



中国科协学会学术部 编

新

观点新学说学术沙龙文集

64

传染病病原快速鉴定 与溯源新技术的探索与挑战



中国科学技术出版社
CHINA SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

新观点新学说学术沙龙文集⑥4

传染病病原快速鉴定与 溯源新技术的探索与挑战

中国科协学会学术部 编

中国科学技术出版社

· 北 京 ·

图书在版编目(CIP)数据

传染病病原快速鉴定与溯源新技术的探索与挑战 / 中国科协
学会学术部编. —北京: 中国科学技术出版社, 2013. 5

(新观点新学说学术沙龙文集; 64)

ISBN 978 - 7 - 5046 - 6360 - 3

I. ①传… II. ①中… III. ①传染病 - 病原微生物 -
鉴定 IV. ①R183

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 118403 号

选题策划 赵 晖
责任编辑 赵 晖 夏凤金
责任校对 孟华英
责任印制 张建农

出 版 中国科学技术出版社
发 行 科学普及出版社发行部
地 址 北京市海淀区中关村南大街 16 号
邮 编 100081
发行电话 010 - 62173865
传 真 010 - 62179148
投稿电话 010 - 62103182
网 址 <http://www.cspbooks.com.cn>

开 本 787mm × 1092mm 1/16
字 数 200 千字
印 张 8.75
印 数 1—2000 册
版 次 2013 年 6 月第 1 版
印 次 2013 年 6 月第 1 次印刷
印 刷 北京长宁印刷有限公司

书 号 ISBN 978 - 7 - 5046 - 6360 - 3/R · 1668
定 价 18.00 元

(凡购买本社图书, 如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责调换)

序

人类文明的进程与钢铁、武器发展和病原进化密不可分,我们在与传染病斗争的过程中,逐步掌握了防控传染病的手段。20世纪60年代,显微镜的发明使得我们能够观察到微生物,培养基技术的发明使得我们能够获得微生物,消毒和种痘技术的发展使我们掌握了与疾病斗争的手段。

我们迈入了科技迅速发展的21世纪之际,传染病仍然是世界范围内引起人类死亡的首要原因,而且在全球范围内面临着“老传染病持续存在、曾一度被控制传染病又死灰复燃、新传染病不断出现、已知病原的耐药性急剧增加”等严峻挑战。这与人口增加和行为变化、技术和工业的发展、经济发展和土地使用、国际旅行和贸易、微生物适应与变化和公共卫生措施的削弱等因素密切相关。因此,WHO总干事在《1996年世界卫生报告》中告诫:“我们正处于一场传染性疾病全球危机的边缘,没有哪一个国家可以幸免,也没有哪一个国家可以高枕无忧。”

中国科协第64期新观点新学说学术沙龙选择“传染病病原快速鉴定与溯源新技术的探索与挑战”为主题,由中华医学会承办,邀请了国内传染病研究领域的30余位专家参会。针对传染病病原的快速鉴定和溯源展开了热烈讨论。

新发和突发传染病不仅严重威胁着人类的健康,影响着经济的发展,还会对社会稳定和国家安全造成威胁。因此,国内外在法规建设、组织管理、传染病监测、传染病通报、资源运作、科技支撑和交流合作等方面都采取了有效的措施。但在面对一个新发突发疫情时,我们首先要回答的问题是“病因是什么”和“病原哪儿来的”的问题,这就是本次学术沙龙的核心:病原的快速鉴定与溯源。

针对已知病原,我们已经建立了一套基于免疫和核酸检测的技术平台,在实验室可以顺利完成病原的分离与鉴定,而如何在现场快速检出和鉴定病原,仍然是个挑战,亟须这方面技术的发展与规范化。对于病原的溯源,我们过去

