用,将猪星状病毒的分子诊断从定性、半定量水平提升至精确定量水平,是 PAstV 检测技术发展中的重要里程碑。该技术通过在 PCR 反应体系中加入荧光探针或染料,对每个循环的扩增产物进行实时监测,实现了对起始模板浓度的精准定量,兼具高灵敏度、高特异性和高通量等优势^[46]。在此基础上,qRT-PCR 技术的应用也从单一病原定量,拓展至多病原共感染分析、特定基因型精准检测及大规模流行病学调查等多个维度,同时进一步沿 2 个方向深化发展,即多重化与

集成化演进和应对临床混合感染的复杂情况。目前已有研究建立了可同步检测 PAstV 与其他主要猪腹泻病毒的多重 qRT-PCR 方法,并将该方法应用于广西地区临床样本的检测;结果显示 PAstV 的阳性率为 35.93%,其他主要猪腹泻病毒的阳性检出率,猪札幌病毒为 8.37%、猪诺如病毒为 2.98%、A 组猪轮状病毒为 14.32%,混合感染率为 18.31%,这与单重 qRT-PCR 检测结果的一致性超 99.43%^[66]。针对与神经系统疾病相关的病原组合,研究者开发了可同时检测猪萨佩罗病毒、特斯霍病毒及 PAstV3 型的“嗜神经性”病原三重检测方法,拓展了临床适用场景^[47]。基于 TaqMan 探针或 SYBR Green I 染料,已成功建立了针对 PAstV3^[67]、PAstV4^[68] 及 PAstV5^[69] 等基因型的特异性 qRT-PCR 方法,这为比较各基因型病毒载量、研究其与临床结局的关联提供了关键工具,并且这些高灵敏度的定量方法也被广泛应用于流行病学监测与发病机理研究。大规模调查借助 qRT-PCR 揭示了 PAstV 在猪群中的流行强度与分布特点^[48],通过对病毒复制动力学的精准定量,助力于表征毒株的生物学特性^[6]。同时 qRT-PCR 与下一代测序(Next-generation sequencing, NGS)技术联用,在解析健康猪肠道病毒组及验证关键病原流行率方面展现出强大的整合分析能力^[70]。综上所述,qRT-PCR 凭借其卓越的定量能力、高灵敏度和可多重化等优势,已成为当前 PAstV 实验室诊断、流行病学监测和致病机制研究的首选技术,为该病毒的精准防控奠定了坚实的方法学基础。

2.3.4 原位杂交

原位杂交(In situ hybridization, ISH)技术通过标记的核酸探针与组织内的病毒基因组进行原位特异性杂交与可视化定位,作为解析猪 PAstV 组织分布与细胞嗜性的关键工具,在阐明其肠外致病机制方面具有不可替代的价值^[49]。相较于 PCR 技术,ISH 的核心优势在于其卓越的空间分辨能力,不仅能确认病毒存在,更能精确定位 PAstV 在组织中的分布及其感染的特定细胞类型,从而建立分子检测结果与病理损伤的直接形态学关联。ISH 技术在 PAstV 检测中的成功应用,集中体现在对 PAstV3 型所致神经性疾病机制的解析中。在匈牙利暴发的仔猪脑脊髓炎病例中,研究者利用 ISH 首次在患病猪中枢神经系统的病变部位检测到 PAstV 信号,实现了病毒与神经病变的空间共定位^[31];通过单细胞水平的检测,ISH 证实 PAstV3 RNA 特异性富集于

神经元,明确了其神经嗜性^[15];结合实验感染模型,该技术进一步从病因学层面验证了其神经侵袭潜力^[30];其在独立临床病例中的应用也支持了 PAstV3 与脑脊髓炎的关联^[50]。但该技术也存在一定局限,其检测灵敏度通常低于基于核酸扩增的 PCR 技术,对样本中病毒载量要求较高,且操作流程相对复杂,多适用于机制研究而非高通量筛查。

