



基于宏转录组测序技术对一例猪繁殖与呼吸综合征病毒多谱系混合感染的鉴定与分析

陈盼丹^{1,2,3,4}, 许小龙^{1,2,3,4}, 李慧鑫^{1,2,3,4}, 王良锋^{1,2,3,4}, 张倩君^{1,2,3,4}, 董亚娜^{1,2,3,4},
苏佳涛^{1,2,3,4}, 许丹^{1,2,3,4}, 王衡^{1,2,3,4}, 龚浪^{1,2,3,4}, 孙彦阔^{1,2,3,4*}, 秦锋^{5*}

(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. 国家猪繁殖与呼吸综合征疫病协作实验室, 广州 510642; 3. 农业部人畜共患病重点实验室, 广州 510642; 4. 岭南现代农业疫苗创制实验室, 广州 510642; 5. 信阳市畜禽重大疫病防控综合技术研发重点实验室/信阳农林学院, 信阳 464000)

摘要: 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)是对中国养猪业造成重大经济损失的病原之一。目前, PRRSV-2在国内占据主导地位, 呈现出多谱系共存的复杂态势, 增加了防控难度。本研究旨在评估宏转录组测序技术在PRRSV-2多谱系混合感染鉴别诊断中的应用潜力。通过对四川某猪场采集的1份PRRSV-2阳性血清样品进行宏转录组测序, 获得病毒的全基因组序列, 并进一步结合遗传进化分析(IQ-TREE)、相似性比对(Megalign)及重组分析(RDP4/SimPlot)深入解析病毒的进化重组特征。结果显示, 本研究从单一血清样品中成功鉴定出SC01-2025(15 023 bp)、SC02-2025(14 954 bp)、SC03-2025(15 293 bp)共3株PRRSV-2, 它们的进化分群分别属于谱系1.8、谱系3和谱系8.7。其中, SC01-2025为谱系1.8(代表株NADC30)与谱系5(代表株VR2332)的重组株, 其全基因组与NADC30株相似性为88.09%, 但在NSP3~7、NSP9~12及ORF3区域与VR2332株相似性更高; SC02-2025为三谱系重组株(谱系1.8/3/8.7), 该株在NSP2和NSP3区域与NADC30株最相似, 在NSP1、NSP7~10与JXA1株最相似, 剩下的区域则与QYYZ株最相似; SC03-2025与JXA1-P80疫苗株全基因组相似性达99%, 未检测到重组。本研究基于宏转录组测序技术精准识别出1例四川某猪场PRRSV多谱系混合感染, 揭示了该猪场疫苗株(JXA1-P80)与野毒株(类NADC30株、类QYYZ株)共存的复杂流行情况, 研究结果表明宏转录组测序技术可为PRRSV疫病诊断和监测提供高分辨率技术支撑。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 多谱系混合感染; 宏转录组测序技术; 基因重组

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0933-12

Identification and Analysis of a Multi-lineage Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Co-infection Case Using Metatranscriptomic Sequencing

CHEN Pandan^{1,2,3,4}, XU Xiaolong^{1,2,3,4}, LI Huixin^{1,2,3,4}, WANG Liangfeng^{1,2,3,4}, ZHANG Qianjun^{1,2,3,4},
DONG Yana^{1,2,3,4}, SU Jiatao^{1,2,3,4}, XU Dan^{1,2,3,4}, WANG Heng^{1,2,3,4}, GONG Lang^{1,2,3,4},
SUN Yankuo^{1,2,3,4*}, QIN Feng^{5*}

(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;

收稿日期: 2025-06-10

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队(2024CXTD22); 华南农业大学高校学科建设专项(2023B10564003); 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: 陈盼丹, 主要从事兽医传染病和生物信息学研究, E-mail: 20243073010@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; 秦锋, 主要从事养猪生产与猪群健康管理, E-mail: 987031750@qq.com

2. *National Collaborative Laboratory for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*, Guangzhou 510642, China; 3. *Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs*, Guangzhou 510642, China; 4. *Lingnan Modern Agriculture Science and Technology Laboratory, Vaccine Research and Development Center*, Guangzhou 510642, China; 5. *Xinyang City Key Laboratory of Comprehensive Technology Research and Development for the Prevention and Control of Major Livestock and Poultry Diseases/Xinyang Agriculture and Forestry University*, Xinyang 464000, China)

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) remains a pathogen causing substantial economic losses to China's swine industry. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 (PRRSV-2) currently predominates in China, exhibiting a complex epidemiological pattern characterized by co-circulating multiple lineages, which significantly complicates disease control measures. This study aimed to evaluate the diagnostic potential of metatranscriptomic sequencing in discriminating PRRSV-2 mixed infections involving multiple lineages. A PRRSV-2-positive serum sample collected from a swine farm in Sichuan Province was subjected to metatranscriptomic sequencing. This approach successfully recovered complete viral genome sequences. Subsequent comprehensive analysis, including phylogenetic reconstruction (IQ-TREE), similarity comparison (Megalyn), and recombination analysis (RDP4/SimPlot), was employed to elucidate the evolutionary and recombination characteristics of the viruses. The results demonstrate the successful identification of three distinct PRRSV-2 strains from this single serum sample: SC01-2025 (15 023 bp), SC02-2025 (14 954 bp), and SC03-2025 (15 293 bp)—the phylogenetic classification assigned these strains to lineages 1.8, 3, and 8.7, respectively. SC01-2025 was identified as a recombinant between lineage 1.8 (NADC30) and lineage 5 (VR2332). While its full genome shared 88.09% nucleotide similarity with the NADC30 strain, regions encompassing NSP3-7, NSP9-12, and ORF3 exhibited higher similarity to the VR2332 strain. SC02-2025 was found to be a triple-recombinant virus (lineages 1.8/3/8.7). This strain displayed the highest similarity to the NADC30 strain within the NSP2 and NSP3 regions, to the JXA1 strain within NSP1 and NSP7-10 regions, and the QYYZ strain in the remaining genomic segments. SC03-2025 showed 99% full-genome nucleotide similarity to the JXA1-P80 vaccine strain, with no evidence of recombination detected. This study, leveraging metatranscriptomic sequencing, precisely identified a mixed infection involving multiple PRRSV-2 lineages within a single pig farm in Sichuan. It revealed the complex epidemiological scenario involving the concurrent presence of a vaccine strain (JXA1-P80) and field strains (NADC30-like and QYYZ-like viruses). These findings demonstrate that metatranscriptomic sequencing provides high-resolution diagnostic support for PRRSV disease surveillance and monitoring.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; multi-lineage co-infection; metatranscriptomic sequencing; genetic recombination

