

新发传染病检测和监控技术的研究进展

谢蕴涵, 吴 亮

江苏大学医学院, 江苏 镇江

收稿日期: 2025年7月5日; 录用日期: 2025年7月28日; 发布日期: 2025年8月7日

摘 要

新发传染病是指新近出现或重新抬头的感染性疾病, 其流行受人口增长、气候变化、全球化旅行及宿主免疫状态等多因素驱动。本文系统综述了新发传染病病原体检测与监控技术的研究进展, 重点阐释了分子诊断技术的革新及其在疫情防控中的关键作用。传统病原体鉴定方法(如培养分离、血清学检测)虽具价值, 但存在灵敏度低、耗时长等局限。聚合酶链反应(PCR)及新一代测序(NGS)技术的突破, 显著提升了病原体发现的效率与准确性: 从基于序列非依赖性扩增的病毒发现(如HHV-8、MCPyV), 到宏基因组学在无偏倚病原体筛查中的应用(如SARS-CoV-2的快速鉴定)。此外, 生物信息学与“全健康”(One Health)策略的整合, 为跨物种传播风险预警提供了新范式。未来, 高通量测序技术、人工智能辅助诊断及全球化监测网络的协同发展, 将进一步提升新发传染病的早期识别与应对能力。

关键词

新发传染病, 病原体鉴定, 聚合酶链反应, 宏基因组学, 下一代测序, 全健康

Research Progress on Detection and Monitoring Technologies for Emerging Infectious Diseases

Yunhan Xie, Liang Wu

School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

Received: Jul. 5th, 2025; accepted: Jul. 28th, 2025; published: Aug. 7th, 2025

Abstract

Emerging infectious diseases (EIDs), defined as newly identified or re-emerging infections, are fueled by factors including population growth, climate change, global travel, and host immune status. This review comprehensively summarizes advances in pathogen detection and surveillance

technologies, emphasizing the transformative role of molecular diagnostics. While conventional methods (e.g., culture isolation, serology) remain foundational, their limitations in sensitivity and turnaround time have been addressed by breakthroughs in polymerase chain reaction (PCR) and next-generation sequencing (NGS). Key milestones range from sequence-independent amplification techniques (e.g., discovery of HHV-8 and MCPyV) to metagenomics for unbiased pathogen screening (e.g., rapid identification of SARS-CoV-2). Integration of bioinformatics and the “One Health” framework has further enabled early warning of cross-species transmission risks. Future directions include high-throughput sequencing, AI-assisted diagnostics, and global surveillance networks to enhance preparedness against EIDs.

Keywords

Emerging Infectious Diseases, Pathogen Identification, Polymerase Chain Reaction, Metagenomics, Next-Generation Sequencing, One Health

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

新发传染病被定义为新发现感染或者新被诊断的感染,在某些特定群体中越来越多地出现,如免疫功能低下患者以及抑制患者或静脉注射吸毒者[1][2]。在进行流行病学研究中,人们往往会发现很多已知病原体(非人类疫源)在某些情况下会造成人类中感染传播[1]。近三十年来,全球范围内陆续确认了多种新发或再发传染病,以及在低流行状态后重现或发病率显著攀升的感染性疾病。诊断技术的长足进展使新型与新兴病原体的识别和流行病学监测成为可能,本文将对这一领域的核心进展进行综述。

