



基于宏转录组测序技术对一起欧洲型和美洲型 PRRSV 混合感染事件的鉴定和分析

许小龙^{1,2,3}, 陈盼丹^{1,2,3}, 符媛媛^{1,2,3}, 许丹^{1,2,3}, 王衡^{1,2,3}, 龚浪^{1,2,3},
张桂红^{1,2,3}, 孙彦阔^{1,2,3*}

(1. 华南农业大学兽医学院/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广州 510642; 2. 猪繁殖障碍性疾病协作实验室, 广州 510642; 3. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室茂名分中心, 茂名 525000)

摘要: 旨在探究宏转录组测序技术在猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)混合感染诊断中的应用价值。采集广西壮族自治区某猪场1份PRRSV阳性血清样品,通过宏转录组测序技术获得病毒全基因组序列,并进一步进行遗传进化与重组分析。结果显示,通过该方法成功获取欧洲型PRRSV1-GXHZ-202408毒株和美洲型PRRSV2-GXHZ-202408毒株的全基因组,长度分别为15 076 bp和14 989 bp。进化分析表明,PRRSV1-GXHZ-202408与欧洲型毒株SC-2020-1(MW115431)位于同一个新亚群分支,两者的核苷酸相似度为90.45%。PRRSV2-GXHZ-202408属于NADC30-like(美洲型毒株,谱系1.8),与该谱系代表毒株NADC30(MH500776)的相似度为88.63%。重组分析发现,PRRSV1-GXHZ-202408毒株可能是以SC-2020-1毒株为病毒骨架与LV4.2.1毒株(AY588319)和HKEU16毒株(EU076704)重组而成,重组区间分别为650~2 050 nt(NSP1-NSP2)和14 131~14 570 nt(ORF6);PRRSV2-GXHZ-202408则以NADC30(MH500776)为主要亲本毒株,以JXA1(EF112445)为次要亲本毒株,其区间为5 331~8 081 nt(NSP3-NSP9)。本研究运用宏转录组测序技术不仅明确鉴定出猪场美洲型和欧洲型PRRSV混合感染,还获取了毒株的全基因组并精准解析流行毒株的遗传特征,清晰地还原了该猪场PRRS的流行情况,证实宏转录组测序技术为PRRS的精准防控提供了强有力工具。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒;混合感染;宏转录组测序技术;基因组特征

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1649-12

Application and Analysis of Metatranscriptomic Sequencing Technology in the Identification of a Co-infection Event Involving European and American Genotypes of PRRSV

XU Xiaolong^{1,2,3}, CHEN Pandan^{1,2,3}, FU Yuanyuan^{1,2,3}, XU Dan^{1,2,3}, WANG Heng^{1,2,3},
GONG Lang^{1,2,3}, ZHANG Guihong^{1,2,3}, SUN Yankuo^{1,2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of Prevention and Control of Animal-borne Zoonoses in Guangdong Province, Guangzhou 510642, China; 2. Collaborative Laboratory for Porcine Reproductive Disorders, Guangzhou 510642, China; 3. Maoming Branch Center of Guangdong Laboratory for LingNan Modern Agricultural Science and Technology, Maoming 525000, China)

收稿日期: 2025-05-06

基金项目: 华南农业大学高校学科建设专项(2023B10564003);广东省现代农业产业技术体系创新团队(2024CXTD22);广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(生物安全与防控(动物方向)共性关键技术)(2024CXTD15);广东省普通高校青年创新人才项目(2017KQNCX012)

作者简介: 许小龙,硕士生,主要从事兽医传染病和生物信息学研究, E-mail: 20242028047@stu.scau.edu.cn

*** 通信作者:** 孙彦阔,主要从事兽医传染病研究, E-mail: yankuosun@scau.edu.cn

Abstract: This study aimed to evaluate the application of metatranscriptomic sequencing technology for the identification of a co-infection event involving European and North American genotypes of PRRSV. A PRRSV-positive serum sample was collected from a swine farm in Guangxi Zhuang Autonomous Region. The complete genome sequence of the virus was obtained using metatranscriptomic sequencing, and further subjected to phylogenetic and recombination analysis. Complete genome sequences of both PRRSV1-GXHZ-202408 (15 076 bp) and PRRSV2-GXHZ-202408 (14 989 bp) were successfully recovered. Phylogenetic analysis revealed that PRRSV1-GXHZ-202408 formed a novel subclade with its closest relative SC-2020-1 (GenBank: MW115431; 90.45% nucleotide identity), while PRRSV2-GXHZ-202408 clustered within the NADC30-like group (Lineage 1.8), sharing 88.63% nucleotide identity with the prototype NADC30 strain (MH500776). Notably, recombination events were identified in both strains: PRRSV1-GXHZ-202408 originated from an SC-2020-1 backbone with recombination breakpoints in NSP1-NSP2 (650-2 050 nt) and ORF6 (14 131-14 570 nt) involving LV4.2.1 (AY588319) and HKEU16 (EU076704), whereas PRRSV2-GXHZ-202408 arose from recombination between NADC30 (MH500776, major parent) and JXA1 (EF112445, minor parent) in the NSP3-NSP9 region (5 331-8 081 nt). In this study, metatranscriptomic sequencing was employed to not only definitively identify co-circulation of PRRSV1 and PRRSV2 in the swine farm, but also to obtain complete viral genomes and precisely characterize the genetic features of circulating strains. This approach clearly analyzed the epidemic dynamics of PRRSV in the swine farm, demonstrating that metatranscriptomic sequencing serves as a powerful tool for precise prevention and control of PRRS.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; co-infection; metatranscriptomic sequencing; genomic characterization

* **Corresponding author:** SUN Yankuo, E-mail: yankuosun@scau.edu.cn

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的以妊娠母猪后期繁殖障碍和生殖衰竭、新生仔猪虚弱及呼吸道症状为特征的烈性传染病。病猪因呼吸困难导致耳朵末端出现发绀的现象, 故又称为“蓝耳病”^[1-2]。自 1987 年在美国首次暴发以来, PRRSV 已演变为全球性疫病^[3]。根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 最新标准, PRRSV 被划分为两个独立种: 欧洲型 (PRRSV-1) 和美洲型 (PRRSV-2), 二者基因组核苷酸同源性不足 60%^[4-5]。我国于 1996 年首次鉴定出美洲型毒株, 此后该病毒在国内快速传播并通过持续的基因重组与变异加速演化, 目前已成为我国主要流行毒株。自 2011 年首次报道以来, 欧洲型毒株已在我国 20 余个省份流行^[6-8]。当前流行的欧洲型毒株属于 Global 分支, 可进一步划分为 4 个主要进化群: Amervac-like、BJEU06-1-like、HKEU16-like 和 NMEU09-like^[9]。虽然欧洲型毒株在临床生产中造