* **Corresponding author:** SUN Yankuo, E-mail: yankuosun@scau.edu.cn; QIN Feng, E-mail: 987031750@qq.com

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)属于动脉炎病毒科, β -动脉炎病毒属, 是一种有包膜的单股正链RNA病毒, 具有高度传染性和显著的遗传多样性,

可诱导宿主产生免疫抑制, 并在感染动物体内形成持续性感染^[1-2]。根据基因组差异, PRRSV被划分为欧洲型(PRRSV-1)和美洲型(PRRSV-2)^[3]。基于病毒ORF5基因系统发育关系, PRRSV-2又可以

进一步分为谱系 1~谱系 9^[4]。当前,我国以 PRRSV-2 的流行占据主要地位,呈现出谱系 1 (NADC30 和 NADC34)、谱系 3(QYYZ 和 GM2)、谱系 5(VR2332)和谱系 8(JXA1 和 CH-1a)多谱系共存的局面^[5-7]。PRRSV 基因组呈现出较高的变异速率和较强的重组倾向,新型变异株和重组株不断出现,使得我国 PRRSV 的流行情况更加复杂,这也对精准诊断技术提出了更高要求^[8]。

目前 PRRSV 的监测和诊断方法主要包括血清学检测和病原核酸检测。其中,酶联免疫吸附试验(ELISA)、血清病毒中和试验(SVN)和间接免疫荧光试验(IFA)等血清学检测技术虽已广泛应用于临床监测,但抗体交叉反应会干扰疫苗免疫和野毒株感染的鉴别诊断^[9]。在病原核酸检测方面,基于 PCR 原理的检测方法如实时荧光定量反转录 PCR(RT-qPCR),通过靶向 PRRSV 基因组设计引物或探针,具有高特异、高灵敏、快速便捷的优点^[10]。但这些方法依赖于参考株和保守序列,往往无法对新发株和变异株做到有效覆盖^[11]。同时,这种仅针对 PRRSV 部分基因的监测和诊断所能提供的信息有限,不能够完全反映病毒的遗传进化关系和重组情况,难以满足病毒溯源、揭示变异规律等相关研究和 PRRSV 防控的需求。宏转录组测序技术通过无偏倚捕获样本中全部核酸信息,无需依赖已知序列设计引物,即可全面鉴定样品中的病原微生物组成并获取其基因序列^[12]。该技术具有高灵敏性和广泛的检测范围,可以为病原微生物流行病学等相关研究提供数据信息,在畜禽疫病诊断监测领域发挥着愈发重要的作用^[13-15]。

本研究从四川某猪场收集到 1 份疑似感染 PRRSV 的血清样品,经过 RT-qPCR 初步鉴定为 PRRSV 阳性后,对样品进行宏转录组测序并结合生物信息学方法获取到样品中所包含的 PRRSV 全基因组序列。进一步结合 GenBank 数据库中的 PRRSV 参考序列对测序所得 PRRSV 进行系统发育分析、相似性分析和重组分析,识别出样品中 PRRSV 多谱系混合感染的现象并解析出各株 PRRSV 的遗传进化特点,为猪场精准防控提供了流行病学参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品前处理与 RT-qPCR 检测

从四川省某具有高致病性 PRRSV (HP-

PRRSV)疫苗免疫史的猪场采集 1 份疑似感染 PRRSV 病猪的血清样品,随后低温运送至华南农业大学兽医学院动物疫病高通量诊断中心。采用 Virus DNA/RNA Extraction Kit 2.0 (Vazyme, 货号:RM401-01)对血清样品中的核酸进行提取纯化,获取总病原核酸后,使用广东海大畜牧兽医研究院有限公司生产的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV-1、2 型) RT-qPCR 检测试剂盒(批号:2501020)进行病毒核酸检测。

1.2 文库制备及宏转录组测序

使用 Qubit 试剂(Equalbit RNA HS Assay Kit, Vazyme)精确测定上一步提取的 RNA 浓度。随后按照 VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Prep Kit for MGI(Vazyme)建库试剂盒说明书的体系和反应程序构建测序文库:利用 DNA 消化酶和磁珠纯化去除总 RNA 中污染的 DNA;通过镁离子打断将 RNA 随机片段化后使用探针法(Ribo-off rRNA Depletion Kit, Vazyme)去除核糖体 RNA,再投入随机引物合成一链 cDNA;接着进行 cDNA 二链合成、末端修复及 dA 尾添加;投入 MGI 特异性测序接头与文库连接,并通过两轮磁珠筛选保留长度在 200 与 500 bp 区间的文库片段;最后进行文库扩增与磁珠纯化。

文库构建完成后使用 Invitrogen Qubit 4 荧光仪(Thermo Fisher Scientific)和 Qsep100 全自动核酸蛋白分析系统(光鼎生物)对文库进行双链核酸浓度和片段分布质检,要求文库双链核酸浓度 $\geq 6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,片段分布在 300~500 bp 区间。将符合质量标准的文库进行 DNA 变性、环化和消化,得到单链环状 DNA。单链环状 DNA 通过滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)得到 DNA 纳米球(DNA nano ball, DNB),使用 Invitrogen Qubit 4 荧光仪(Thermo Fisher Scientific)进行定量质控,要求文库浓度 $> 2 \text{ fmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。将 DNB 加载至华大智造 MGISEQ-200 测序芯片,采用联合探针锚定聚合技术(combinatorial probe-anchor synthesis, cPAS)进行双端 150 碱基对(PE150)测序,平均测序深度 $\geq 100 \text{ X}$,单样本数据分配量 $\geq 6 \text{ Gb}$ 。

1.3 测序数据质控、组装及序列验证

对双末端原始测序数据使用 FastQC(V 0.12.1)软件进行测序质量评估,明确原始数据的质量分布特征并制定预处理方案。随后通过 Trimmomatic(V 0.39)软件进行深度数据清洗过滤,通过移除接