2. 研究方法

表1展示了导致新型病原体出现或原有病原体再次出现的主要因素。人口增长促使人类活动向人兽共患病高风险区域扩张,加剧了病原体暴露风险;气候变化引致节肢动物媒介分布范围扩大,提升了人群潜在接触概率。全球旅行与贸易网络的延伸,持续强化病原体在人群中的动态传播连接,加速其定殖后的播散进程。同时,人群易感性变化亦构成关键因素:人类免疫缺陷病毒(HIV)诱导的宿主免疫缺陷曾促进多种机会性感染发生,而高效抗逆转录病毒治疗的临床普及显著降低了此类感染率;工业化国家人口老龄化伴随的免疫衰老现象,可能增强其对特定病原体的易感性;器官移植术后、肿瘤放化疗及结缔组织疾病治疗中广泛应用的免疫抑制方案,进一步重塑宿主防御状态。上述因素协同放大了易感人群对常见病原体及条件致病微生物的感染风险[1]。此外,社会经济发展、长期趋势和疫苗接种行为可能会导致感染风险或特定感染年龄的总体变化,这会影响个体是否出现有症状或无症状的感染[3]。在风疹的情况下,感染年龄的变化会影响生育潜在和由此产生的先天性感染的妇女是否会发生感染[4]。尽管免疫规划的实施显著减轻了多种传染病负担,但可能削弱人群对疫苗可预防疾病(Vaccine-Preventable Diseases, VPDs)风险的客观认知。这种防疫成效与风险感知的悖反现象表现为:疫苗接种的成功在降低目标疾病实际威胁的同时,可能诱发人群对感染真实风险的认知弱化,并放大对疫苗接种潜在风险的担忧,进而增强对疫苗负面信息的易感性。此种认知偏差已导致麻疹等在已达消除标准的国家/地区再度暴发,尤见于疫苗覆盖率低下的群体聚集区域[5][6]。缺乏抗生素管理,包括使用广谱抗生素,虽然没有临床指征,但导致了高度和广泛耐药细菌的出现[7]。因此,很明显,新发和再发传染病的威胁在不久的将来不太可能

减少。幸运的是，传染病诊断和监测技术的发展可能使未来能够快速识别和应对这些新出现的健康威胁。

Table 1. Factors contributing to the emergence of novel pathogens or re-emergence of existing pathogens
表 1. 新型病原体出现或者原有病原体再次感染的因素

原因	新出现的和再出现的病原体
进入自然栖息地	暴露于蝙蝠传播的副粘病毒，如尼帕病毒，系统病毒，如埃博拉病毒和马尔堡病毒
全球旅行	2009 年 H1N1 大流行(H1N1pdm09 病毒)的迅速传播；SARS-CoV-2 全球大流行
宿主免疫抑制：艾滋病毒，器官移植，癌症或结缔组织疾病的免疫抑制疗法	机会性感染
免疫抑制疗法	病媒传播的疾病(如虫媒病毒)
气候变化	疫苗来源的脊髓灰质炎病毒
口服脊髓灰质炎活疫苗接种，实现群体免疫疫苗接种	麻疹疫情
野生动物贸易	西非啮齿类动物：猴痘病毒

2.1. 识别病原体并证明其在疾病中的病因作用

“科赫法则”作为确立感染性病原体病因关系的经典标准，要求：1) 疾病个体中必须存在该病原体；2) 健康个体中不应存在；3) 病原体可被分离并实现体外纯培养。该标准在感染病原学鉴定中曾具有里程碑式的指导性意义，但其应用仍存在明确局限：1) 诸多微生物(如病毒、专性胞内寄生菌)难以满足体外培养条件；2) 病原体与疾病的关联性并非单一的确定性因果关系，而常呈现复杂机制——病原体定殖可表现为无症状携带状态，亦非疾病的必要或独立致病因素。疾病发生通常需宿主遗传易感性、免疫状态或环境暴露等协同因素参与，形成多病因发病模式。在后一种情况下，传染源不是充分的原因[8] [9]。疾病并发症也可能是慢性感染的结果，感染和疾病之间有很长的时间间隔[10]，这使得更难直接将传染源与疾病联系起来。

因此，基于病原体序列鉴定的分子标准，提出了对科赫假设的改编[11]。然而，复杂的病因需要流行病学证据表明，与没有感染的人相比，患有特定感染的人的风险增加。对于导致肿瘤等病理或其他感染延迟并发症的生物体，通常需要结合分子和流行病学证据。宫颈癌几乎总是致癌型人乳头瘤病毒感染的结果[12]，丙型肝炎病毒和乙型肝炎病毒感染与癌症密切相关。然而，其他感染，如人类疱疹病毒 8 型(HHV8)和爱泼斯坦杆状病毒(EBV)，在可能发生肿瘤之前需要辅因子[13]。要证明慢性幽门螺杆菌胃感染与十二指肠溃疡和胃癌的关联，除了确定患者的感染外，还需要进行流行病学和干预研究[14]。人类遗传学研究进展与多组学技术(包括转录组学、蛋白质组学及代谢组学)的深度整合，通过对 mRNA 表达谱、蛋白质结构与互作网络、代谢通路的系统性解析，累积了多维度的生物大数据。这些数据为阐释宿主遗传背景、感染过程及环境暴露的互作机制提供了关键证据。未来，基于新型分析方法的跨组学数据挖掘将深化对复杂疾病细胞通路调控网络的理解，加速潜在治疗靶标的识别[15]。