成的损失相对轻, 但在国内的部分地区却发现其中等致病性毒株的流行^[7,10-11]。同时, 近年来美洲型毒株的演化态势同样严峻。监测数据显示, 高重组 NADC30/34-like (谱系 1) 目前已取代传统 HP-PRRSV 成为新的优势流行株^[12-13]。欧洲型与美洲型 PRRSV 共流行和高频重组的局面加剧了我国毒株的复杂性, 为精准诊断猪场 PRRSV 带来了前所未有的挑战^[14-16]。

PRRSV 的诊断和监测方面的情况也不容乐观, 当前 PRRSV 诊断监测技术面临多重瓶颈^[17]: 病毒分离鉴定通常需要 2~4 周时间, 不仅耗时较长, 而且成本高、灵敏度有限; 血清学检测存在 7~14 d 的窗口期且难以有效区分疫苗免疫与野毒感染抗体; 常规 PCR 与实时荧光定量 PCR (qPCR) 虽灵敏度高, 检测限可达 10^4 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$, 但其依赖已知靶标序列设计引物/探针, 仅能检测已知的蓝耳毒株类型^[18-19]。目前, 针对 PRRSV 病原和核酸诊断传统的方案有 RT-PCR、胶体金试纸条和 RT-qPCR, 均

存在上述局限性。在我国生猪养殖规模化进程加速和跨区域流通频繁背景下,PRRSV 多毒株混合感染现象普遍,亚临床感染和免疫抑制状态导致传统诊断技术敏感性下降^[20],目前针对 PRRSV 的监测主要关注 ORF5 基因,得到的信息相对有限。亟需一种能够实现全基因组解析、精准识别重组事件的新型检测技术,在全基因组层面实现对 PRRSV 的监测。

宏转录组测序技术的突破为 PRRSV 混合感染的精准诊断提供了全新解决方案。该技术基于高通量测序(next-generation sequencing,NGS)的大规模并行测序原理,通过全转录组无偏捕获策略(whole-transcriptome shotgun sequencing),将样本中包括病毒 RNA 在内的所有 RNA 随机片段化并转化为测序文库,经集群扩增后可在单次运行中产出数十亿条读长(reads),实现核酸物质的数字化定量检测^[21-23]。相较于传统靶向检测方法,宏转录组测序核心优势在于:1)无偏好性:无需预先设计引物,可同步检测已知和未知病原;2)动态监测:通过读长丰度定量反映病原含量。该技术已在动物疫病诊断领域展现出重要价值,特别是在新发/再现病毒性疾病的筛查中^[24-25]。本研究通过对广西壮族自治区某猪场 PRRSV 阳性样本进行宏转录组测序,结合系统发育树构建和重组断点检测,成功在该猪场鉴定出欧洲型与美洲型毒株的共感染事件,解析了毒株的进化分群与重组特征。这些发现为建立基于全基因组特征的精准防控体系提供了分子流行病学依据。

1 材料与方法

1.1 样品处理和实时荧光定量 RT-PCR 检测

2024 年 8 月,广西某猪场发生疑似 PRRS 疫情,该场无疫苗接种史,发病的妊娠母猪出现流产的症状。本课题组从该场采集了一份血清样品,随后低温运输至华南农业大学兽医学院动物疫病高通量诊断中心进行检测。使用 Virus DNA/RNA Extraction Kit 2.0(Vazyme,Cat:RM401-01)试剂盒抽提血清样品核酸,并采用猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV-1、2 型)荧光 RT-PCR 检测试剂盒(广东海大畜牧兽医研究院有限公司,批号:240401)进行实时荧光定量 RT-PCR。

1.2 文库构建及上机测序

对血清样品核酸首先进行 DNA 去除、RNA 纯化、片段化和 rRNA 去除,随后使用随机引物进行一链 cDNA 合成、cDNA 二链合成、ds cDNA 末端修复及 dA-tailing、接头连接、双轮磁珠片段分选、PCR 富集和 0.9×磁珠纯化文库。纯化后的文库使用 Qsep100 进行片段峰值分析,以评估文库的片段大小和分布,同时使用 Qubit 进行双链核酸浓度的质检。质检通过后将文库 pooling 上机测序,用 MGISEQ-200 测序仪(测序策略为 PE150)进行测序。

1.3 测序数据质控、组装和筛选

得到原始测序数据即双端测序文件后,接下来对这些数据进行质控、组装和注释以得到目标序列。首先,使用 FastQC(V 0.12.1)工具对双端测序文件进行质量控制分析,以确保数据适用于后续的分析并制定数据预处理策略。然后使用 Trimmomatic(V 0.39)工具进一步进行质量控制。通过剪切接头序列、去除读数开始端和末端的低质量碱基以及对长度小于 50 bp 的低质量读数过滤,筛选出高质量($\geq Q30$)的 Clean reads。接着使用 MEGAHIT(V 1.2.9)对上一步处理得到的 Clean reads 进行从头组装来构建长的 contigs,同时通过设置参数过滤掉长度短于 500 bp 的 contigs 以提高输出的结果的质量。将组装完成后的序列通过 blastn(BLAST 2.15.0)与自建的 PRRSV 数据库进行比对,把比对结果以 60% 的相似度和 $E\text{-value} \leq 0.000\ 001$ 的阈值进行筛选并分为美洲型和欧洲型两类。使用 Samtools(V 1.19)分析测序深度。最后,对通过以上步骤得到的 PRRSV 序列进行人工复检后最终得到 PRRSV 基因组序列。

1.4 遗传进化分析

为探究测序得到的毒株序列与其它毒株的遗传进化关系,从 NCBI 数据库中下载了美洲型和欧洲型 PRRSV 的一些代表性序列并与本次样品毒株的序列合并为一个序列文件(表 1)。随后使用 MAFFT(V 7.525)软件进行多重序列比对,然后将对比结果使用 TrimAl(V 0.12.1)进行修剪。在 IQTREE(V 2.3.0)中,采用 TEST 以自动选择最佳核苷酸替换模型并用 1 000 次自举值(Bootstrap)重复来评估树的可靠性,构建了毒株全基因组和 ORF5 序列的最大似然系统发育树。使用 Megalign(V 7.1.0)分析毒株和参考序列的相似性。