2.3.5 高通量测序

高通量测序(High-throughput sequencing, HTS)技术作为一项无需预先了解病原序列信息,即可对临床样本中的全部核酸进行深度测序,实现对病毒组的全面解析,在 PAstV 的新毒株鉴定、全基因组解析及病毒组学研究中发挥着不可替代的作用^[71]。相较于传统 PCR 技术仅能检测已知靶标,HTS 的核心优势在于其非靶向性与广谱发现能力,能够在单次检测中同时发现已知、未知及重组病毒,并揭示病毒群落的共存谱系^[51]。HTS 技术在 PAstV 检测中的成功应用,集中体现在对新基因型发现、共感染解析及疫情溯源的系统研究中,通过全基因组测序,研究者首次报道了印度北部^[50]、意大利^[72] 及东非小农户猪场^[73] 的 PAstV 全基因组序列,东非地区发现与已知毒株同源性仅 57%~80% 的新型基因型。基于 HTS 的宏基因组学分析进一步揭示了 PAstV 的遗传多样性与共感染复杂性,日本研究通过近全基因组分析鉴定出 PAstV2—PAstV5 的 4 种基因型,发现多基因型共感染及基因型内重组事件^[74];针对新生仔猪腹泻疫情,宏基因组学测序在母猪样本中检出 PAstV4 与 Posavirus1 病毒读数显著升高,成功实现疫情溯源^[75]。不过其应用仍受诸多因素的限制:成本较高、数据分析复杂、对样本质量要求严格,且难以区分活病毒与灭活病毒,目前多适用于科学研究而非常规临床筛查。

3 结 语

基因组高度多样性是 PAstV 的重要生物学特征,这一特征推动着该病毒诊断技术的不断优化与更新。当前的诊断技术从依赖病毒分离培养和电镜观察的传统阶段,历经血清学检测技术的过渡与补充,进入以分子检测为核心的主导地位。对 2010—2022 年间发表的 21 项研究的综述表明,约有 81% 依赖于 PCR 技术进行鉴别诊断,使用系统发育分析、宏基因组测序等工具的研究仅占 19%^[7],这表明以 PCR 为核心的分子诊断技术已成为主流,但能提供更全面病

毒组信息的深度测序技术应用仍有待推广。

面对 PAsV 复杂的基因多样性、频繁的共感染现状及其潜在的跨种传播风险,未来的检测技术发展与应用研究需聚焦于多个维度。检测技术需向更高层次的集成化与精准化发展,整合微流控、数字 PCR 等新技术平台,有望实现多靶标同步检测与绝对定量,并结合生物信息学工具深度解析测序数据,可显著增强对新发变异株的识别与预警能力。同时,还需大力研发适用于养殖现场的快速、便捷诊断工具。未来应通过多学科协作,构建涵盖前沿诊断技术、基础病毒学研究和系统化监测的整合框架,全面提升对 PAsV 的认知与防控能力。

参考文献:

- [1] Donato C, Vijaykrishna D. The broad host range and genetic diversity of mammalian and avian astroviruses[J]. *Viruses*, 2017, 9(5): 102.
- [2] Piryaei M, Bagheri S, Riahi A, et al. Astroviruses; pathogenesis and diagnosis; a review[J]. *Journal of Poultry Sciences and Avian Diseases*, 2023, 1(3): 1-17.
- [3] Bridger J C. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea[J]. *The Veterinary Record*, 1980, 107(23): 532-533.
- [4] Shimizu M, Shirai J, Narita M, et al. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28(2): 201-206.
- [5] Jonassen C M, Jonassen T Ø, Saif Y M, et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses[J]. *Journal of General Virology*, 2001, 82(5): 1061-1067.
- [6] Fang Q, Wang C, Liu H, et al. Pathogenic characteristics of a porcine astrovirus strain isolated in China[J]. *Viruses*, 2019, 11(12): 1156.
- [7] Rawal G, Linhares D C L. Scoping review on the epidemiology, diagnostics and clinical significance of porcine astroviruses[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69(3): 974-985.
- [8] Luo Z, Roi S, Dastor M, et al. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 149(3/4): 316-323.
- [9] Xiao C T, Giménez-Lirola L G, Gerber P F, et al. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAsVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAsV types[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(3): 570-582.
- [10] Yasumitsu C Y, Dall Agnol A M, Xavier A A C, et al. Porcine astrovirus 3 RNA in the central nervous system of weaned pigs with neurologic disease and polioencephalomyelitis in Brazil[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2024, 196: 106917.
- [11] Ge X, Li Y, Zhao F, et al. Global prevalence of porcine astrovirus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2025, 238: 106465.
- [12] 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]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2020, 67(3): 1129-1140.
- [13] Kattoor J J, Malik Y S, Saurabh S, et al. First report and genetic characterization of porcine astroviruses of lineage 4 and 2 in diarrhoeic pigs in India[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(1): 47-53.
- [14] Zhang H H, Qiu Q G, Liu S J, et al. Genomic characterization of a novel astrovirus identified in Amur tigers from a zoo in China[J]. *Archives of Virology*, 2019, 164(12): 3151-3155.
- [15] Rawal G, Ferreyra F M, Macedo N R, et al. Detection and cellular tropism of porcine astrovirus type 3 on breeding farms[J]. *Viruses*, 2019, 11(11): 1051.
- [16] Mor S K, Chander Y, Marthaler D, et al. Detection and molecular characterization of porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(6): 1064-1067.
- [17] Rajkhowa S, Sonowal J, Pegu S R, et al. Epidemiology and emerging trends of zoonotic viral diseases of pigs in India[J]. *Viruses*, 2025, 17(3): 381.
- [18] Roach S N, Langlois R A. Intra- and cross-species transmission of astroviruses[J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1127.
- [19] Wu H, Bao Z, Mou C, et al. Comprehensive analysis of codon usage on porcine astrovirus[J]. *Viruses*, 2020, 12(9): 991.
- [20] Monroe S S, Jiang B, Stine S E, et al. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses[J]. *Journal of Virology*, 1993, 67(6): 3611-3614.
- [21] Li Z, Wu X, Zhang Y, et al. Isolation and pathogenicity of a Chinese porcine astrovirus type 5 strain HNPDS-01 and its influence on cecum microbiota in piglets[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2024, 2024: 5777097.
- [22] Johnson C, Hargest V, Cortez V, et al. Astrovirus pathogenesis[J]. *Viruses*, 2017, 9(1): 22.
- [23] Cortez V, Meliopoulos V A, Karlsson E A, et al. Astrovirus biology and pathogenesis[J]. *Annual Review of Virology*, 2017, 4: 327-348.
- [24] De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, et al. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11(7): 1529-1544.
- [25] Sawant P M, Waghchaure R B, Shinde P A, et al. Detection and molecular characterization of animal adenovirus and astrovirus from Western Maharashtra, India[J]. *Viruses*, 2023, 15(8): 1679.
- [26] Liu X, Zhang W, Wang D, et al. Establishment of a multiplex RT-PCR method for the detection of five known genotypes of

porcine astroviruses[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 684279.

[27] Zhang Q, Liu Q, Opriessnig T, et al. Multiplex gel-based PCR assay for the simultaneous detection of 5 genotypes of porcine astroviruses[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2023, 35(2): 132-138.

[28] Kumthip K, Khamrin P, Saikruang W, et al. Detection and genetic characterization of porcine astroviruses in piglets with and without diarrhea in Thailand[J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(7): 1823-1829.

[29] Opriessnig T, Xiao C T, Halbur P G. Porcine astrovirus type 5-associated enteritis in pigs [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2020, 181: 38-46.

[30] Ferreyra F M, Arruda P E H, Bradner L K, et al. Experimental porcine astrovirus type 3-associated polioencephalomyelitis in swine [J]. *Veterinary Pathology*, 2021, 58(6): 1064-1074.

[31] Boros Á, Albert M, Pankovics P, et al. Outbreaks of neuroinvasive astrovirus associated with encephalomyelitis, weakness, and paralysis among weaned pigs, Hungary[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2017, 23(12): 1982-1993.

[32] Mizuno S, Teshima N, Yokota T, et al. Genetic diversity and evolutionary relationships of porcine astroviruses from wild boars and domestic pigs in Japan[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2026, 137: 105875.

[33] Haley D J, Lanning S, Henricson K E, et al. Structure and antigenicity of the porcine astrovirus 4 capsid spike [J]. *Viruses*, 2024, 16(10): 1596.

[34] Werid G M, Zhang H, Ibrahim Y M, et al. Development of a multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four potential zoonotic swine RNA viruses[J]. *Veterinary Sciences*, 2022, 9(4): 176.

[35] Du Y, Qin Y, Feng X, et al. Isolation and identification of a new porcine astrovirus 5 demonstrated that oxidative stress enhances porcine astrovirus replication[J]. *BMC Veterinary Research*, 2025, 21(1): 518.

[36] Mi S, Guo S, Xing C, et al. Isolation and characterization of porcine astrovirus 5 from a classical swine fever virus-infected specimen[J]. *Journal of Virology*, 2020, 95(2): e01513-e01520.