一直用分子流行病学技术分析,但在美国 2001 年的炭疽芽孢白色信件恐怖袭击后,要求我们从采样、分析、报告等环节都要符合法律途径,已将分析结果作为呈堂证供惩治罪犯,这就催生了“微生物法医学”这个新学科的诞生。与人类法医学建立了人指纹图谱数据库一样,微生物法医学的发展也需要建立基于全球的菌株或毒株的指纹数据库。随着目前核酸测序技术的飞速发展,我们已经具备了建立病原核酸序列多态性数据库的条件。如何构建这样一个覆盖全球病原的数据库,需要政府、法律、微生物学专业不同领域人员的合作,发明一种合作共享机制就成为该数据库可否成功建立的关键。

现实挑战的需求以及技术的进步都给我们提供了对病原快速鉴定和溯源研究的前所未有的机遇,与会代表达成了重要共识:加强快速检测和鉴定新技术,尤其是现场应用技术的研发及其标准化尤为重要,侧重传染病病原发生和自然演化机制的研究,为传染病病原溯源奠定基础,并且还需要建立一种开放、合作与共享的机制,培养一支训练有素和经验丰富的队伍,全面提升我国传染病的防控能力和国际地位。

杨瑞毅

2012 年 12 月 31 日

倡导自由探究

鼓励学术争鸣

活跃学术氛围

促进原始创新

目 录

高通量核酸测序技术在应对新发、突发传染病中的作用 ...	杨瑞馥(2)
再测序芯片技术的建立和初步应用	马学军(10)
标本及菌毒株资源在传染病预防和控制中的作用	景怀琦(13)
自然的还是人为的:传染病防控的又一挑战	舒跃龙(18)
浙江省病原微生物溯源研究进展	陈直平(23)
百日咳——传染病监测中的病例定义研究	邵祝军(30)
CDC 细菌性传染病监测需要什么样的分子分型技术	阚 飙(35)
分子分型在流脑监测中的作用	周海健(50)
中国乙脑流行现状及乙脑病毒分子溯源	王环宇(55)
HIV 耐药突变检测	张晓光(60)
食源性疾病的快速诊断和溯源	扈庆华(63)
基于熔解曲线分析的 MLST	李庆阁(70)
肠道传染病病原快速鉴定与溯源技术探索	夏胜利(73)
小肠结肠炎耶尔森菌病原学监测设计思路与拓展	王 鑫(77)
军团菌病和军团菌的检测及监测	秦 天(85)
基层 CDC 微生物实验室在传染病防治实践和科研中的 作用	潘劲草(93)
规范化、标准化传染病病原菌检测的初步想法	陈道利(97)

关于病原微生物分子流行病学的几点思考 朱叶飞 (105)

专家简介 (112)

部分媒体报道 (121)



会议时间

2012 年 10 月 13 日上午

会议地点

金地大酒店第一会议室

主持人

阚 飙

今天,召开中国科协第 64 期新观点新学说学术沙龙,沙龙的议题就是“传染病病原快速鉴定与溯源新技术的探索与挑战”,与会代表都是从事传染病防控和研究的资深专家,在某些方面都具有独特思想。我们的沙龙特点就是自由发言,马上就进入主题,首先由军事医学科学院杨瑞馥教授做《高通量核酸测序在应对新发、突发传染病中的作用》的报告。



高通量核酸测序技术在应对新发、突发传染病中的作用

◎ 杨瑞馥

测序技术给我们带来两大进步。一个是我们认识到生命是序列的,而且这个序列可以转化为数字,所以可以用计算机来计算生命。随着测序技术的发展,从过去的通量非常低、价格非常高的手工测序,发展到现在的高通量、价格非常低的新一代测序技术,所以我们现在有能力去大量测定人的基因组,测了以后我们会做以前不敢做的事情。目前在市场上比较流行的三种新一代高通量测序技术,现在已发展到第三代测序技术,此处不再赘述其原理。

高通量核酸测序技术发展这么快,我们可以在短期内快速获得大量序列。在这种大的背景下,微生物学如何去做呢?在面对新发、突发传染病的情况下,我们要研究疾病是怎么引起的,就是快速准确鉴定的问题。再一个是如何有效治疗,要了解致病特征和治疗药物的选择。同时,获得了这些信息以后,亟须考虑的是如何控制传染病,就是需要准确溯源,只有找到源头在哪里,才可以对传染病进行有效的控制。