表 1 本研究涉及的 PRRSV 参考毒株信息

Table 1 The information of the PRRSV reference strains used in this study

登录号 Accession number	毒株名称 Strain name	国家/时间 Country/Year	登录号 Accession number	毒株名称 Strain name	国家/时间 Country/Year
AY032626	CH-1a	China/1996	KP998476	FJFS	China/2015
AY366525	EuroPRRSV	USA/2003	KR706343	JL580	China/2013
AY588319	LV4-2	Netherlands/2004	KT022071	HNxa14	China/2014
DQ489311	SD01-08	USA/2001	KT224385	HLJB1	China/2014
EF112445	JXA1	China/2006	KT257976	ISU29	USA/2014
EF635006	HUN4	China/2007	KT351740	HLJB1	China/2013
EF641008	JXwn06	China/2007	KU950372	HENXX-1	China/2014
EU076704	HKEU16	China/2007	KX668221	WestSib13	Russia/2013
GQ461593	SHE	China/2009	KX815423	15LN1	China/2015
GU047344	BJEU06-1	China/2006	KY373214	JSWA	China/2014
GU047345	NMEU09-1	China/2009	M96262	Lelystad	Netherlands/2000
GU067771	Amervac	Spain/2009	MF375261	SC-d	China/2015
HQ315837	SY0909	China/2009	MG844181	HB17A	China/2017
HQ401282	Shaanxi-2	China/2007	MG860516	LNWK96	China/2017
HQ843178	HLJ-09	China/2009	MH500776	NADC30	China/2017
HQ843179	HLM-09	China/2009	MH651736	CY1-1604	China/2016
HQ843180	SD-09	China/2009	MH651739	HBFL-1604	China/2016
JF802085	lena	Belarus/2007	MH651740	HNJYH-1606	China/2016
JN387271	GDQY1	China/2007	MH651741	LNCH-1604	China/2016
JN654459	NADC30	USA/2008	MH651742	SDQD-1604	China/2016
JN662424	GM2	China/2011	MH651743	SD-1602	China/2016
JQ308798	QYYZ	China/2011	MH651744	SD53-1603	China/2016
JX187609	NVDC-NM1-2011	China/2011	MH651745	SD99-1606	China/2016
KC492504	NVDC-NM2	China/2011	MH651747	SDZC-1609	China/2016
KC492505	NVDC-NM3	China/2011	MH651748	TJZH-1607	China/2016
KC492506	NVDC-FJ	China/2011	MK303390	180900-5	China/2018
KF001144	GZ11-G1	China/2011	MK639926	EUGDHD2018	China/2018
KF287129	HK3	China/2003	MN648054	LNDZD10-1806	China/2018
KF287130	HK5	China/2004	MN648055	HLJZD30-1902	China/2019
KF287131	HK10	China/2004	MN648449	HLHDZD32-1901	China/2019
KM196101	LNEU12	China/2012	MW115431	SC-2020-1	China/2020
KP860909	FJZ03	China/2013	MZ820388	JS2021NADC34	China/2021
KP860912	FJEU13	China/2015	OL771206	CH/SCCD-4/2020	China/2020
KP860913	FJQEU14	China/2015	OL771208	CH/SCMS-4/2020	China/2020
KP889243	SU1-Bel	Belarus/2010			

1.5 重组分析

为评估 PRRSV 毒株潜在的重组事件,利用 RDP4 软件(V 4.10.1)中 RDP、GENECONV、BootScan、Maxchi、Chimaera、SiScan 和 3Seq 共 7 种

方法检测重组事件和重组断点,当 7 种方法中的 3 种都满足且 $P \leq 0.001$ 时,则认为该重组事件可能发生。同时在 Simplot(V 3.5.1)进行验证,设置窗口大小为 500 bp,步长为 20 bp。若出现重组断点,

则将由断点切割的不同区域进行系统发育树构建以进一步验证重组事件的发生情况。

2 结 果

2.1 基因组特点和相似度分析

针对该 PRRSV 阳性不稳定场采集的血清样品核酸进行 RT-PCR 初步鉴定,测出样本包含欧洲型毒株和美洲型毒株,CT 值分别为 23.28 和 22.97。为进一步了解样品毒株的全基因组特征,对样品核酸进行文库构建和高通量测序。测序共得到 2.8 Gb 原始数据,质控后平均 Reads 质量为 Q37。使用 MEGAHIT 进行组装、使用 blastn 进行筛选,得到了两条 PRRSV 序列:一条属于欧洲型 (PRRSV-1),长

度为 15 076 bp,命名为 PRRSV1-GXHZ-202408;另一条属于美洲型 (PRRSV-2),长度为 14 989 bp,命名为 PRRSV2-GXHZ-202408。Samtools 软件分析显示,本次获得的 2 条序列的平均测序深度均超过了 10 000 ×,覆盖所有的编码区。PRRSV1-GXHZ-202408 和 PRRSV2-GXHZ-202408 毒株与 PRRSV 全基因组参考数据库中欧洲型毒株 LV4.2.1 (AY588319) 的基因相似度分别为 86.25% 和 55.57%,而与美洲型代表毒株 NADC30 (MH500776) 的基因相似度分别为 55.75% 和 88.63%。基因组相似度框架图显示,本研究通过宏转录组测序技术成功鉴定了美洲型和欧洲型毒株的混合感染,并获得了完整的毒株基因组 (图 1)。

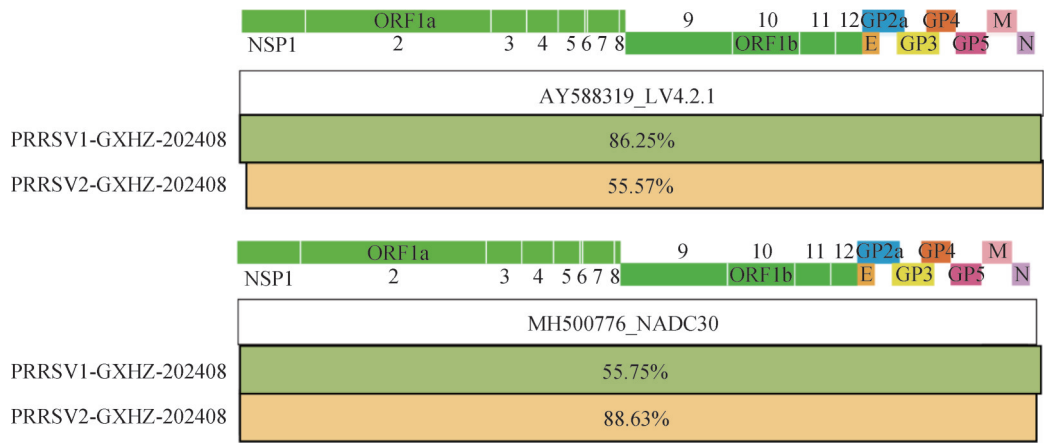


图 1 样品毒株全基因组相似度框架图

Fig. 1 Genome-wide similarity plot of the isolated viral strains

欧洲型 PRRSV1-GXHZ-202408 毒株与各代表性欧洲型参考毒株的全基因组核苷酸相似度范围为 82.37%~90.45%、ORF5 的核苷酸和氨基酸相似度范围分别为 83.83%~88.94% 和 84.65%~89.11%。其全基因组和 ORF5 均与 SC-2020-1 毒株的核苷酸相似度最高,分别为 90.45% 和 88.94%。PRRSV1-GXHZ-202408 毒株在 NSP2-NSP12、ORF2a-ORF5 以及 ORF7 区域与 SC-2020-1 毒株有最高的相似度,但在 NSP1 基因处毒株与 LV4.2.1 毒株相似度最高,在 ORF6 区域处则与 HKEU16 毒株相似度最高 (表 2)。美洲型 PRRSV2-GXHZ-202408 毒株与各代表性美洲型毒株全基因组的相似度范围为 79.17%~88.63%、ORF5 的核苷酸和氨基酸与各代表毒株的相似度范围分别为 82.09%~90.22% 和 81.59%~90.05%。其全基因组和 ORF5 均与 NADC30 具有最高的核