[37] Dong Q, Zhu X, Wang L, et al. Replication of porcine astrovirus type 1-infected PK-15 cells in vitro affected by RIG-I and MDA5 signaling pathways[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(3): e00701-e00723.

[38] Appleton H, Higgins P G. Letter: viruses and gastroenteritis in infants[J]. *Lancet*, 1975, 305(7919): 1297.

[39] Reen D J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [J]. *Basic Protein and Peptide Protocols*, 1994: 461-466.

[40] Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: types and applications [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2612: 1-17.

[41] Ulloa J C, Guzmán F, Guerrero C A, et al. Identification of two immunoreactive peptides useful for the detection of porcine astrovirus[J]. *Intervirology*, 2012, 55(4): 311-317.

[42] Zhang W, Wang W, Liu X, et al. Identification of novel B-cell epitopes on the capsid protein of type 1 porcine astrovirus, using monoclonal antibodies [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 189: 939-947.

[43] Lee S, Jang G, Lee C. Complete genome sequence of a porcine astrovirus from South Korea[J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(7): 1819-1821.

[44] Puente H, Arguello H, Cortey M, et al. Detection and genetic characterization of enteric viruses in diarrhoea outbreaks from swine farms in Spain[J]. *Porcine Health Management*, 2023, 9: 29.

[45] 孟丽, 陶洁, 李本强, 等. 猪 7 种腹泻相关病毒的临床检测及猪峰病毒的遗传进化分析[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(8): 1292-1303.

[46] Li Y, Luo J, Zhang F, et al. Establishment and application of quadruple fluorescence quantitative RT-PCR method for the identification of waterfowl astrovirus [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1328243.

[47] László Z, Pankovics P, Reuter G, et al. Development and large-scale testing of a novel one-step triplex RT-qPCR assay for simultaneous detection of " Neurotropic " porcine sapeloviruses, teschoviruses (Picornaviridae) and type 3 porcine astroviruses (Astroviridae) in various samples including nasal swabs[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 513.

[48] Stamelou E, Giantsis I A, Papageorgiou K V, et al. Epidemiology of astrovirus, norovirus and sapovirus in Greek pig farms indicates high prevalence of Mamastrovirus suggesting the potential need for systematic surveillance[J]. *Porcine Health Management*, 2022, 8: 5.

[49] Matias Ferreyra F S, Bradner L K, Burrough E R, et al. Polioencephalomyelitis in domestic swine associated with porcine astrovirus type 3[J]. *Veterinary Pathology*, 2020, 57(1): 82-89.

[50] Panghal R, Kumar P, Minhas S K, et al. Whole genome sequencing and molecular characterization of porcine astrovirus from Haryana, India[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2025, 134: 105816.

[51] Robson M, Chooi K M, Blouin A G, et al. A national catalogue of viruses associated with indigenous species reveals high-throughput sequencing as a driver of indigenous virus discovery[J]. *Viruses*, 2022, 14(11): 2477.

[52] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G[J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(9): 871-874.

[53] Shi Y, Li B, Tao J, et al. The complex co-infections of multiple porcine diarrhea viruses in local area based on the Luminex xTAG multiplex detection method[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 602866.

[54] Indik S, Valiček L, Šmíd B, et al. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus[J]. *Veterinary*

Microbiology, 2006, 117(2/3/4): 276-283.

[55] Ulloa J C, Gutiérrez M F. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2010, 56(7): 569-577.

[56] Reuter G, Pankovics P, Boros Á. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary[J]. Archives of Virology, 2011, 156(1): 125-128.

[57] Cai Y, Yin W, Zhou Y, et al. Molecular detection of porcine astrovirus in Sichuan Province, China[J]. Virology Journal, 2016, 13: 6.

[58] Ren K, Wang R, Liu X, et al. Epidemiological investigation and genetic characterization of porcine astrovirus genotypes 2 and 5 in Yunnan Province, China[J]. Archives of Virology, 2022, 167(2): 355-366.

[59] Qin Y, Fang Q, Li X, et al. Molecular epidemiology and viremia of porcine astrovirus in pigs from Guangxi Province of China[J]. BMC Veterinary Research, 2019, 15: 471.

[60] Shan T, Wang C, Tong W, et al. Complete genome of a novel porcine astrovirus[J]. Journal of Virology, 2012, 86 (24): 13820-13821.