这三个重要的问题都可以通过高通量测序来回答。这里举一个例子:2011年德国大肠杆菌 O104:H4 暴发,从最原始的暴发到处置结束,大概三个月的时间。在这种情况下,在5月28日收到了德国寄来的DNA标本后,我们与深圳华大基因研究院一起,首先用第三代测序技术于6月2日获得了原始数据,这个原始数据直接公布到网上。利用这些数据,我们和英国 Nick 博士很快公布了组装结果,经过大量的分析,获得了大量的基因组转移、致病相关基因和耐药与抗性基因等情况。在这个过程中就发展了一种应对突发疫情的新机制,即开源基因组学。过去的做法是,一个或几个研究小组拿到标本以后,将其作为一



种重要资源,不会很轻易让人来分享,只有文章发表后才会公布序列与国内外同行分享;我们做的机制是拿到基因组原始数据后实时公布到网上,我们自己还没有分析,就供全球科学家下载分享。截至 2011 年 6 月底,序列被下载近 15000 次,也获得了各个国家专家的分析报告 60 多份,我们再综合全球的分析,获得结论。通过这个合作,我们把有突出贡献的人列为共同第一,参与实验室的课题负责人一起作为共同通讯作者共同发表。在这些作者当中,大部分人都没有见过面,只用两个月的时间把数据公布发表。同时,因为有大量的人员参加,我们又筛选了一些贡献比较大的人员列到附件里面,作为工作小组成员,承认他们对大肠杆菌的测序工作的贡献。

2012 年在英国出现的类似 SARS 的病毒,迫于舆论和各国的压力,英国仅公布了部分结果,没有把全部结果无条件地放到网上让全球科学家共享。如果实施开源基因组学共享机制,全球科学家都知道序列,就会很快建立应对措施。所以,也希望全球科学家继续达成共识,将这个新机制发扬光大。

再举一个例子,2010 年海地地震以后发生的霍乱。截至 2011 年 1 月造成 17 万人感染,3000 多人死亡。有一个说法说霍乱是由美国部队的救援人员从尼泊尔到海地救援的时候把细菌带来的,但是一直没有 100% 的证据,都是新闻媒体报道。美国一个研究小组收集了尼泊尔的菌株和海地暴发的菌株,通过全基因组序列鉴定,可以清晰地看到,尼泊尔的和海地的差异非常小,只有一两个 SNPs 差异。该工作 100% 给出了证据,即海地霍乱暴发菌株的确来自尼泊尔,至于是不是美军带过去的,还需要其他的证据,要考虑是不是从美国的士兵拿到这个病原进行分析,就是 100% 的证据。英国 SANGER 测序中心把第七次霍乱大暴发菌株进行了测序,分析了耐药情况和一些毒力基因的情况等,通过遗传发育分析可以清楚地看到三个阶段:第一个阶段 60 年代之前,在使用这两个抗生素之前,细菌没有耐药性,使用之后,耐药性现在逐渐达到了 100%,霍乱菌株都携带这两个抗生素的耐药基因,同时勾勒了第七次霍乱大流行全球的传播路线。

再举一个例子,美国一个实验室鼠疫的感染,这位老先生 60 岁了,马上就退休,但是发现感染了肺鼠疫,住院后很快就死亡了,但是他在实验室做的菌株是一个弱毒,是一个疫苗株,对人 不致病。但通过测序鉴定,他感染的菌株和实



实验室的菌株是 100% 一样的,也就是说这起感染是由实验室的弱毒株所致的,为什么能感染呢? 后来解剖学证明,他患有高铁血症,我们都知道,细菌侵入机体后需要和机体竞争铁离子才能生存,弱毒株就是缺失了编码夺铁能力的基因片段,但该患者患有高铁血症,血液中有足够的自由铁离子供细菌生长,因此,在实验室操作弱毒株也要注意生物安全问题。继续讲一个鼠疫的例子,我们和爱尔兰、美国、法国一些实验室合作,通过测序和 SNPs 分析来追踪历史上鼠疫三次大流行的研究。我们分析证明,第三次大流行是从我国传出后,通过商贸传播到世界各地。第二次大流行和丝绸之路相关;文献也有报道,炭疽和麻风病等的传播都和丝绸之路相关。第一次大流行可能和郑和下西洋的活动相关。