苷酸相似度,分别为 88.63% 和 90.05%。毒株在 NSP1-NSP3、NSP9-NSP12 和 ORF2a-ORF7 这些区域与 NADC30 毒株具有最高的相似度,但在 NSP4-NSP8 这几个连续的区域却与 JXA1 最相似,这表明 PRRSV2-GXHZ-202408 毒株可能发生了重组 (表 3)。此外,在 NSP2 区域美洲型 PRRSV2-GXHZ-202408 毒株与代表毒株 NADC30 有最高的相似度,且存在相同的基因缺失模式,即“111+1+19”的氨基酸缺失模式。

2.2 遗传进化分析

遗传进化关系显示,PRRSV1-GXHZ-202408 毒株的全基因组和 ORF5 基因均与 SC-2020-1 (MW115431) 毒株位于同一个分支上。SC-2020-1 毒株于 2020 年在四川省被发现,与其他欧洲型毒株相比,在其 NSP2、ORF3 和 ORF4 包含不连续的缺失或插入,且其在系统发育树上与其它亚群存在明

表2 PRRSV1-GXHZ-202408株编码基因核苷酸(nt)和氨基酸(aa)同源性分析

Table 2 Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequence homology analysis of coding genes in PRRSV1-GXHZ-202408 isolate

区域 Region	毒株(核苷酸同源性/氨基酸同源性) Strain (Nucleotide sequence homology/amino acid sequence homology)					
	SC-2020-1	LV4.2	Amervac	BJEU06-1	HKEU16	NMEU09-1
全基因组 Genome	90.45	86.44	85.14	83.78	84.17	82.37
ORF1a	88.78/89.48	84.69/86.44	82.98/85.02	81.63/83.48	81.71/83.60	79.42/81.06
ORF1b	92.71/96.38	88.11/94.88	87.04/94.74	85.31/94.54	86.09/93.72	83.97/93.17
NSP1	85.33/86.46	86.02/86.98	84.11/85.16	82.99/84.90	80.56/82.55	82.03/83.85
NSP2	87.37/85.47	83.31/80.69	81.24/78.73	79.02/76.10	80.31/76.29	76.15/72.73
NSP3	92.52/81.74	85.60/63.90	85.18/63.49	83.38/61.41	83.66/59.34	82.27/55.60
NSP4	93.45/84.31	89.53/72.55	89.36/73.53	86.91/66.18	86.74/65.20	86.25/65.69
NSP5	90.98/95.29	87.84/92.35	85.10/90.59	85.88/91.76	85.49/93.53	82.75/90.00
NSP6	89.58/93.75	81.25/87.50	81.25/87.50	75.00/87.50	79.17/93.75	81.25/87.50
NSP7	92.07/94.80	87.24/94.42	85.38/93.31	86.49/94.42	85.01/93.31	83.64/91.82
NSP8	93.33/95.56	88.89/91.11	90.37/93.33	88.15/91.11	87.41/93.33	88.15/91.11
NSP9	93.09/83.65	88.95/72.85	87.54/69.93	85.88/64.96	86.95/67.59	84.66/62.04
NSP10	92.46/96.38	86.27/92.76	85.52/92.53	84.39/93.44	84.31/90.50	82.88/91.86
NSP11	92.08/96.86	88.49/96.86	86.40/96.86	84.90/95.96	87.00/94.62	84.60/94.62
NSP12	93.11/90.78	89.07/87.94	89.07/88.65	86.94/86.52	86.22/86.52	84.09/82.98
ORF2a	93.87/94.40	88.53/90.40	87.33/88.00	86.13/88.80	85.73/87.20	85.87/87.60
ORF2b	95.31/95.77	93.90/97.18	92.96/95.77	92.96/95.77	87.79/91.55	91.55/95.77
ORF3	91.48/90.11	84.46/81.20	83.33/79.32	82.44/80.23	83.72/79.85	84.35/83.65
ORF4	86.85/88.40	84.42/84.24	83.51/85.33	83.15/82.87	84.26/85.08	85.00/85.08
ORF5	88.94/87.62	84.98/84.65	85.64/87.13	85.81/87.62	83.83/89.11	83.99/85.64
ORF6	87.55/90.80	88.12/91.95	88.70/91.38	86.02/88.51	90.04/93.10	87.74/90.23
ORF7	93.80/93.02	93.28/95.35	91.99/93.80	90.18/87.60	90.18/89.92	88.89/90.70

显差异,因此被确定为一个新亚群;PRRSV2-GXHZ-202408毒株的全基因组和ORF5基因的系统发育树结果均显示该毒株属谱系1.8,该谱系代表毒株为NADC30。值得注意的是,PRRSV2-GXHZ-202408毒株在进化树中位于NADC30参考毒株的一个相对独立的分支,表明其存在较大的变异(图2)。

2.3 流行毒株基因重组特点分析

重组是PRRSV进化和遗传变异的重要机制,不同重组模式的毒株毒力表现情况也不尽相同。重组分析结果显示,PRRSV1-GXHZ-202408毒株的全基因组以SC-2020-1(MW115431)毒株作为骨架病毒,整个基因组共存在6个重组断点,可分为7个区域。在M蛋白区域的14 131~14 570 nt片段由HKEU16(EU076704)毒株提供,在NSP1和NSP2交界区域的651~2 050 nt的片段由LV4.2.1(AY588319)毒株提供。覆盖了GP4和GP5交界区

域的13 211~13 590 nt片段重组信号比较弱,主要是因为欧洲型毒株的参考毒株基因过少,没有筛查到高相似的亲本,因此还有待进一步验证(图3)。PRRSV2-GXHZ-202408毒株存在明确的重组信号,参与重组事件的骨架病毒为NADC30(MH500776),次亲本毒株为JXA1(EF112445)。2个重组断点分别分布在NSP3(5 331 nt)和NSP9(8 081 nt)。次要亲本JXA1毒株提供的片段即为两个重组断点之间的区域(图4)。