[61] Li J S, Li M Z, Zheng L S, et al. Identification and genetic characterization of two porcine astroviruses from domestic piglets in China[J]. Archives of Virology, 2015, 160(12): 3079-3084.

[62] Brnić D, Prpić J, Keros T, et al. Porcine astrovirus viremia and high genetic variability in pigs on large holdings in Croatia [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2013, 14: 258-264.

[63] Padmanabhan A, Hause B M. Detection and characterization of a novel genotype of porcine astrovirus 4 from nasal swabs from pigs with acute respiratory disease[J]. Archives of Virology, 2016, 161(9): 2575-2579.

[64] Zhang Q, Wen D, Liu Q, et al. Universal primer multiplex PCR assay for detection and genotyping of porcine astroviruses [J]. Journal of Virological Methods, 2023, 322: 114822.

[65] 曲雅新, 孙连静, 张胜斌, 等. 猪轮状病毒、猪札幌病毒和猪星状病毒三重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(11): 78-83.

[66] He J, Shi K, Shi Y, et al. Development of a quadruplex RT-qPCR for the detection of porcine astrovirus, porcine sapovirus, porcine norovirus, and porcine rotavirus A [J]. Pathogens, 2024, 13(12): 1052.

[67] 刘心, 张文超, 董覃婷, 等. 猪星状病毒 3 型 TaqMan 荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学, 2020, 50 (11): 1373-1378.

[68] 陈少杰, 刘立辉, 吴志勇, 等. 猪星状病毒 4 型 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(2): 404-408.

[69] 张文婷, 易诗琴, 罗宇航, 等. 猪星状病毒 5 型 SYBR Green I 荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J/OL]. 中国动物传染病学报, 2025-07-30. <https://doi.org/10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20250730.001>.

[70] Schyns M A R, van den Braak R, Peijnenborg J, et al. Characterization of the enteric virome of clinically healthy pigs around weaning on commercial farms in the Netherlands using next generation sequencing and qPCR [J]. Porcine Health Management, 2025, 11: 41.

[71] Santos P D, Ziegler U, Szilatt K P, et al. In action-an early warning system for the detection of unexpected or novel pathogens[J]. Virus Evolution, 2021, 7(2): veab085.

[72] Tassoni L, Zamperin G, Schiavon E, et al. First whole genome characterization of porcine astrovirus detected in swine faeces in Italy[J]. Veterinaria Italiana, 2019, 55(3): 221-229.

[73] Amimo J O, Machuka E M, Abworo E O, et al. Whole genome sequence analysis of porcine astroviruses reveals novel genetically diverse strains circulating in East African smallholder pig farms[J]. Viruses, 2020, 12(11): 1262.

[74] Ito M, Kuroda M, Masuda T, et al. Whole genome analysis of porcine astroviruses detected in Japanese pigs reveals genetic diversity and possible intra-genotypic recombination [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 50: 38-48.

[75] Van Borm S, Vanneste K, Fu Q, et al. Increased viral read counts and metagenomic full genome characterization of porcine astrovirus 4 and Posavirus 1 in sows in a swine farm with unexplained neonatal piglet diarrhea[J]. Virus Genes, 2020, 56(6): 696-704.

团队介绍

姜永厚副教授团队专注于动物病毒及分子检测技术研究,主要研究方向包括动物病毒分子生物学、病毒分子诊断技术、感染性病毒分子流行病学等。团队包括副教授 1 名,硕士研究生 8 名。姜永厚 2004 年 6 月获浙江大学昆虫学博士学位,2012 年 4 月至 2013 年 5 月国家留学基金委公派美国爱荷华州立大学动物医学院访问学者;主持和参与国家自然科学基金、浙江省科技计划重点项目、浙江省自然科学基金、浙江省公益技术应用研究计划等课题 10 余项,第一作者或通讯作者发表研究论文 40 余篇,其中 SCI 论文 20 篇;获浙江省科学技术奖二等奖 1 项(排名第二),授权国家发明专利 9 项(排名第一);担任 *Virology Journal*、*Viruses-Basel*、*Biosensors and Bioelectronics*、*BioTechniques*、*Scientific Reports*、*BMC Veterinary Research*、*Frontiers in Microbiology* 等十余种 SCI 杂志审稿专家(编辑),《中国预防兽医学报》特约审稿专家,浙江省、广东省等 5 省自然科学基金项目评审专家。

(责任编辑:张会巍)