前面几个例子说明了用全基因组测序不只可以追溯现在的感染,还可以追溯历史的感染。通过全基因组测序可以给一个 100% 的证据,来说明由某种病是否由某个病原导致的。例如 600 多年前的中世纪疫情导致了罗马帝国的灭亡,但是学术界一直有个疑问,就是此次瘟疫是否是鼠疫导致的,有人提出可能是霍乱。一篇发表在 Nature 上的文章说,将死于那场浩劫的尸体挖出来,把骨髓里面的鼠疫菌 DNA 通过基因芯片都捕获下来,然后做全基因组测序,证明了那次浩劫的确是鼠疫导致的,给出了一个完美的证据。

我们实验室还做了一个工作,就是把中国和蒙古国的鼠疫菌 DNA 拿来全基因组测序,分析了他们之间的遗传发育规律。同时也证实了在传播暴发过程中,菌株的 DNA 变异累计加快。据此,我们提出了一个假设,传染病在暴发的过程中有一个突变加速的过程,这给疾病检测和疾病防控带来了新的挑战,但用全基因组测序的办法可以很快和准确地鉴定出这些变异。

通过比较基因组学分析,我们利用鼠疫菌的所有变异信息建立了一个数据库,用于菌株的溯源。2009 年在青海有一次肺鼠疫的暴发,经过全基因组序列分析,得出这次暴发是由一只牧羊犬导致的。过去一直认为狗中抗鼠疫抗体的升高,可以作为一种监测野生动物宿主感染鼠疫的指标,因为认为狗对鼠疫不敏感。我们的分析首次给出了直接的证据证明狗同样可以把鼠疫传播给人,导致鼠疫的暴发流行。

对于溯源工作,我们过去是通过分子流行病学技术来实现。但是,在美国“911”炭疽白色粉末生物恐怖袭击以后,给溯源提出更高的要求,不只要溯到



来源在哪里,更重要的是要作为直接的证据把施放者送到法庭上,作为呈堂证供。因此,微生物法医学也就应运而生,包括微生物学技术、计算机技术、公共机关、法律等不同领域的人员交叉来发展这个学科,当然,发展这个新学科的关键是和法医学必须要有一个指纹数据库一样,要想实现微生物法医学溯源,我们也需要一个数据库。从目前来讲,DNA的成分是最稳定的,分析技术也是最成熟的,所以目前大家还是致力于建设各种微生物的DNA数据库,除了一些间接的分析方法(如PFGE,MLST和VNTR等)外,全基因组测序会给我们带来更精确、更准确的溯源结果。美国的炭疽最后溯源到疑犯也是靠基因组测序,但因为这个疑犯后来自杀了,这个事件的溯源调查也就画上了句号。

在日本有一个奥姆真理教,在东京地铁释放了沙林,很快警方查到了他们生产沙林的工厂。在最后审问的时候,才得知他们在工作大楼上安装了一个气溶胶发生器,他们发生过炭疽芽孢等。后来工作人员进行了调查,从楼顶和临近区域分离到了炭疽芽孢杆菌,用MLVA的方法分析证明,他们使用的菌株就是动物疫苗株,再次证明了分子生物学方法进行精确溯源的价值。

下面再举一个例子,美国一家医院ICU病房新生儿耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的调查。他们对部分来自关键部位的分离菌株进行全基因组测序分析,清楚地展示了这些菌株在医院的传播规律,为医院院内传播的预防控制措施的实施提供了很好的科技支撑。该研究还提出了两个新概念,即菌株的耐药基因谱(resistome)和毒力基因谱(toxome),前者就是所有抗性基因构成的图谱;后者就是毒力相关基因的分布情况。通过直接测序,只要获得这两个组就可以直接判定选用哪些抗生素治疗,知道毒力情况就可以判定菌株的毒性和如何处置。