头序列、截除 reads(读段)两端低置信度碱基、过滤长度不足 50 bp 的低质量 reads,最终获得 Clean reads(质控后的高质量短序列片段, Q30 在 90% 以上)。使用 Kraken2(V 2.1.3)工具对质控后的宏转录组数据进行分类并提取出被分类到病毒的 reads。对这些 reads 使用 MEGAHIT(V 1.2.9)软件进行无参考基因组(de novo)组装,采用 de Bruijn graph(dBg)策略,通过滑动大小为 k 的窗口将 reads 分解为重叠的 k -mers(长度为 k 的核苷酸片段),每个 k -mer 作为图中的节点,若一个 k -mer 的后 $k-1$ 个碱基与另一个 k -mer 的前 $k-1$ 个碱基重叠,则通过有向边连接这两个节点。通过遍历图中的线性路径生成 contigs(重叠群,即连续序列片段)。设定组装最小长度阈值为 500 bp 以排除短片段干扰。将组装所得 contigs 与本实验室构建的 PRRSV 参考数据库进行 BLASTn(BLAST 2.15.0)序列比对,最终筛选出与 PRRSV 参考数据库核苷酸相似性 $\geq 60\%$, $E\text{-value} \leq 1 \times 10^{-6}$ 的 contigs,并以全基因组无缺失的 VR2332(EF536003.1)为参考株进行序列的真实性和完整性验证。

1.4 测序所得 PRRSV 全基因组及 ORF5 基因遗传进化分析和相似性分析

为了了解该猪场 PRRSV 的遗传进化关系,从 NCBI GenBank 数据库下载了一些 PRRSV-2 各谱系的代表性序列和 PRRSV-1 的代表性序列作为参考(表 1)。使用 MAFFT(V 7.525)软件分别进行全基因组和 ORF5 基因多序列比对,随后利用 TrimAL(V 0.12.1)软件裁剪掉低质量比对区域。接着在 IQ-TREE(V 2.3.0)软件(bootstrap 值为 1 000)中分别构建全基因组与 ORF5 基因的最大似然系统发育树。最后使用 FigTree 软件进行可视化。利用 Megalign(V 7.1.0)对测序所得 PRRSV 与各谱系的代表株(NADC30(MH500776.1)、NADC34(MF326985.1)、QYYZ(JQ308798.1)、VR2332(EF536003.1)、JXA1(EF112445.1))的全基因组和各功能区域的核苷酸序列进行相似性分析。

1.5 测序所得 PRRSV 全基因组序列的重组分析

为了评估所测得的 PRRSV 全基因组序列潜在的重组事件,笔者以 NADC30(MH500776.1)、NADC34(MF326985.1)、QYYZ(JQ308798.1)、VR2332(EF536003.1)、JXA1(EF112445.1)株的全基因组序列为参考序列,利用 RDP4(V 4.10.1)

软件中的 RDP、GENECONV、BootScan、Maxchi、Chimaera、SiScan 和 3Seq 共 7 种方法对测序所得 PRRSV 序列进行重组检测,当至少 5 种算法检测到重组信号($P < 0.01$)时判定为潜在重组事件。进一步使用 SimPlot 软件进行全基因组尺度的滑动窗口分析,设置窗口大小为 500 bp,步长为 20 bp。若检测到潜在重组断点,则针对断点分割的区域序列构建最大似然系统发育树,以验证重组事件的可靠性。

2 结果

2.1 测序所得 PRRSV 概述及其基因组缺失特点分析

对四川省某猪场的 1 份疑似感染 PRRSV 的血清样品采用 RT-qPCR 方法检测 PRRSV,结果显示样品呈 PRRSV-2 阳性。通过对宏转录组测序数据进行无参考基因组(de novo)组装,并对获得的 contigs 进行注释,得到了 3 条 PRRSV-2 序列,长度分别为 15 023、14 954、15 293 bp,并分别命名为 SC01-2025、SC02-2025、SC03-2025。为了探究测序所得 PRRSV 的基因组完整情况和样品混合感染情况,选取 VR2332(EF536003.1)参考株进行序列比对分析(图 1)。结果显示,这 3 株 PRRSV 的 ORF 区域功能结构完整,仅在 *nsp2* 基因处存在特异性缺失。SC01-2025、SC02-2025 和 SC03-2025 与 VR2332(EF536003.1)株全基因组相似性分别为 85.13%、80.49%、87.21%,相似性的差异表明样品中存在多株 PRRSV 的混合感染。进一步使用 Megalign 对 3 株测序所得 PRRSV 与 PRRSV 参考株的 NSP2 氨基酸序列进行比对分析,结果显示,SC01-2025 和 SC02-2025 在 NSP2 蛋白上表现出与类 NADC30 株相同的“111+1+19aa”不连续氨基酸缺失模式,SC03-2025 则为“1+29aa”缺失模式,该模式与以 JXA1 株为代表的高致病性 PRRSV 的 NSP2 氨基酸缺失特征一致。

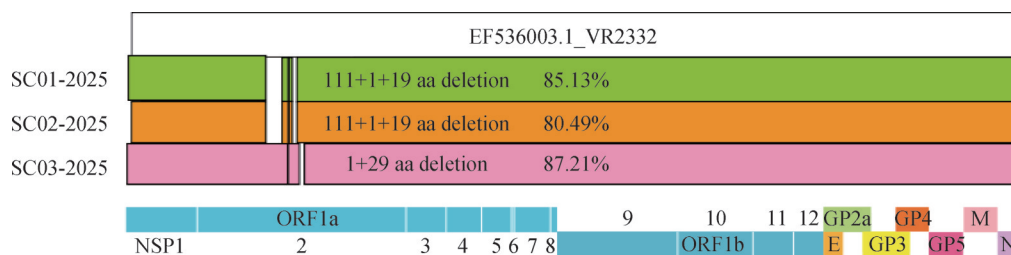
2.2 测序所得 PRRSV 全基因组及 ORF5 基因遗传进化分析

基于全基因组和 ORF5 基因序列构建的系统发育树显示,3 株 PRRSV 分别属于不同谱系(图 2)。其中,SC01-2025 株属于以 NADC30 株为代表的谱系 1.8,为类 NADC30 株;SC02-2025 株属于谱系 3,该谱系以 GM2、QYYZ 株为代表株;SC03-2025 株则属于谱系 8.7,与 JXA1-P80 疫苗株有最近的遗传