2.2. 鉴定传染病病原体的传统方法

生物化学与工程学技术的交叉融合，催生了传染病诊断体系的革新。经典诊断技术(详见表 2)虽具明确价值与应用局限，其在新发病原体筛查与鉴定中的基石地位依然不可替代，并与现代分子检测技术形成策略性互补。下文将系统解析二者的集成应用范式。

2.2.1. 显微镜和基于培养技术的病原体分离方法

自从通过光学显微镜发现微生物和巴斯德、科赫等人提出的细菌假说以来，已经开发出可以分离细

菌的培养基[16] [17]。然而，导致大多数新发感染的病毒最初是难以捉摸的，因为它们需要活细胞(细胞培养或活动物)来生长和实验室分离。病毒也太小，无法被细菌过滤器阻挡或通过光学显微镜鉴定[18]。细胞培养系统的发展极大地帮助了从患者样本中鉴定病毒[19]。同样，细胞内细菌，如分枝杆菌、衣原体、支原体和立克次体，很难生长，需要特殊的培养基，通常需要较长的潜伏期或实验室动物来分离它们[20]。电子显微镜的分辨率比光学显微镜高得多，可以表征病毒结构，并根据鉴定的形态，指导进一步的研究以鉴定特定的物种[21]。

2.2.2. 免疫学诊断方法

感染患者或感染康复者的血清被证明对诊断新型病原体非常有价值，最早的技术涉及免疫扩散、沉淀和反免疫电泳反应，有助于鉴定病原体[22] [23]。血清学诊断基于抗原 - 抗体的特异性结合。该技术核心在于：血清源抗体检测为宿主既往暴露于病原体提供溯源证据；已知抗体(经动物免疫或体外培养制备)对抗原的检测则指示样本或分离培养物中存在目标抗原。免疫荧光法、酶联免疫吸附法及化学发光法等技术已广泛应用于抗原抗体复合物鉴定。尽管系经典病原体诊断方法，血清学在新型传染病防控中仍具现实价值——其通过定量群体特异性抗体水平，为病原体暴露评估提供关键依据。针对新冠肺炎的血清学调查研究，即是运用该策略溯源无症状感染与未确诊病例传播程度的典型范例[24]。下文将更详细地讨论人群中抗体存在的研究，称为血清流行病学。

Table 2. Values and limitations of conventional infection identification and diagnostic methods
表 2. 传统的感染识别和诊断方法的价值和局限性

方法	病原体鉴定价值	限制
细菌生长培养基 (血清肉汤等)	快速生长的细菌的纯培养物	不能分离出病毒或挑剔的细菌
细胞培养方法	特定病毒的分离	许多病毒不表现出细胞病变效应；而其他病毒则不能在可用的细胞培养系统中生长
聚合酶链反应	低浓度剂的敏感性检测	设计引物需要一些序列的先验知识
血清学	调查社区中是否存在抗体(血清流行率调查)； 确定新发现的药剂以前是否在人群中流行过	通过检测抗体作为免疫反应的一部分的间接证据， 这是可变的，在感染后可能会减弱。
		相关制剂之间的交叉反应性 (例如，来自同一科，如黄病毒)

2.2.3. 传统诊断方法的局限性

尽管它们很有价值，但传统的实验室诊断方法存在局限性(表 2)。基于细胞培养的病毒分离和挑剔细菌的培养既繁琐又缓慢，电子显微镜需要高浓度的病原体，因此缺乏敏感性[25]。此外，对于许多传染源，培养隔离系统并不容易获得。因此，这些生物体的鉴定依赖于遗传鉴定，通常被称为分子诊断方法。