3 讨论

PRRSV在我国的流行呈复杂多样性。自1996年CH-1a毒株首次分离以来,PRRSV不断演变。2006年高致病性蓝耳病(HP-PRRS)的暴发导致行业重创,2011年欧洲型毒株的发现揭示了欧洲型与美洲型PRRSV毒株的共存格局,而2013年后NADC30-like毒株的流行以及2017年NADC34-

表 3 PRRSV2-GXHZ-202408株编码基因核苷酸(nt)和氨基酸(aa)同源性分析

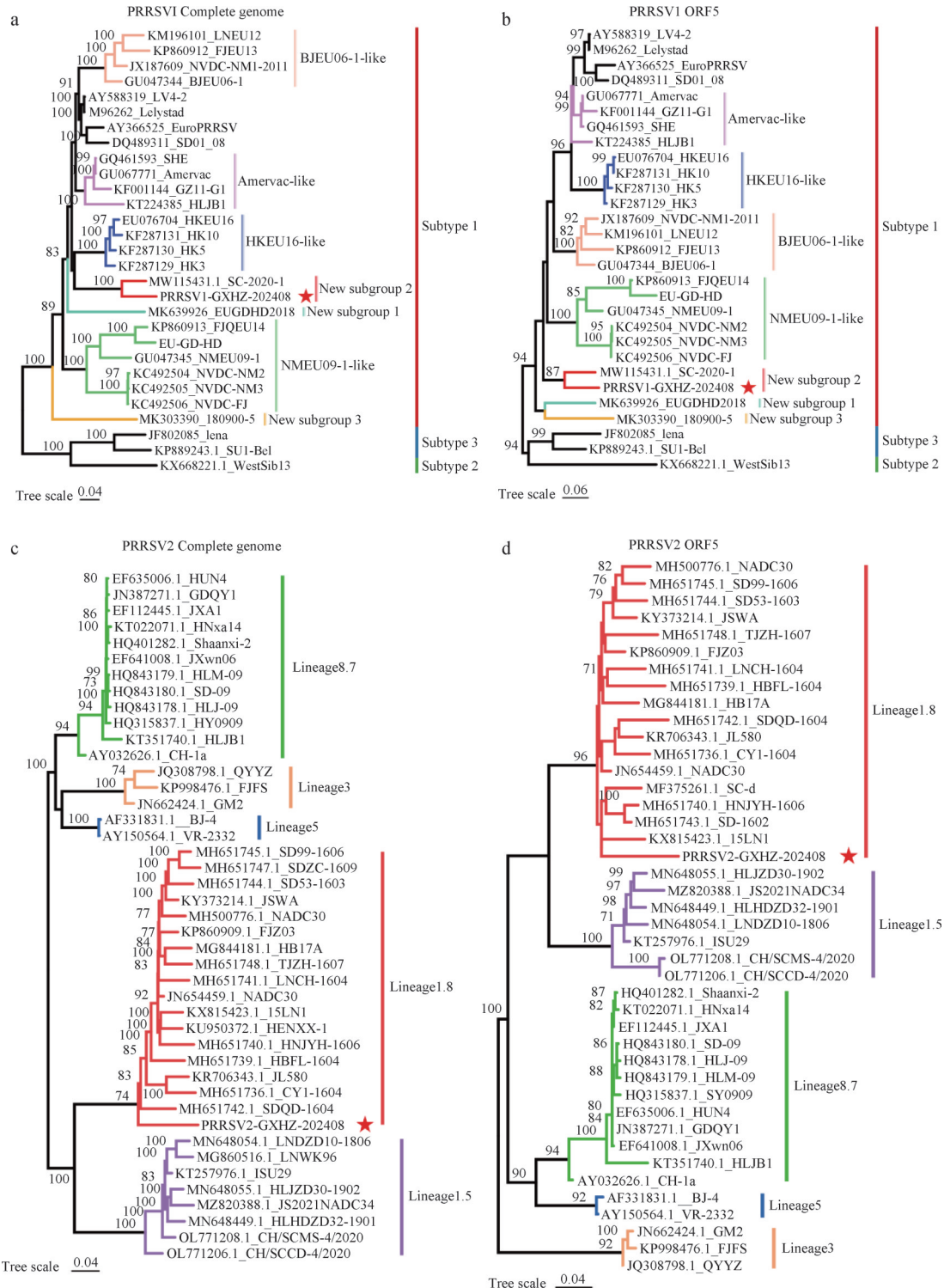
Table 3 Nucleotide (nt) and amino acid (aa) sequence homology analysis of coding genes in PRRSV2-GXHZ-202408 isolate

区域 Region	毒株(核苷酸同源性/氨基酸同源性) Strain (Nucleotide sequence homology/amino acid sequence homology)					
	NADC30	JXA1	NADC34	CH-1a	GM2	VR2332
全基因组 Genome	88.63	80.89	82.93	81.39	79.17	80.26
ORF1a	85.68/86.90	76.13/76.00	78.50/79.25	76.78/76.08	72.80/73.18	76.65/77.16
ORF1b	91.40/96.50	86.21/95.13	86.85/95.06	86.35/94.65	85.32/94.72	85.89/94.65
NSP1	89.27/88.74	81.33/83.77	83.42/84.55	82.02/82.98	79.93/82.46	82.72/85.08
NSP2	86.10/84.07	63.15/59.45	72.60/68.40	65.50/60.95	62.39/57.79	67.28/63.85
NSP3	87.45/94.37	85.43/93.07	86.87/92.64	85.14/93.51	78.64/87.88	84.42/92.64
NSP4	82.84/91.18	92.97/97.55	82.52/93.14	90.52/94.12	82.84/91.18	86.93/92.65
NSP5	84.71/88.82	91.37/92.94	81.96/87.06	90.20/91.76	82.55/88.82	86.08/89.41
NSP6	89.58/93.75	95.83/93.75	83.33/81.25	93.75/93.75	93.75/93.75	91.67/87.50
NSP7	80.05/83.78	93.05/93.82	81.21/87.64	90.60/91.89	88.29/89.96	87.00/89.58
NSP8	83.70/88.89	93.33/95.56	88.89/88.89	92.59/95.56	88.15/95.56	88.89/95.56
NSP9	90.21/76.64	86.75/65.99	86.41/66.86	86.26/65.11	85.97/65.40	86.22/65.40
NSP10	91.84/96.83	84.58/93.65	88.66/96.83	84.28/92.97	84.35/94.56	84.13/94.33
NSP11	92.08/96.86	88.04/96.41	86.85/94.62	91.03/95.96	86.40/94.62	87.89/94.17
NSP12	92.59/97.39	88.02/95.42	84.31/89.54	87.80/94.12	84.53/94.12	87.58/93.46
ORF2a	91.05/88.72	85.99/86.38	83.14/81.32	85.99/87.94	85.08/87.55	85.34/85.60
ORF2b	93.69/97.30	91.44/90.54	87.84/93.24	90.99/87.84	90.99/90.54	89.64/87.84
ORF3	90.33/89.02	81.44/76.86	83.92/80.39	81.18/76.08	80.52/79.22	81.96/78.04
ORF4	93.48/94.41	84.36/86.03	92.55/94.41	85.10/86.03	84.92/84.92	86.59/87.15
ORF5	90.22/90.05	83.58/84.58	86.40/90.05	85.41/86.07	82.09/81.59	84.08/82.59
ORF6	93.90/98.29	87.62/93.71	92.57/94.29	87.81/92.57	89.14/93.14	89.33/93.71
ORF7	95.16/97.58	90.59/91.13	93.01/93.55	90.59/92.74	84.95/86.29	91.67/93.55