表1 本研究中PRRSV参考株信息

Table 1 PRRSV reference strains used in this study

登录号 Accession number	名称 Name	国家 Country	年份 Year	登录号 Accession number	名称 Name	国家 Country	年份 Year
AF176348.2	PA8	Canada	1995	KX815423.1	15LN1	China	2015
AY032626.1	CH-1a	China	1996	KX815415.1	15HEN4	China	2015
AF331831.1	BJ-4	China	2000	KP860909.1	FJZ03	China	2015
EF641008.1	JXwn06	China	2006	MF375261.1	SC-d	China	2015
EF112445.1	JXA1	China	2006	MH651737.1	CY2-1604	China	2016
HQ401282.1	Shaanxi-2	China	2007	MH651745.1	SD99-1606	China	2016
EF635006.1	HUN4	China	2007	MT093771.1	SD217-1705	China	2017
JN387271.1	GDQY1	China	2007	MG860516.1	LNWK96	China	2017
FJ548853.1	JXA1-P80	China	2008	ON462049.1	GXXNF74-1806	China	2018
HQ843180.1	SD-09	China	2009	MN648055.1	HLJZD30-1902	China	2019
HQ843178.1	HLJ-09	China	2009	MN648449.1	HLHDZD32-1901	China	2019
HQ315837.1	SY0909	China	2009	OL439476.1	GXGG202007	China	2020
JQ308798.1	QYYZ	China	2011	MW880772.1	SXSZ-2020	China	2020
JN662424.1	GM2	China	2011	OL771206.1	CH/SCCD-4/2020	China	2020
KR706343.1	JL580	China	2013	MZ820388.1	JS2021NADC34	China	2021
KT022071.1	HNxa14	China	2014	AY588319	LV4. 2. 1	Netherlands	2004
KY373214.1	JSWA	China	2014	EF536003.1	VR-2332	USA	1992
KU950372.1	HENXX-1	China	2014	AY545985.1	NVSL	USA	1997
KP998476.1	FJFS	China	2015	DQ988080.1	Ingelvac	USA	2006
KU978619.1	GD-KP	China	2015	JN654459.1	NADC30	USA	2008
MF375260.1	SD-A19	China	2015	KT257976.1	ISU29	USA	2014



不同色块代表组装获得的3条不同的PRRSV-2序列(SC01-2025、SC02-2025、SC03-2025),色块中的空缺表示其基因组的缺失情况,“aa deletion”表示氨基酸缺失,数值为其与VR2332(EF536003.1)株相似度。图中底部彩色条带为PRRSV基因组结构示意图

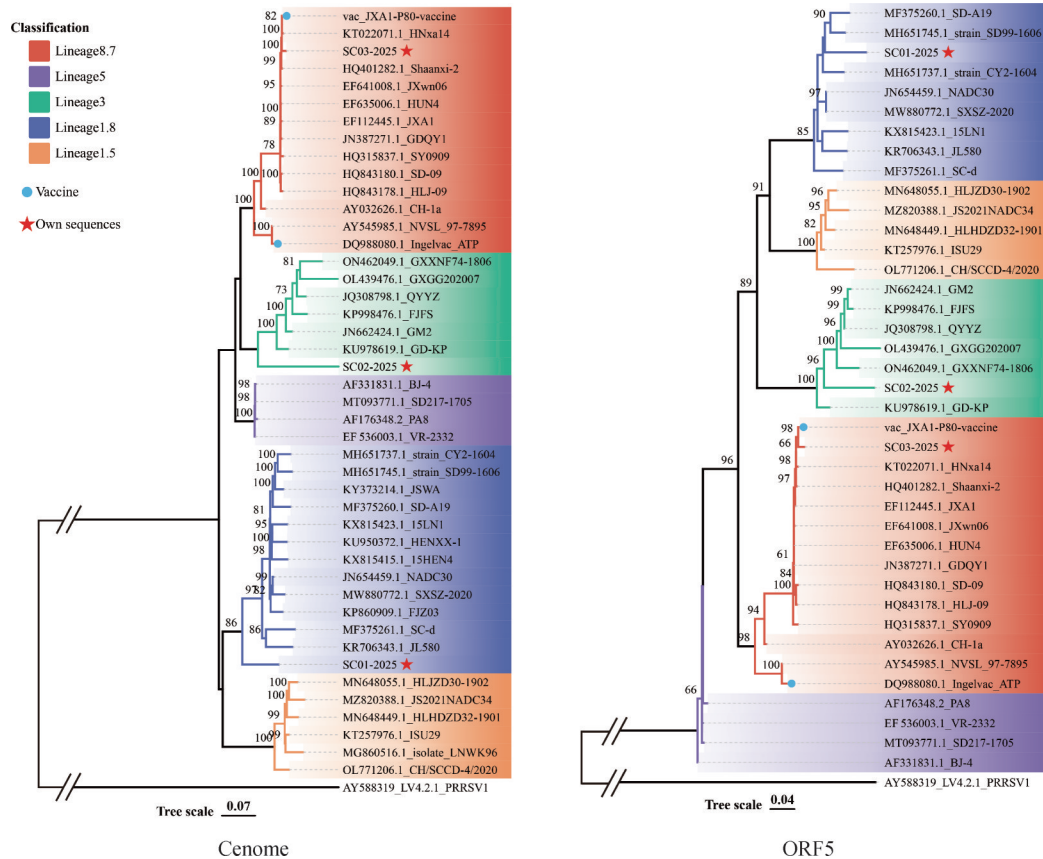
Different colored blocks represent the three distinct PRRSV-2 sequences assembled in this study (SC01-2025, SC02-2025, SC03-2025). Gaps within the blocks indicate genomic deletions in the respective strains, with “aa deletion” denoting amino acid deletions. The numerical values indicate the similarity percentage to the reference strain VR2332(EF536003.1). The colored bar at the bottom of the figure provides a schematic representation of the PRRSV genome structure

图1 测序所得PRRSV与VR2332(EF536003.1)株比对图

Fig. 1 Alignment of obtained PRRSV sequences with VR-2332(EF536003.1) strain

进化距离。值得注意的是,在ORF5基因的遗传进化树中,SC01-2025和SC02-2025株均与同谱系PRRSV参考株聚簇,但在全基因组遗传进化树中

两者却均各自形成了一个独立分支。这表明SC01-2025和SC02-2025株全基因组发生了较大的遗传变异,可能是基因重组所致。综上,样品中存在



基于测序所得3株PRRSV的全基因组(左)、ORF5基因(右)构建的最大似然发育树。测序所得PRRSV用红色★标识
Maximum likelihood phylogenetic trees were constructed based on the complete genomes (left) and ORF5 genes (right) of the three sequenced PRRSV strains. The sequenced PRRSV strains are marked with red stars (★)

图2 测序所得PRRSV系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the evolutionary relationships of sequenced PRRSV strains

