深度测序技术在畜禽疫病诊断中的应用

张 立
（榆树市环城乡综合服务中心，吉林 榆树 130400）

摘 要：下一代测序（NGS），也被称为深度、高通量或大规模并行测序，可一次同时测定几十万到几百万条核酸分子序列。在畜禽疫病中应用于复杂诊断和密集监测、病因学、基因组学、进化和流行病学，以及宿主—病原体相互作用和感染生物学等方面。本综述首先简要介绍了深度测序技术，并通过实例对深度测序在畜禽疫病诊断中的应用进展进行阐述，为今后的相关研究提供些许参考。

关键词：深度测序技术；畜禽疫病；诊断；应用
［**中图分类号**］ S854.4 ［**文献标识码**］ A ［**文章编号**］ 1004-6704(2024)01-0118-04

Application of Deep Sequencing Technology in Diagnosis of Livestock and Poultry Diseases

ZHANG Li
(*Yushu City, Changchun City, Jilin Province, urban and rural comprehensive Service Center, Yushu Jilin* 130400, *China*)

Abstract: Next generation sequencing (NGS), which is also known as deep, high-throughput or massively parallel sequencing. It can simultaneously determine the sequences of hundreds of thousands to millions of nucleic acid molecules at one time. Applications in livestock and poultry diseases include complex diagnosis and intensive surveillance, etiology, genomics, evolution and epidemiology, as well as host-pathogen interactions and infection biology. This review first briefly introduces deep sequencing technology, and explains the application progress of deep sequencing in the diagnosis of livestock and poultry diseases through examples. This provides some reference for future related research.

Key words: deep sequencing technology; livestock and poultry diseases; diagnosis; application

近几十年来，畜禽疫病的经典直接诊断方法，即病毒分离或细菌培养后鉴定病原体特性，有逐渐被一系列新的分子技术取代的趋势。后者可以在含有病毒或细菌核酸或蛋白质等成分的临床样本中检测到感染因子。测定核苷酸序列的方法被称为“测序技术”。20 世纪 70 年代电泳法用于 DNA 测序的引入使获取基因序列信息成为可能，基于双脱氧链终止技术的桑格测序迅速成为 DNA 测序的首选方法。

Sanger 测序代表了测序技术的“第一代”，而由于对哺乳动物大基因组测序更快、更便宜方法的需求不断增长，2005 年，以罗氏 454、Illumina Solex、ABI Solid sequencer 为代表的“第二代”高通量测序发展起来，可以同时对几十万、上百万条 DNA 分子进行测序。2019 年开始，以实时单分子为特点的三代测序技术兴起，如 Pacbio SMRT 及牛津纳米孔单分子测序仪。第二、三代测序技术统称为深度测序（deep sequencing），又称高通量测序（High-Throughput Sequencing）、下一代测序（Next Generation Sequencing，NGS）。上述的不同技术平台均有其独特的测序方法，但大多数都有相同的总体策略，即在固体支持基质上克隆扩增 DNA 模板，然后通过大规模并行测序反应的循环过程进行测序。

1 深度测序技术

NGS 在检测和发现新型病原体方面显示出了巨大潜力，包括已知感染向新领域的传播和/或完全新颖的“未知”病原体的出现。与之前的技术不同，NGS 不存在偏倚，能反馈出原始样本中存在的大多数核苷酸序列。然而，与早期技术一样，其检测下限最终仍取决于病原体相对于宿主背景物质的丰度。NGS 技术的持续发展，也在继续提高检测低拷贝数病原体的可能性。此外，采样、样品制备和富集方案都对基于 NGS 的诊断结果有显著影响。

［**收稿日期**］ 2023-05-08
［**作者简介**］ 张立（1974-），男，吉林长春市人，本科，兽医师，主要从事工作为基层动物防疫，E-mail：zhangli1974@163.com

图 1　使用高通量测序检测病原体的工作流程

2005 年 Margulies M 等人发表在 Nature 上的一篇文献中介绍了一种使用单个孔的新型光纤载玻片，能够在一次四小时的运行中以 99%甚至更高的精度对 2 500 万个碱基进行测序的系统，下图是测序系统样品制备流程。