下面这个例子是加拿大社区的一个结核传播感染的调查。此次疫情主要是吸毒者中进行传播,他们进行了一系列的分析,找到病例之间传播的关系和路线,能和所有人员的社会活动关联起来,也可以和微生物结果和临床数据关联起来,这是首次将社会网络与高分辨的基因组测序结果结合,通过这种复杂的分析,促进了结核暴发的溯源调查。同时显示,基因组序列分析可以有力地促进流行病学调查结果的完善,并且一个结核分枝杆菌的基因型包含有足够的遗传多态性来勾勒菌株间的精细关系,以改进流行病学调查的结果。



最近美国 FDA(食品和药物管理局)公布了一个计划,他们准备测序 10 万株食源性病原菌基因组,测序的平台选的是 Illumina 的 MiSeq,准备花 17 亿美元用 5 年的时间来完成这个工作。不久的将来,针对食品相关细菌病原传染病的暴发,就可以用这个数据库进行快速和高精度的溯源分析了。当然做的都是美国的菌株,如果能很好地实现传染病的国际溯源,要形成很好的国际合作。我们国家也启动了相关工作,就是整个细菌病原的测序工作,跟美国的想法类似,只是投入太少。这也需要我们通过专家在不同的场合去继续呼吁,如果我们不去做,外国人做好后,我们按人家的去套用,是可以使用,但是失去了对人类染病溯源做出领衔贡献的机会。

前面讲的都是针对具体病原菌株的基因组测序工作。在像河南新型 bunyavirus 病毒鉴定过程中,深圳华大基因研究院和河南疾病预防控制中心联合用 Metagenomics 直接从人的血清里面就可以鉴定出该病毒的基因序列。

所以,高通量测序技术给我们带来了前所未有的机遇,包括新病原的发现与快速鉴定、新分型技术的发展,基因组多态性数据库的建立与精确溯源,还有致病与耐药基因的揭示,当然,还可以用于大量的基础研究工作。

虽然有机遇,但我们仍面临着挑战:在技术平台方面,我们国家的测序平台非常多,包括深圳的华大基因研究院已经成了全世界最大的测序中心,和一些小的测序公司以及很多单位的测序平台,如何发挥这些平台在应对新发突发传染病中的作用,这是我们需要考虑的问题。所以,在国家层面上,必须有个大的测序中心,时刻准备着为这个事来服务,如华大基因研究院,就应该给予固定的支持,建立一种测序技术应对全球新发突发疫情的机制。我也相信,华大会感兴趣为全球和我国的公卫事业服务。

资源共享方面,大家拿到传染病病原的未知标本和资源,一般都当做宝贝自己来研究,这个进程很慢,不会很快,如果要想快速地了解病原,应用全球的智慧共同应对,如何应对?资源共享是我们应该值得考虑的问题。和这两个问题联结在一起的,最关键的是合作机制的建立。对德国大肠杆菌研究的就是一个成功的案例,我们定的一个原则就是,谁提供标本谁就是第一单位、第一作者,因为标本最重要,所以给标本提供者最大的机会,尽管后续的工作他们可能参与的比较少。随着工作的进展,视对整个工作完成的贡献,大家再商议如何



排序署名问题。如果这种共享和发表机制定下来,大家很快地就会达成共识。

在数据库建设方面,如果针对的是列到生物恐怖病原清单的细菌,我们需要和国内外同行协商,用什么技术平台来建立这个数据库,如何共享。对于鼠疫苗而言,我们在与国际同行的沟通中了解到,大家非常乐意合作来共同建立一个溯源数据库。几位有共识的科学家 2012 年在美国开了一个会,2013 年将在苏州再开一个会,在那个会上我们会定一下怎么利用公共的平台,利用全球的资源来建立好鼠疫苗溯源的数据库,实现多赢共享。从我们国家的思维方式来讲,大家都愿意在一个单位把所有的事情都完成,但对溯源数据库这个事业来讲是不可能的。所以在这种新的大平台、新合作机制的要求下,如何打破部门的利益,建立一个精准的溯源数据库是值得我们思考的。如果有一个共同目标,就容易抓住机遇,为世界传染病暴发溯源和鉴定工作做出我们应有的贡献。