PRRSV 三谱系混合感染, SC01-2025 和 SC02-2025 株可能存在重组事件, SC03-2025 可能为 JXA1-P80 疫苗株。

2.3 测序所得 PRRSV 相似性分析

使用 Megalign 将 3 株测序所得 PRRSV 分别与 PRRSV-2 常见谱系代表株 (NADC30 (MH500776.1)、NADC34 (MF326985.1)、QYYZ (JQ308798.1)、VR2332 (EF536003.1)、JXA1 (EF112445.1)) 的全基因组和各个区域进行相似性分析。结果显示, SC01-2025、SC02-2025、SC03-2025 与代表株的全基因组相似性范围分别为 81.60%~88.09%、80.49%~83.26%、80.60%~98.39%。其中, SC01-2025 与 NADC30 (MH500776.1) 株全基因组相似性最高为 88.09%, 但在其 NSP3、NSP4、NSP5、NSP6、NSP7、NSP9、NSP10、NSP11、NSP12 以及 ORF3 这些区域则与 VR2332 (EF536003.1) 株有最高的相似性; SC02-2025 全基因组与 NADC30

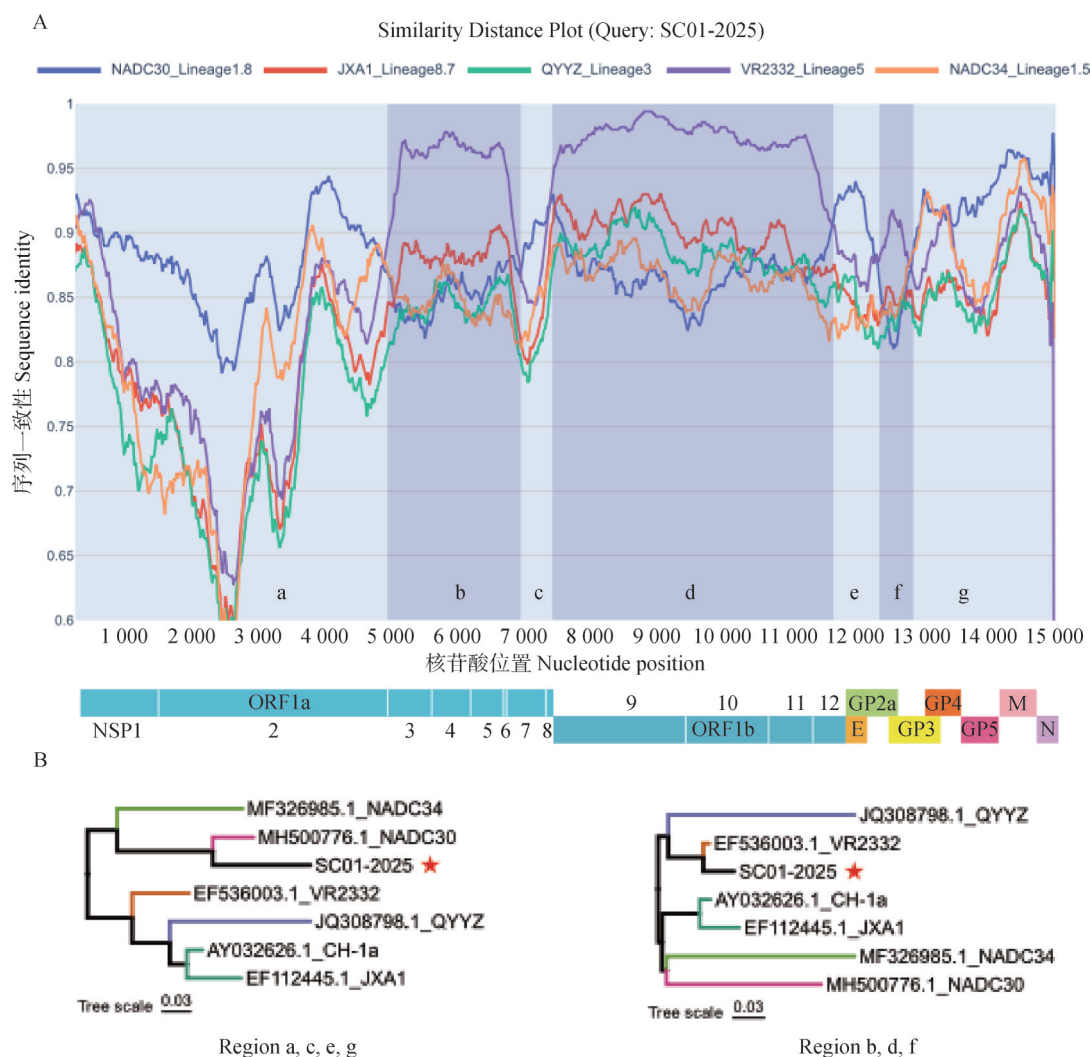
(MH500776.1) 株最相似, 但两者相似性仅为 83.26%, 其 NSP2 和 NSP3 区域与 NADC30 (MH500776.1) 株最相似, NSP1、NSP7、NSP8、NSP9、NSP10 与 JXA1 (EF112445.1) 株最相似, 剩下的区域则与 QYYZ (JQ308798.1) 株最相似; SC03-2025 全基因组与 JXA1 (EF112445.1) 株相似性最高为 98.39%, 而与 JXA1-P80 疫苗株 (由 JXA1 原始株经 Marc-145 细胞传代 80 次致弱获得) 相似性为 99%。这一差异表明, SC03-2025 更接近 JXA1-P80 疫苗株, 可能是疫苗株田间演化或传代积累变异的结果。根据以上结果进一步推测 SC01-2025 和 SC02-2025 可能存在基因重组事件, 而 SC03-2025 则为与 JXA1-P80 疫苗株高度同源的变异株。

2.4 测序所得 PRRSV 全基因组序列的重组分析

PRRSV 基因重组事件可能影响病毒的毒力和免疫逃逸, 对于病毒进化至关重要。为了进一步了

解该猪场 PRRSV 的重组特征,使用 RDP4 和 SimPlot 进行重组分析。结果显示 SC01-2025 和 SC02-2025 存在重组信号,而 SC03-2025 无重组事件发生。其中,SC01-2025 全基因组检测出 6 个重组断点,将其分为 7 个基因区域,a(1~5 276 nt)、b(5 277~7 302 nt)、c(7 303~7 831 nt)、d(7 832~11 902 nt)、e(11 903~12 711 nt)、f(12 712~13 196 nt)、g(13 197~15 023 nt)。对以上区域分别构建最大似然发育树,结果显示 a、c、e、g 基因区域与 NADC30 (MH500776.1) 株有最近的遗传距离,b、d、f 基因区域与 VR2332 (EF536003.1) 株有最近的遗传距离