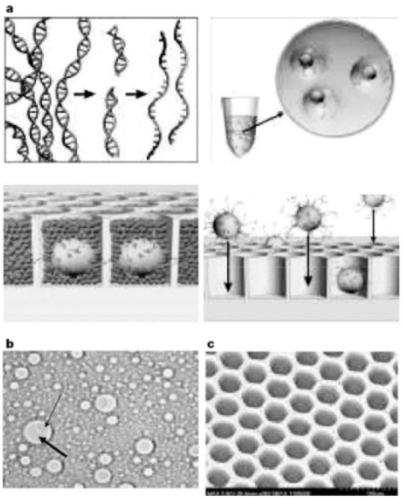

图 2　深度测序样品制备流程

(A)从左上角顺时针方向：(i)基因组 DNA 被分离，片段化，连接到适配器并分离成单链；(ii)片段与单个磁珠结合，珠子被捕获在油乳剂中的 PCR 反应混合物的液滴中，然后在每个液滴中进行 PCR 扩增，每个珠粒携带一千万份特异性的 DNA 模板；(iii)乳液破裂，DNA 链变性，携带单链 DNA 克隆的珠子沉积到光纤载玻片的孔中；(iv)将携带焦磷酸盐测序所需的固定化酶的较小珠子沉积到每个孔中。(B)乳液的显微镜照片，显示含有珠子的液滴和空液滴。细箭头指向 28μm 珠子，粗箭头指向约 100μm 液滴。(C)光纤载玻片部分的扫描电子显微镜图片，显示了磁珠沉积前的光纤包层和孔。

2　NGS 在畜禽疫病诊断方面的具体应用实例

现阶段，畜禽疫病面临着老病多发、新病频发、未病不能先知的复杂局面。病原检测需要快速、高通量、精准、实际，才能满足高度工业化养殖模式下的疫病防控需要。疫病的监测需要了解全病原谱的感染与传播动态。NGS 的应用和发展为畜禽疫病诊断提供了巨大帮助，具体应用实例如下。

2.1　健康猪群的大规模精准监测

军事科学院涂长春团队通过病毒宏基因组以及 NGS 技术建立了迄今为止最全面的猪病毒组数据库 Pigs_VIRES，涵盖 66 个科 249 个病毒属的 96 586 个病毒基因，将全球猪病毒组基因库扩大近三倍。并首次提出了病毒组的“精准监测”模式，用于猪病毒病的精准监测与排查。

2.2　复杂疾病的各种感染因子排查

在针对多病原混合感染导致的疾病诊断方面，NGS 不需要了解可疑感染病原的特征，即可以检测出样本中包含的大部分核酸。研究人员采集患有仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)的猪以及健康猪的淋巴结进行病毒组学研究。猪圆环病毒 2 型(PCV2)是公认的 PMWS 主要病原因子，但研究结果患有 PMWS 猪在 PCV2 高背景下也发现了其他病毒，包括一种猪瘟病毒，与 2015 年在美国发现的非典型猪瘟病毒高度相似，以及一些小核糖核酸病毒，类圆环病毒、博卡病毒等，通过对患病猪和无症状猪的分析，证实了 PMWS 也与这些病毒有关，并且各种感染因子可能存在协同作用。

2.3　新病原体的发现

2011 年，在德国施马伦贝格镇附近的一个农场，对发热和产奶量降低的三份牛血浆样本的 RNA 文库进行重复测序，获得了 22 个病毒的特异性序列，通过 Sanger 测序和细胞培养分离物的 NGS 来填补一些序列空白。经序列比较分析和系统发育研究，该病毒为正布尼亚病毒属的 Shamonda 样病毒，将其命名为施马伦伯格病毒(Schmallenberg，SBV)。随后，SBV 在西欧国家的反刍动物中大规模流行，临床特征是流产和新生儿先天性畸形 15。可见，深度测序技术在鉴定未知病毒方面发挥了重要作用。

2.4　研究宿主一病原体相互作用关系

猪繁殖和呼吸综合征(PRRS)一直是影响全球养猪业的最重要的经济疾病之一，每年造成巨大的经济损失，利用高通量测序技术可以帮助了解宿主对病毒感染的反应机制，进一步了解感染病理学。Xiao 等人首次使用 Illumina 深度测序技术对经典北美型 PRRSV(N-PRRSV)毒株 CH-1a 感染的全基因组宿主转录反应进行研究，并系统地分析了 N-PRRSV 感染后肺基因表达谱与感染病理学之间的关系。结果表明，N-PRRSV 通过多种方式在感染猪中复制和传播，包括破坏宿主先天免疫反应，诱导