马学军:

刚才您提了一个很好的建议就是关于合作机制,但是有点难度,比如说二代测序的技术很成熟,有很多商业性的公司已经做得很好。我知道的是包括我们实验室还有其他的单位都有了二代测序仪,有的是准备买。这会导致一个问题,在传染病暴发当中,可能每个人都有自己的想法。从单位的角度讲,还有个标本问题,导致与公司合作可能会比较慢。包括我们实验室也走了很多弯路,在这个过程中每个参与单位参差不齐,可能进程会比较慢。但是如果找公司合作又有一些问题,还是有一些利益上的冲突。我们搞学术的可以合作、互通有无,一起做点事情,但是实际操作的时候,把单位算进去比较有难度。有没有可能在疾控系统内部,因为二代测序仪很多单位都有,从技术上帮助大家提高?真正把一个事情做好、做得完美,需要各个实验室要去合作,有专业领导来进行协调。

崔志刚:

我们一直在做实验室或者是疾病控制方面的工作,如果建立数据库,是不是考虑有单独的一部分人、一部分小的团队专门来做数据的标准和流程分析的



标准？如果这个做下来，能够有一个比较好的框架，在后期会节省很多的时间。如果建立这个数据标准，说得大一点在国内建立，在国际交流起来也比较方便。数据库的标准建立好了，数据也获得了，马上就可以应用，建立一套完整的数据结构，不再是各个软件、分析系统独立存在。独立存在有一个很大的问题，各自都做完了之后，就可能面临一个数据库的交流是否很顺畅的问题。

舒跃龙：

一个合作机制的建立其实是很难的，我认为 2012 年英国针对类似 SARS 病毒的应对是一个反面教材。因为他们拿到数据后没有共享，迫于世界各国政府的压力，他们仅公布了部分数据。从这件事情看出来，要建立共享机制多么难，不仅仅是中国人的问题，其实这是人的本性问题。但是杨老师有成功的例子，可以进行推广。另外，你认为第三代测序、第二代测序基因组学能不能解决溯源的问题？从科学的角度来讲，两个相像菌株的就一定是来源吗？这个问题还需要什么样的技术来解决？从科学的角度上还需要什么想法推动其他技术的进步？不能完全依赖测序技术的进步。

杨瑞馥：

舒教授提出一个根本的问题，就是两个一样的东西是不是真的是同一个东西，或者说有一点差异是不是一个东西，其实这个问题非常重要。在美国炭疽芽孢测序溯源工作当中给了很好的说明。美国炭疽芽孢杆菌在平板上生长明显是不同的菌落，鉴定出了四种形态的菌落，都是不一样的。如果从表面看，这就是不同的个体，不是一个，因为表型不一样，一大一小肯定不是一个东西。但是从序列角度来讲就是差几个 SNPs，导致了代谢途径的变异，形成了不同生长菌落形态。所以对于细菌而言，如果进行基因组溯源，拿到菌株了我们可以进行溯源，能够了解表型，如果有差异，差异是什么原因导致的，这些都能推测出来了。

另外，对病毒而言相对比较难，比如说两株病毒差了一个碱基，这个就比较难回答它们是不是一株病毒。因为我本身做细菌工作，对病毒了解太少，不多



说了,但任何事情都离不开表型,如果离开了,我们肉眼看不到的基因组会导致一系列的偏颇。所以,对于细菌的溯源,我觉得测序不能作为唯一的技术,必须结合表型进行综合的分析,最后得出准确的结论。

石晓路:

有些菌株如果传代次数比较多,有的表型会发生变化的。

杨瑞馥:

现在也有相关的工作发表,比如有一个对大肠杆菌传代的研究工作,他们传了2万多代,20多年,整个基因组发生了变异,传到1.5万代左右的时候菌株有一个突变加速累积的过程。当然,传两三代就导致变化的也有,有些菌株插入序列比较多,比如我们做的鼠疫菌,插入序列占整个基因组的将近4%,传代后,基因组会发生重排,导致PFGE图谱有所变化。