(图 3)。SC02-2025 全基因组序列中共识别出 5 个重组断点,可分为 6 个基因区域,a(1~702 nt)、b(703~2 011 nt)、c(2 012~5 699 nt)、d(5 700~7 307 nt)、e(7 308~11 024 nt)、f(11 025~14 954 nt)。系统发育树结果显示,a、c 基因区域与 NADC30 (MH500776.1) 株有最近的遗传距离,b、e 基因区域与 JXA1 (EF112445.1) 株有最近的遗传距离,d、f 基因区域则与 QYYZ (JQ308798.1) 株有最近的遗传距离(图 4)。SC03-2025 中未检测到重组断点(图 5)。以上重组结果表明,SC01-2025 是以 NADC30 (MH500776.1) 株为病毒骨架与 VR2332

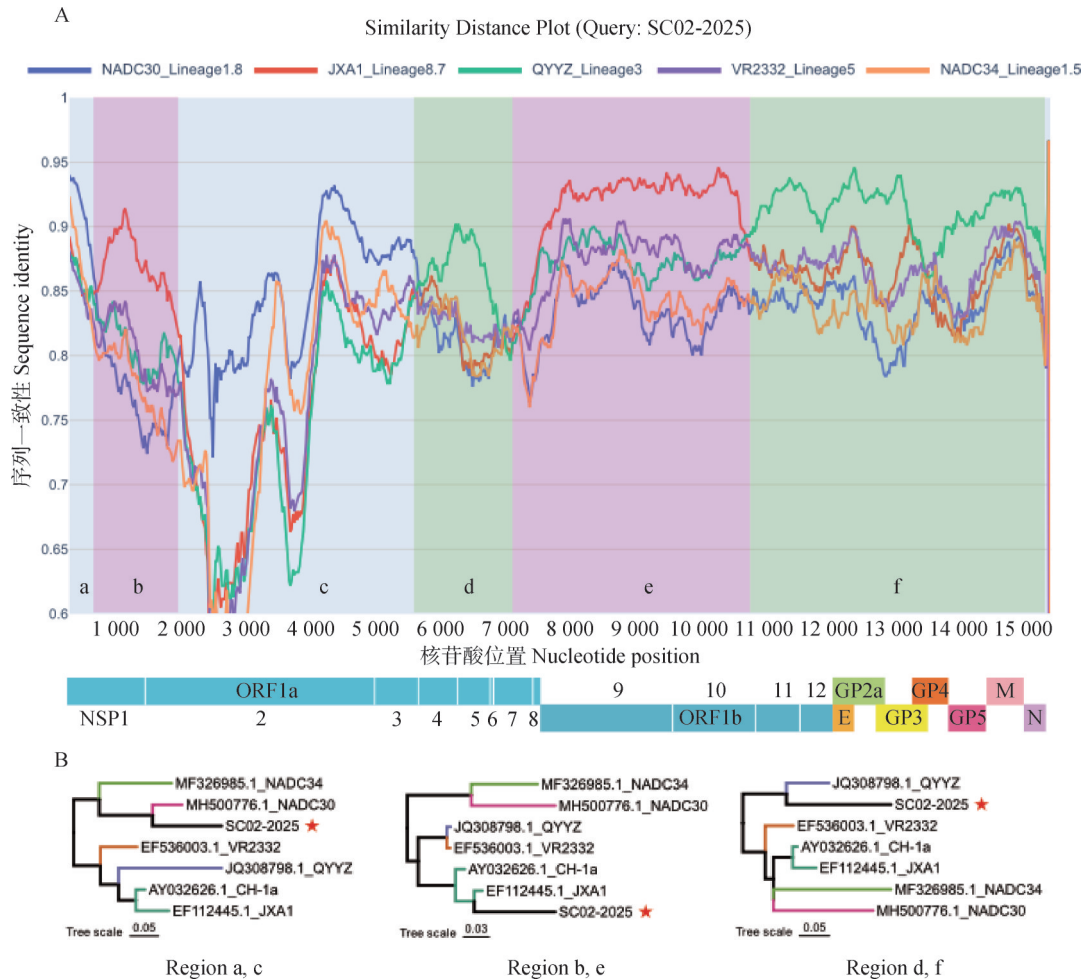


A. SimPlot 重组分析结果,图中彩色实线分别表示不同谱系的参考株,潜在重组区域采用差异颜色进行标识;B. 不同重组区域的遗传进化树,测序所得 PRRSV 用红色★标识

A. SimPlot recombination analysis results, with colored solid lines representing reference strains from different lineages and potential recombination regions highlighted in distinct colors; B. Phylogenetic trees of different recombinant regions, with the sequenced PRRSV strains marked by red stars (★)

图 3 SC01-2025 的基因重组分析

Fig. 3 Genetic recombination analysis of SC01-2025



A. SimPlot重组分析结果,图中彩色实线分别表示不同谱系的参考株,潜在重组区域采用差异颜色进行标识;B. 不同重组区域的遗传进化树,测序所得PRRSV用红色★标识

A. SimPlot recombination analysis results, with colored solid lines representing reference strains from different lineages and potential recombination regions highlighted in distinct colors; B. Phylogenetic trees of different recombinant regions, with the sequenced PRRSV strains marked by red stars (★)

图4 SC02-2025的基因重组分析

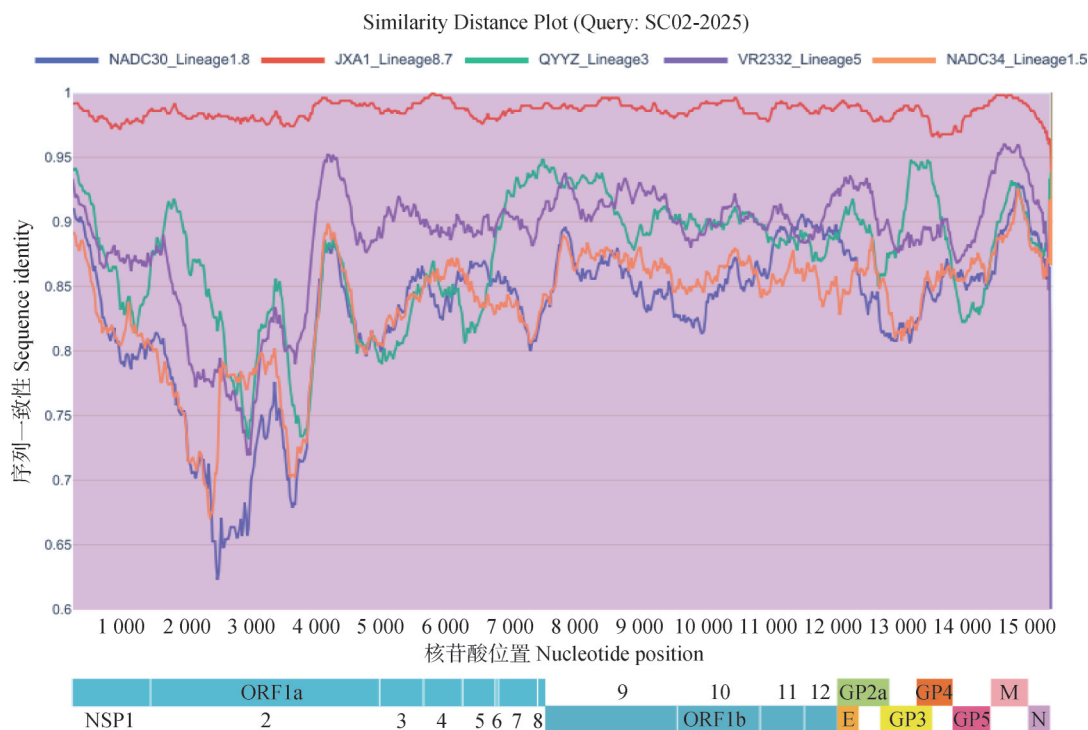
Fig. 4 Genetic recombination analysis of SC02-2025