like 毒株的出现进一步加剧了毒株流行的复杂性^[16]。目前,国内以美洲型PRRSV的流行占据主要地位,呈现出多谱系共存的态势。根据ORF5区域的系统发育关系,我国主要流行的美洲型蓝耳又分为4个谱系,即谱系1(NADC30-like和NADC34-like)、谱系3(QYYZ-like)、谱系5(VR2332-like)和谱系8.7(JXA1-like和CH-1a-like)^[8]。2021年度的一项监测数据显示,谱系1毒株数量占该年阳性临床标本数量的64%,表明以NADC30-like毒株为代表的谱系1毒株已取代HP-PRRSV毒株成为中国流行的主要株系^[26]。以往欧洲型毒株在临床生产中对养猪业造成的损失相对较小且发生率较低,往往被人们忽视。但值得注意的是,近年来欧洲型毒株已扩散至我国至少28个省份,且近年来其致病性呈上升趋势,加强对欧洲型毒株在我国流行趋势动态的监测同样具有重大意义^[10,27]。目前,美洲型和欧洲型毒株在猪场混合感染暴发的事件在国外已

经有报道,但在国内的报道较少^[28]。随着欧洲型毒株在我国猪群的持续扩散,可以预见此类混合感染事件的发生将呈上升趋势,应予以高度重视。

临床样本(如血液、组织、粪便)中宿主RNA占比通常超过90%,若不去除宿主RNA,测序数据中绝大部分为宿主序列,这可能导致目标病原体序列覆盖深度不足,增加完整基因组的拼接难度^[29]。本研究对广西某猪场的无污染血清样品进行RNA提取、宿主RNA去除和建库测序,共得到了2.8 Gb原始数据,通过质控后平均Reads质量为Q37,数据量较大且质量较高。使用MEGAHIT进行序列拼接,成功获取到PRRSV1-GXHZ-202408和PRRSV2-GXHZ-202408两个样品毒株全基因组序列。Samtools软件分析可得,2个样品毒株的平均测序深度均达到了10 000×,序列准确可信。从进化分析和重组分析结果观察,PRRSV1-GXHZ-202408属于欧洲型毒株的一个新的亚群,其与公共数据库

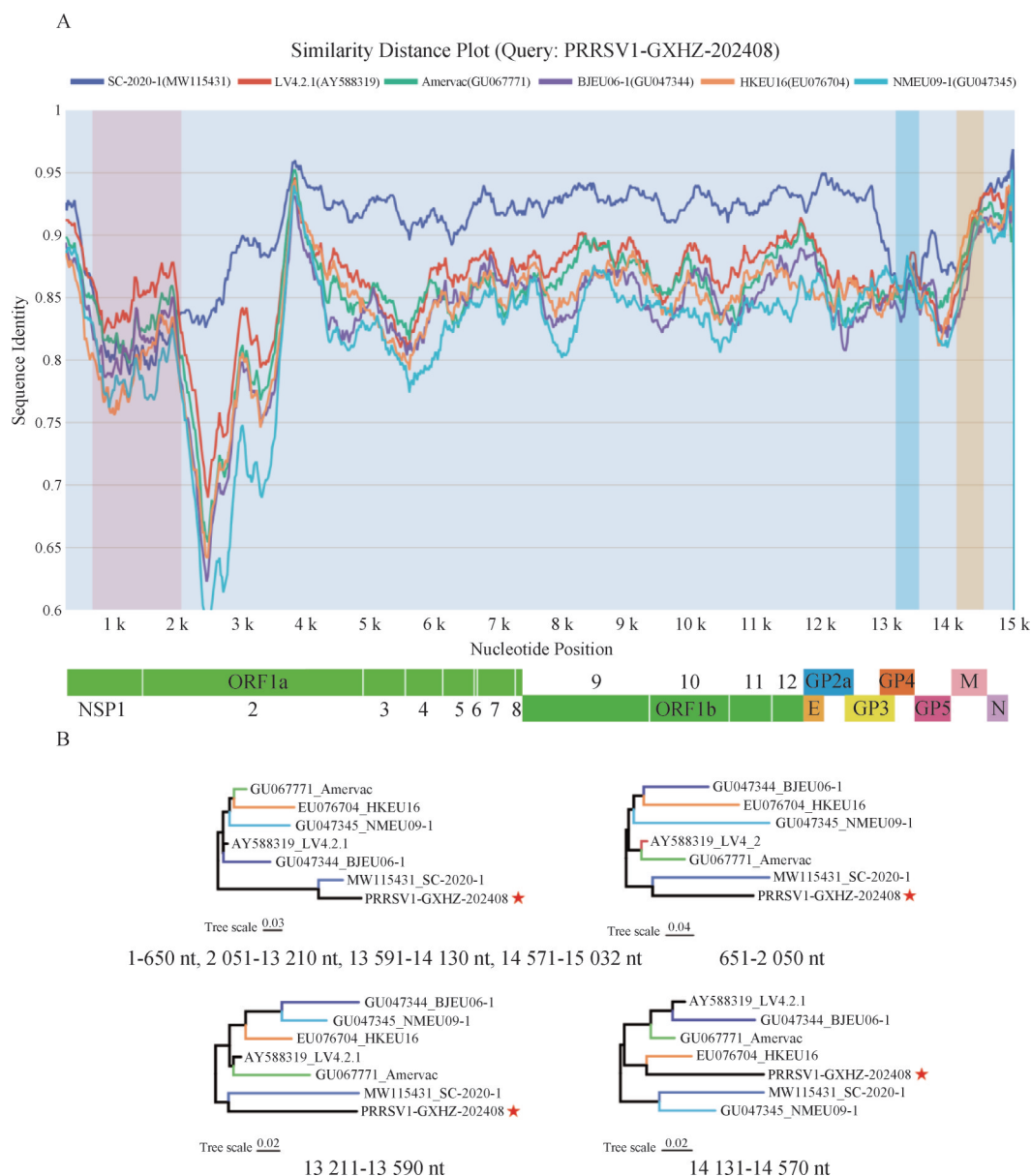


a、b. 基于 PRRSV1-GXHZ-202408 毒株全基因组和 *ORF5* 基因构建的最大似然发育树；c、d. 基于 PRRSV2-GXHZ-202408 毒株全基因组和 *ORF5* 基因构建的最大似然发育树。样品毒株用红色★标识

a, b. Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed based on the complete genome and *ORF5* gene of PRRSV1-GXHZ-202408; c, d. Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed based on the complete genome and *ORF5* gene of PRRSV2-GXHZ-202408. The isolated strain is marked with a red star (★)