抗凋亡和抗炎状态以及发展抗体依赖性增强(ADE)。

2.5 监测疾病暴发和传播途径

NGS可以作为研究畜禽疾病暴发的重要工具,通过确定和跟踪传播途径,提高感染源的可追溯性。2020年10月至2021年6月期间,H5Nx亚型高致病性禽流感(HPAI)病毒在荷兰的家禽、圈养鸟类和野生鸟类中引起疫情。基于NGS的全基因组比较分析,研究人员在33种死亡野生鸟类中分析143种病毒的全基因组序列,结果表明高致病性禽流感病毒主要为H5N8亚型。遗传分析表明,在荷兰发生了多次独立引入HPAI H5N8病毒,随后可能在当地传播,而家禽中的暴发可能是由野鸟的迁徙引入的。

2.6 病毒种群内和种群间遗传多样性的特征评估

NGS为描述病毒准种的突变谱开辟了新的可能性,而下一代测序和复杂的生物信息学工具的进步已经能够检测到低频变异。Andino和Domingo的综述回顾了通过NGS了解病毒种群动态,特别是"突变谱内的相互作用,以及适应度景观对病毒适应和去适应的影响"18。共存的病毒亚群对疾病发展的影响也进行了评估,根据Lu等人的研究,基于NGS的病毒变异全基因组比较已经确定了PRRSV的功能重要区域,此外,从不同基因型毒株中获得的进化变异为病毒发育组学提供了有用信息。

2.7 新发传染病防控关口前移

有研究团队在2017年至2021年期间,对中国20个省份野味动物病毒病原体进行了原转录组学分析。完整的样本收集涉及5个哺乳动物类群,包括果子狸、穿山甲、豪猪、刺猬在内的18个物种的1 941只动物,采集呼吸道和粪便样本。在鉴定到的102种脊椎动物相关病毒中,21种病毒被认定为"高危"病毒。其中果子狸携带的潜在高风险病毒数量最多,且这些"高危"病毒在不同野味动物中存在频繁的跨物种传播现象。研究人员在果子狸和亚洲獾中发现了甲型禽流感病毒H9N2,后者表现出呼吸道症状,并可能存在人向野生动物传播的情况。基于深度测序技术的研究强调了野味动物作为人畜共患病潜在驱动因素的重要性,为那些可能导致下一次大流行或动物流行病的野味动物及其病毒提供了重要的见解。

3 深度测序和在疾病诊断的前景

传统诊断方法和深度测序技术各有优缺点,传统诊断方法如病毒分离可以获得有价值的毒株,对于感染生物学研究,开发新疫苗和免疫治疗产品至关重要,但缺点是无法分离、检测在现有细胞培养系统中不能增殖的病毒,且耗时相对长。NGS技术的检测范围广,不需要对病原体进行分离培养,不需要设计目的序列的针对性引物,不依赖病原体遗传背景,但其也有一定局限性,即不能获得分离毒株,且其运行设备及试剂耗材的价格高昂,后期数据分析要求有丰富的生物信息学经验,以及NGS研究方法的标准与序列数据生成、分析、注释和报告流程规范的缺失和不完善,极大地限制了NGS在兽医临床的广泛应用22。在未来,需要研制成本更低的设备,开发价格更低的配套试剂和耗材,同时提高用户友好性和诊断实验室的可访问性,使非专业用户更方便对测序结果进行分析23。

无可置疑,NGS已经给兽医临床工作带来了巨大的变革。相信随着成本的降低和技术的改进,NGS技术在兽医临床中会成为必不可少的诊断工具并发挥举足轻重的作用,提高疾病诊断效率,促进养殖行业的健康发展。

参考文献:

[1] MAXAM AM, GILBERT W. A new method for sequencing DNA[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(2):560-564.

[2] SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(12):5463-5467.

[3] ROTHBERG JM, LEAMON JH. The development and impact of 454 sequencing[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(10):1117-1124.

[4] QUAIL MA, SMITH M, COUPLAND P, *et al*. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers[J]. BMC Genomics, 2012, 13:341.

[5] SHENDURE J, PORRECA GJ, REPPAS NB, *et al*. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome[J]. Science, 2005, 309(5741):1728-1732.

[6] EID J, FEHR A, GRAY J, *et al*. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Science, 2009, 323(5910):133-138.

[7] KARLE J. Antisense studies of brain GABAA receptors[J]. Dan Med Bull, 2002, 49(2):130-144.

[8] MARGULIES M, EGHOLM M, ALTMAN WE, *et al*. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. Nature, 2005, 437(7057):376-380.