(EF536003.1)株重组而成;SC02-2025为NADC30(MH500776.1)株、JXA1(EF112445.1)株和QYYZ(JQ308798.1)株发生复杂重组变异形成的三谱系重组株;SC03-2025未发生基因重组。

3 讨论

目前,我国主要以PRRSV-2流行为主,呈现出谱系1、谱系3、谱系5、谱系8多谱系共存的局面^[16]。PRRSV的长期潜伏和持续感染特性为多谱系混合感染和病毒重组提供了温床^[17]。本研究通过下一代测序技术(Next-generation sequencing, NGS)结合高通量平台开展宏转录组测序,成功在四川某猪

场的1份血清样品中获得PRRSV全基因组序列,并识别出该样品存在三谱系(谱系1.8/3/8.7)混合感染、重组株与疫苗株共存的现象。这一结果显示出该技术在PRRSV复杂感染情景鉴定中的应用价值。已有研究表明,当前猪场PRRSV多谱系混合感染存在普遍性^[18],导致临床防控难度加大,对猪场的生产造成严重危害^[19-21]。同时,基因重组促使新变异株的产生,并显著影响病毒毒力和病原学特性^[22-23]。我国PRRSV-2主要的重组谱系包括谱系1、谱系3和谱系8.7,其中,近80%的谱系1毒株参与了重组事件^[24],本研究得到的谱系1毒株也表现出高频重组特点,需要警惕由此引发的潜在流行风



SimPlot 重组分析结果,图中彩色实线分别表示不同谱系的参考株,潜在重组区域采用差异颜色进行标识

SimPlot recombination analysis results, with colored solid lines representing reference strains from different lineages and potential recombination regions highlighted in distinct colors

图5 SC03-2025 的基因重组分析

Fig. 5 Genetic recombination analysis of SC03-2025

险^[25-27]。因此加强对猪场 PRRSV 流行株全基因组的动态监测且及时明确 PRRSV 谱系和感染状态,对于制定精准防控方案、降低经济损失具有重要意义。

为了预防和控制 PRRSV 的传播和流行,自 2010 年以来,包括 JXA1(P80)、HuN4-F112(P120)和 TJM(P90)等在内的多种 HP-PRRSV 商业活疫苗被广泛使用,也由此引发了对疫苗株毒力返强和重组事件的担忧^[28-29]。有最新研究报道市面上常见的疫苗株 JXA1-P80 和 JXA1-R 出现了氨基酸突变导致毒力返强的现象^[30]。本研究中 SC03-2025 株与 JXA1-P80 疫苗株高度同源,通过宏转录组测序技术对其全基因组的测定,为监测疫苗株在田间的演化带来了全新的视角。本研究还发现疫苗株和野毒株共感染的情况。多株 PRRSV 的混合感染为病毒重组提供了温床,由疫苗株与田间野生型毒株产生的重组株的毒力和致病性可能会高于亲本毒株,从而引发猪场更加严重的生产损失^[31]。这要求人们持续监测和追踪猪群中毒株流行情况,从而采用合适的疫苗接种策略以尽量规避这些风险。

NGS(如 Illumina 和 MGI 等二代测序平台)通过短读长高通量测序,具有高准确率,低成本等优势,广泛应用于生态学、临床病毒学、畜牧兽医等研究领域^[32-34]。本研究采用 MGI 纳米球测序技术,通过单链环状 DNA 经滚环扩增(RCA)生成 DNA 纳米球(DNB),减少了扩增偏差,提高了测序均匀性和准确性。基于 NGS 平台的宏转录组测序在猪场疫情监测中展现出显著的优势,但其应用也面临特定挑战,尤其是猪场多病原和多毒株混合感染方面。宏转录组测序获得的数据庞大且复杂,目前,从测序数据组装基因组主要采用两种策略:有参拼接(reference-based assembly)和无参拼接(de novo assembly)。在混合感染样本分析中,使用有参拼接可能因不同菌/毒株的比例差异大,从而导致生成的一致性序列(consensus sequence)不准确。无参拼接不依赖参考基因组,能够更好地处理混合样本中的不同菌/毒株^[35]。通过无参拼接,可以生成每个株的独立基因组序列,从而避免因参考基因组偏差导致的错误。本研究采用无参考基因组(de novo)拼接和多 k -mer 迭代组装策略有助于优化组

装完整性和真实性,最终成功获得不同谱系 PRRSV 株的完整基因组,说明宏转录组测序在鉴别 PRRSV 不同谱系混合感染具有可行性。

总的来说,本研究充分利用宏转录组测序技术的无偏倚性和高分辨率优势,通过无参拼接成功在四川某猪场的单一样本中鉴定出 PRRSV-2 三谱系(谱系 1.8/3/8.7)混合感染及重组事件。通过解析 SC01-2025(双谱系重组)和 SC02-2025(三谱系重组)的复杂重组模式,为重组研究积累了全基因组数据。SC03-2025 与 JXA1-P80 疫苗株高度同源(99%),其与野毒株共存的局面提示了疫苗株田间重组的风险。这些结果充分证明了宏转录组测序技术突破传统 PCR 对多株 PRRSV 混合感染的检测局限,可实现全基因组层面的病毒特征解析,为优化免疫策略提供数据支撑,为提升猪群健康管理的检测效率和疫病防控净化提供精准的技术手段^[36]。同时,本研究也存在一定的局限性,首先,分析基于四川某猪场的单一份血清样本,虽然宏转录组测序技术在其中揭示了复杂的多谱系混合感染和重组事件,但难以反映该猪场 PRRSV 流行的全貌。其次,本研究仅在单一时间节点进行了采样和分析,未能追踪到 PRRSV 在该猪场的动态演变过程。这些因素限制了笔者对本次发现的重组株的来源、传播路径及其在猪场内流行病学意义的更深入解读。未来研究应扩大样本量、进行猪群纵向和横向监测,并结合流行病学调查,以更全面地评估 PRRSV 多谱系混合感染和重组的动态及其对猪群健康和生产的影响。