图2 样品毒株系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the isolated viral strains



A. 相似度图(使用 Simplot 生成),彩色实线代表不同亚群的参考毒株,可能的重组区域用不同颜色标注;B. 基于不同重组区域构建的遗传进化树,样品毒株用红色★标识

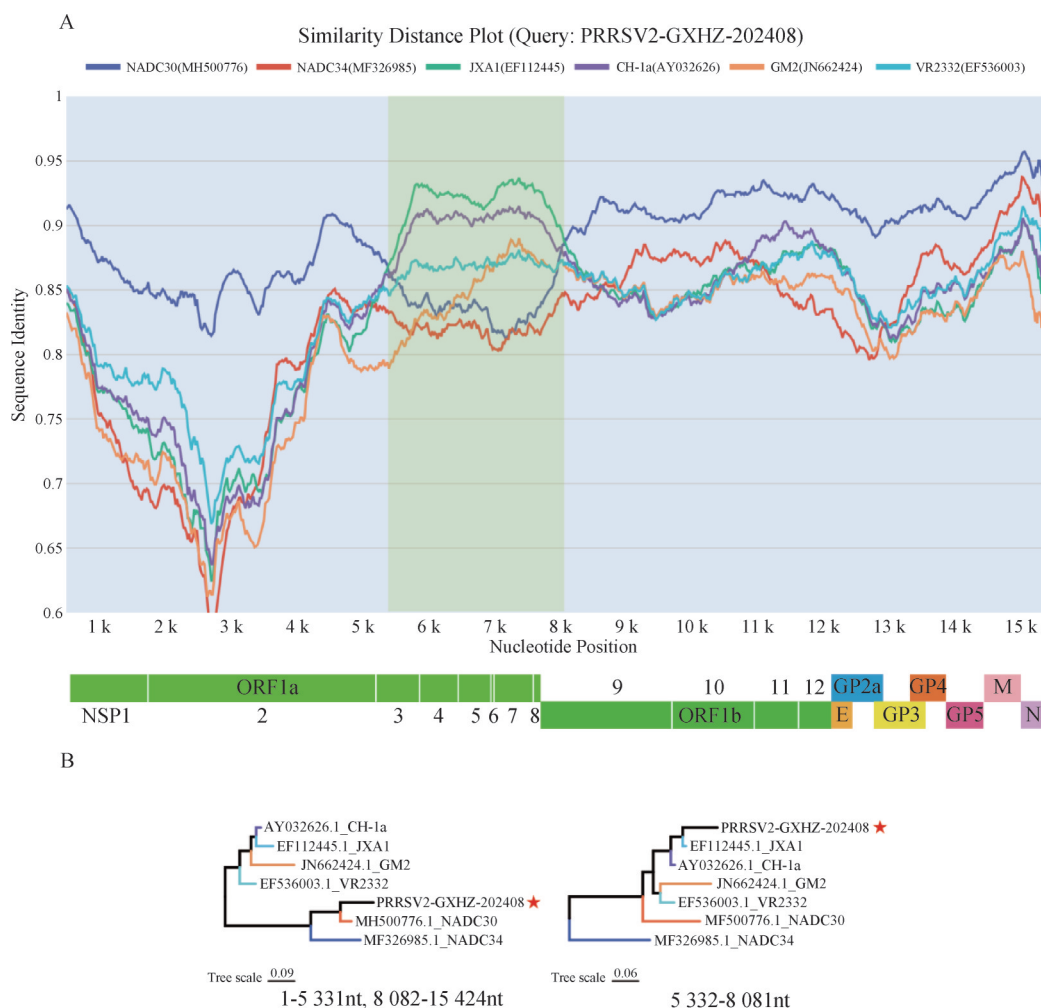
A. Similarity plot (generated by Simplot), with colored solid lines representing reference strains from different subgroups, and potential recombination regions indicated by distinct color codes; B. Phylogenetic trees of different recombinant regions, where the isolated strain is marked with a red symbol (★)

图3 PRRSV1-GXHZ-202408 毒株的基因重组分析

Fig. 3 Genetic recombination analysis of PRRSV1-GXHZ-202408 strain

中 SC-2020-1 毒株有最高的核苷酸相似度为 90.45%,而后者与 2020 年四川省某猪场母猪的流产密切相关^[30]。该新亚群最早被发现的毒株即 SC-2020-1 最先于 2020 年在四川省被报道,本研究却在广西发现与之相同亚群的 PRRSV1-GXHZ-202408 毒株,提示经过数年时间的扩散,该亚群的毒株可能已经传播至全国多个地方,这同时也说明

目前针对欧洲型 PRRSV 的监测不足。有研究对已公开的中国欧洲型 PRRSV 分离株进行重组事件的探查,发现近一半数量的分离株发生了重组事件,表明中国欧洲型 PRRSV 基因组易于发生基因重组^[27]。在本研究中 PRRSV1-GXHZ-202408 毒株的 ORF1a 和 M 蛋白区域也检测出了重组事件。PRRSV2-GXHZ-202408 毒株属于美洲型 PRRSV



A. 相似度图(使用 Simplot 生成),彩色实线代表不同谱系的参考毒株,可能的重组区域用不同颜色标注;B. 基于不同重组区域构建的遗传进化树,样品毒株用红色★标识

A. Similarity plot (generated by Simplot), with colored solid lines representing reference strains from different lineages, and potential recombination regions indicated by distinct color codes; B. Phylogenetic trees of different recombinant regions, where the isolated strain is marked with a red symbol (★)

图4 PRRSV2-GXHZ-202408 毒株的基因重组分析

Fig. 4 Genetic recombination analysis of PRRSV2-GXHZ-202408 strain

的 1.8 谱系,是我国现在流行的优势毒株,该分离株与参考毒株存在较大的遗传差异,显示出高变异的特点。有研究表明,NADC30-like 毒株具有最高的替换率和较高的病毒遗传多样性,且谱系间重组事件的发生也更频繁。同时,该研究还从分子进化动力学的角度预测 NADC30-like 毒株可能成为下一波暴发毒株^[31]。这提示,加强对毒株全基因组的监测迫在眉睫。

PRRSV 的常规检测方法包括病毒分离方法、基于抗体水平以评估感染或免疫状态的血清学检测方法(如 ELISA)和基于病毒特定基因片段快速检测病毒核酸的分子生物学检测方法(如 RT-PCR