[9] CHEVAL J, SAUVAGE V, FRANGEUL L, *et al*. Evaluation of high-throughput sequencing for identifying known and unknown viruses in biological samples [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9):3268-3275.

[10] DALY GM, BEXFIELD N, HEANEY J, *et al*. A viral discovery methodology for clinical biopsy samples utilising massively parallel next generation sequencing[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28879.

[11] HE B, GONG W, YAN X, *et al*. Viral Metagenome-Based Precision Surveillance of Pig Population at Large Scale Reveals Viromic Signatures of Sample Types and Influence of Farming Management on Pig Virome[J]. mSystems, 2021, 6(3): e0042021.

[12] BLOMSTR? M AL, BELáK S, FOSSUM C, *et al*. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome[J]. Virus Res, 2009, 146(1-2):125-129.

[13] BLOMSTR? M AL, FOSSUM C, WALLGREN P, *et al*. Viral Metagenomic Analysis Displays the Co-Infection Situation in Healthy and PMWS Affected Pigs[J]. PLoS One, 2016, 11(12):e0166863.

[14] BEER M, CONRATHS FJ, VAN DER POEL WH. 'Schmallenberg virus'--a novel orthobunyavirus emerging in Europe[J]. Epidemiol Infect, 2013, 141(1): 1-8.

[15] HOFFMANN B, *et al*. Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011[J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18: 469 – 472.

[16] XIAO S, JIA J, MO D, *et al*. Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing[J]. PLoS One, 2010, 5(6):e11377.

[17] ENGELSMA M, HEUTINK R, HARDERS F, GERMERAAD EA, *et al*. Multiple Introductions of Reassorted Highly Pathogenic Avian Influenza H5Nx Viruses Clade 2. 3. 4. 4b Causing Outbreaks in Wild Birds and Poultry in The Netherlands, 2020-2021 [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2):e0249921.

[18] ANDINO R, DOMINGO E. Viral quasispecies[J]. Virology, 2015, 479-480:46-51.

[19] TAN S, DVORAK CMT, MURTAUGH MP. Rapid, Unbiased PRRSV Strain Detection Using MinION Direct RNA Sequencing and Bioinformatics Tools[J]. Viruses, 2019, 11(12):1132. Published 2019 Dec 7.

[20] HE WT, HOU X, ZHAO J, *et al*. Virome characterization of game animals in China reveals a spectrum of emerging pathogens[J]. Cell, 2022, 185 (7):1117-1129. e8.

[21] SHIVAPRAKASH KN, SEN S, PAUL S, *et al*. Mammals, wildlife trade, and the next global pandemic[J]. Curr Biol, 2021, 31(16):3671-3677. e3.

[22] BARZON L, LAVEZZO E, COSTANZI G, *et al*. Next-generation sequencing technologies in diagnostic virology[J]. J Clin Virol, 2013, 58(2):346-350.

[23] RAVI RK, WALTON K, KHOSROHEIDARI M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1706:223-232.

[24] SLATKO BE, GARDNER AF, AUSUBEL FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies [J]. Curr Protoc Mol Biol, 2018, Apr;122(1): e59.

[25] 伍钢，韦佳塔，张玉雪，等. 高通量测序技术在兽医临床中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(1): 130-135.

[26] BELáK S, KARLSSON OE, LEIJON M, *et al*. High-throughput sequencing in veterinary infection biology and diagnostics[J]. Rev Sci Tech, 2013, 32 (3):893-915.

[27] GRANBERG F, BáLINT á, BELáK S. Novel technologies applied to the nucleotide sequencing and comparative sequence analysis of the genomes of infectious agents in veterinary medicine[J]. Rev Sci Tech, 2016, 35(1):25-42.

（上接第117页）

律法规、执业道德等培训，确保宠物诊疗机构在诊疗活动中，更加健康、更加专业，为宠物医疗提供更高服务水平。

4.3.2　建议建立宠物诊疗行业标准　基于本地实际情况出台确实可行的宠物诊疗收费、药价标准或者用药指导价格（应由物价部门核准），让广大宠物饲养者能够做到“明白消费”、“清楚消费”，避免出现收费高、乱收费的现象，切实满足宠物医疗的需要。

5　加强对宠物诊疗的监管是宠物经济健康发展的保证

总之，十分必要采取有利措施加强对宠物诊疗行业的监管，积极规范宠物诊疗秩序，不仅有助于动物疫病防控，充分保障宠物主的合法权益，更有利于本地区宠物经济的健康发展。