4 结 论

本研究利用宏转录组测序技术发现了四川某猪场单一样本中 PRRSV-2 多谱系混合感染的现象,阐明了样品中 PRRSV 的遗传进化特征,为 PRRSV-2 的防控提供了全基因组层面的数据支持。

参考文献(References):

- [1] RUEDAS-TORRES I, RODRIGUEZ-GOMEZ I M, SANCHEZ-CARVAJAL J M, et al. The jigsaw of PRRSV virulence [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 260: 109168.
- [2] DONE S H, PATON D J, WHITE M E. 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.
- [3] 孙 琪, 许 许, 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)
- [4] YIM-IM W, ANDERSON T K, PAPLOSKI I, et al. Refining PRRSV-2 genetic classification based on global ORF5 sequences and investigation of their geographic distributions and temporal changes [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(6): e291623.
- [5] 彭家为, 李 康, 张欲明, 等. 2022—2023 年广东省猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 和 Nsp2 基因的遗传变异分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2025(4): 86-94.
PENG J W, LI K, ZHANG X M, et al. Genetic variant analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF5 and Nsp2 genes in Guangdong Province from 2022 to 2023 [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2025(4): 86-94. (in Chinese)
- [6] 吕硕林, 于海丽, 王 彬, 等. 2021 年~2022 年山东部分地区猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传进化分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(12): 1207-1215.
LV S L, YU H L, WANG B, et al. Genetic evolution analysis of PRRSV in some areas of Shandong Province from 2021 to 2022 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 45(12): 1207-1215. (in Chinese)
- [7] LV C, ZHENG Y, LIU K, et al. Genetic variation and recombination analysis of PRRSV-2 GP3 gene in China from 1996 to 2023 [J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1435373.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 查 帆, 李倩文, 孙广禄, 等. 美洲型猪繁殖与呼吸综

- 合征病毒荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(7): 731-736, 749.
- ZHA F, LI Q W, SUN G L, et al. Establishment of a real-time PCR method for type 2 porcine respiratory and reproductive syndrome virus [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 44(7): 731-736, 749. (in Chinese)
- [11] TOPLAK I, RIHTARIČ D, HOSTNIK P, et al. Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests [J]. *J Virol Method*, 2012, 179(1): 51-56.
- [12] KUMAR K R, COWLEY M J, DAVIS R L. Next-generation sequencing and emerging technologies [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2024, 50(7): 1026-1038.
- [13] 李 跃, 张长春, 刘光裕, 等. 宏转录组测序技术在仔猪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)
- [14] 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.
- [15] YANG S, ZHANG D, JI Z, et al. Viral metagenomics reveals diverse viruses in tissue samples of diseased pigs [J]. *Viruses*, 2022, 14(9): 2048.
- [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] CAI H, ZHANG H, CHENG H, et al. Progress in PRRSV infection and adaptive immune response mechanisms [J]. *Viruses*, 2023, 15(7): 1442.
- [18] LI C, ZHAO J, LI W, et al. Prevalence and genetic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in commercial fattening pig farms in China [J]. *Porcine Health Manag*, 2024, 10(1): 5.
- [19] 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.
- [20] CHENG T Y, CAMPLER M R, SCHROEDER D C, et al. Detection of multiple lineages of PRRSV in breeding and growing swine farms [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 884733.
- [21] TREVISAN G, ZELLER M, LI G, et al. Implementing a user-friendly format to analyze PRRSV next-generation sequencing results and associating breeding herd production performance with number of PRRSV strains and recombination events [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(5): e2214-e2229.
- [22] WANG H, CUI X, CAI X, et al. Recombination in positive-strand RNA viruses [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 870759.
- [23] CUI X, XIA D, LUO L, et al. Recombination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: features, possible mechanisms, and future directions [J]. *Viruses*, 2024, 16(6): 929.
- [24] CUI X, XIA D, HUANG X, et al. Analysis of recombinant characteristics based on 949 PRRSV-2 genomic sequences obtained from 1991 to 2021 shows that viral multiplication ability contributes to dominant recombination [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(5): e293422.
- [25] CHANG H, GAO X, WU Y, et al. Genomic and pathogenicity analysis of two novel highly pathogenic recombinant NADC30-like PRRSV strains in China, in 2023 [J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12(10): e36824.
- [26] REN J, TAN S, CHEN X, et al. Characterization of a novel recombinant NADC30-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Shanxi Province, China [J]. *Vet Res Commun*, 2024, 48(3): 1879-1889.
- [27] OUYANG Y, DU Y, ZHANG H, et al. Genetic characterization and pathogenicity of a recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain in China [J]. *Viruses*, 2024, 16(6): 993.
- [28] JIANG Y F, XIA T Q, ZHOU Y J, et al. Characterization of three porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates from a single swine farm bearing strong homology to a vaccine strain [J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3-4): 242-249.
- [29] LIU J, ZHOU X, ZHAI J, et al. Recombination in JXA1-R vaccine and NADC30-like strain of porcine

- reproductive and respiratory syndrome viruses[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 204: 110-120.
- [30] WU W, LIN L, YE Z, et al. A vaccine revertant of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus: re-emergence after lurking for 12 years [J]. *Microbiol Spectr*, 2025: e72825.
- [31] XIANG L, XU H, LI C, et al. Long-term genome monitoring retraces the evolution of novel emerging porcine reproductive and respiratory syndrome viruses [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 885015.
- [32] TAN B, NG C, NSHIMYIMANA J P, et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1027.
- [33] WANG X, STELZER-BRAID S, SCOTCH M, et al. Detection of respiratory viruses directly from clinical samples using next-generation sequencing: A literature review of recent advances and potential for routine clinical use[J]. *Rev Med Virol*, 2022, 32(5): e2375.
- [34] WU Q, LI J, WANG W, et al. Next-generation sequencing reveals four novel viruses associated with calf diarrhea[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 1907.
- [35] SOHN J, NAM J. The present and future of de novo whole-genome assembly[J]. *Brief Bioinform*, 2018, 19(1): 23-40.
- [36] 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 白永平)