等)^[32],但是这些检测方法存在靶标单一、难以识别混合感染、分型能力弱等缺陷,不能较好且全面地解析病毒的所携带的进化流行信息。宏转录组测序技术因其无需预设靶标即可获取全基因组信息,具有高分辨率、广覆盖性和深度解析能力^[33]。运用宏转录组测序技术在混合感染识别、新毒株发现及病毒进化追踪中展现出不可替代的优势,在动物疫病诊断和监测中发挥着越来越重要的作用。

4 结论

本研究基于宏转录组测序技术对广西壮族自治区某猪场的 1 份 PRRSV 阳性血清样品进行测序

及分析,识别出该场处于欧洲型与美洲型 PRRSV 混合感染的状态。通过对毒株全基因组的进化和重组分析,进一步对毒株的遗传特征有了清晰的认识,从而为猪场的精准防控提供了依据,也显示出宏转录组测序技术在动物疫病诊断和监测中重要的作用。

参考文献 (References):

- [1] DONE S H, PATON D J, WHITE M E C. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects [J]. *Br Vet J*, 1996, 152 (2): 153-174.
- [2] ZIMMERMAN J J, YOON K J, WILLS R W, et al. General overview of PRRSV: a perspective from the United States [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 55 (1-4): 187-196.
- [3] MEULENBERG J J M. PRRSV, the virus [J]. *Vet Res*, 2000, 31(1):11-21.
- [4] 孙琪, 许浒, 李超, 等. 欧洲型和美洲型 PRRSV 的最新分类及其差异的研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(9):1006-1013.
- SUN Q, XU H, LI C, et al. Advances in researches on classification and differences between PRRSV-1 and PRRSV-2[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(9):1006-1013. (in Chinese)
- [5] BRINTON M A, GULYAEVA A A, BALASURIYA U B R, et al. ICTV virus taxonomy profile: Arteriviridae 2021 [J]. *J Gen Virol*, 2021, 102 (8): 001632.
- [6] CHEN N, CAO Z, YU X, et al. Emergence of novel European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mainland China [J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(4):880-892.
- [7] LI C, XU H, ZHAO J, et al. Epidemiological investigation and genetic evolutionary analysis of PRRSV-1 on a pig farm in China [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13:1067173.
- [8] LI C, FAN A, LIU Z, et al. Prevalence, time of infection, and diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Viruses*, 2024, 16(5):774.
- [9] CHEN N, LIU Q, QIAO M, et al. Whole genome characterization of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 isolate: genetic evidence for recombination between Amervac vaccine and circulating strains in mainland China [J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 54:308-313.
- [10] SUN Q, XU H, AN T, et al. Recent progress in studies of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in China [J]. *Viruses*, 2023, 15(7): 1528.
- [11] WANG X, BAI X, WANG Y, et al. Pathogenicity characterization of PRRSV-1 181187-2 isolated in China [J]. *Microb Pathog*, 2023, 180:106158.
- [12] XU H, LI C, LI W, et al. Novel characteristics of Chinese NADC34-like PRRSV during 2020 - 2021 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (5): e3215-e3224.
- [13] MA X, WANG P, ZHANG R, et al. A NADC30-like PRRSV causes serious intestinal infections and tropism in piglets [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 268: 109397.
- [14] XIE J, CUI T, CUI J, et al. Epidemiological and evolutionary characteristics of the PRRSV in southern China from 2010 to 2013 [J]. *Microb Pathog*, 2014, 75:7-15.
- [15] ZHAO K, YE C, CHANG X, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *J Virol*, 2015, 89(20):10712-10716.
- [16] ZHOU L, HAN J, YANG H. The evolution and diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Vet Microbiol*, 2024, 298:110252.
- [17] PAN J, ZENG M, ZHAO M, et al. Research progress on the detection methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14:1097905.
- [18] LURCHACHAIWONG W, PAYUNGORN S, SRISATIDNARAKUL U, et al. Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 46 (1): 747203652.
- [19] XIAO S, CHEN Y, WANG L, et al. Simultaneous detection and differentiation of highly virulent and classical Chinese-type isolation of PRRSV by real-time RT-PCR [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014:1-7.
- [20] DREW T W. A review of evidence for immunosuppression due to porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Res*, 2000, 31(1):27-39.

- [21] MANDLIK J S, PATIL A S, SINGH S. Next-generation sequencing (NGS): platforms and applications [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2024, 16 (Suppl 1): S41-S45.
- [22] COBBIN J C, CHARON J, HARVEY E, et al. Current challenges to virus discovery by meta-transcriptomics [J]. *Curr Opin Virol*, 2021, 51: 48-55.
- [23] KUMAR K R, COWLEY M J, DAVIS R L. Next-generation sequencing and emerging technologies [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2019, 45 (7): 661-673.
- [24] SUN Y, XING J, HONG S L, et al. Untangling lineage introductions, persistence and transmission drivers of HP-PRRSV sublineage 8.7 [J]. *Nat Commun*, 2024, 15 (1): 8842.
- [25] 李 跃, 张长春, 刘光裕, 等. 宏转录组测序技术在一起仔猪病毒性腹泻疾病诊断中的运用及分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55 (8): 3579-3589.
- LI Y, ZHANG C C, LIU G Y, et al. Application and analysis of meta-transcriptomics sequencing technology in the diagnosis of viral diarrhea diseases in piglet [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55 (8): 3579-3589. (in Chinese)
- [26] ZHANG R, LI H, XIE H, et al. Comparing the molecular evolution and recombination patterns of predominant PRRSV-2 lineages co-circulating in China [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1398470.
- [27] QIU Y, QIU M, LI S, et al. Emergence, prevalence and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 in China from 1994 to 2024 [J]. *Virology*, 2025, 605: 110457.
- [28] RAEV S, YUZHAKOV A, BULGAKOV A, et al. An outbreak of a respiratory disorder at a Russian swine farm associated with the co-circulation of PRRSV1 and PRRSV2 [J]. *Viruses*, 2020, 12 (10): 1169.
- [29] SHAKYA M, LO C C, CHAIN P. Advances and challenges in metatranscriptomic analysis [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 904.
- [30] ZHAO J, ZHU L, DENG H, et al. Genetic characterization of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus type I strain from southwest China [J]. *Arch Virol*, 2021, 166 (6): 1769-1773.
- [31] GUO J, LIU Z, TONG X, et al. Evolutionary dynamics of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus by whole-genome analysis [J]. *Viruses*, 2021, 13 (12): 2469.
- [32] PAN J, ZENG M, ZHAO M, et al. Research progress on the detection methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1097905.
- [33] SUMINDA G G D, BHANDARI S, WON Y, et al. High-throughput sequencing technologies in the detection of livestock pathogens, diagnosis, and zoonotic surveillance [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 5378-5392.

(编辑 范子娟)