2.3. 分子方法的快速发展

2.3.1. 核酸扩增：聚合酶链反应及其替代方案

在快速鉴定病毒和挑剔的生物体方面最重要的突破是 Kary Mullis 于 1985 年开发了聚合酶链式反应(PCR)[26]，并因此于 1993 年获得诺贝尔奖。聚合酶链式反应(PCR)无需病原体预先分离培养，可直接扩增生物样本中微量病原体 DNA。其衍生技术逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)通过 RNA 逆转录为 DNA 的预处理步骤，实现对 RNA 病毒的特异性检测。

等温核酸扩增技术作为 PCR 的替代方案，包括：基于核酸序列的扩增(NASBA)与转录介导扩增(TMA)、

环介导等温扩增(LAMP)及重组酶聚合酶扩增(RPA)。此类技术的核心优势在于规避热循环环节, 显著简化设备配置要求[27]。

基于 PCR 产物的核苷酸测序可实现病原体全面鉴定, 并通过系统发育分析阐明其种属进化关联。然而, PCR 扩增依赖引物与靶 DNA 序列的特异性结合, 其应用前提需已知病原体部分基因序列。该技术瓶颈导致两类病原体识别受限: 与已知病原体遗传距离较远的种类; 或存在意外进化关系的新发病原体。突破此限制需优化 PCR 引物设计策略或开发替代性分子诊断技术[28]。

生物化学和工程的改进, 包括在部分或完全自动化的封闭系统中实现提取和扩增的自动化, 导致核酸扩增技术从专业研究实验室转向高通量诊断实验室。这在 HIV 和 HCV 的自动病毒载量监测以评估治疗成功以及呼吸道疾病、脑膜炎和性传播疾病的多重分子综合征诊断中得到了明显证明[29]。此外, 血库利用分子方法对献血者进行筛查, 以确保可能处于抗体阴性窗口期的献血者血液制品的安全[30]。最近, 高通量分子诊断的重要性变得最为明显, 因为实验室需要快速扩大规模, 通过 RT-PCR 检测数千个严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型样本。这对于个人诊断和流行病控制是必要的[31][32]。与大型高通量自动化实验室仪器相比, 技术发展还带来了更小的占地面积和易于使用的近患者分子诊断仪器, 这些仪器在床边或护理点(POC)诊断新发传染病方面变得越来越重要。当需要对感染者或未感染者进行临床诊断或队列护理时, 在野战医院环境中埃博拉病毒的诊断和严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型的快速诊断中发挥了重要作用[33][34]。

利用核酸扩增(主要是 PCR)的方法克服了传统方法的一些局限性。然而, 从临床样本中识别未知的新型感染带来了一些挑战, 需要寻找新的解决方案(表 3)。

Table 3. Challenges in virus discovery from clinical specimens
表 3. 从临床样本中发现病毒的挑战

挑战	影响	解决方案
宿主核酸浓度高	宿主材料的竞争导致了筛选过程的耗时	分析前的病毒: 样品的超离心法和 DNase 处理 (病毒颗粒得到保护)
未知序列	PCR 扩增需要特异性的引物结合位点	删减: 代表性差异分析(RDA) 序列独立(无偏性)扩增方法: 随机 PCR; 简并 PCR

2.3.2. 人类细胞背景干扰的处理

在更高浓度的正常人类细胞核酸(DNA 和 RNA)中识别病原体遗传物质是一项挑战。克服这一挑战的方法之一是 1993 年开发的代表性差异分析(RDA)。这种方法有选择性地富集特定类型病变组织所特有的 DNA 序列[35]。长期以来, 人们一直怀疑卡波西肉瘤(KS)的感染性病因, 但直到将 RDA 应用于这些肿瘤组织时, 才发现一种以前未识别的人类疱疹病毒, 称为人类疱疹病毒 8 型(HHV-8)或卡波西肉瘤相关病毒。疱疹病毒在所有 KS 组织中都存在[36]。

RDA 的秘密在于, 它使用改良的 PCR 来选择性扩增存在于患病组织中但在健康组织中不存在或浓度低得多的基因序列。它始于来自患病组织的低浓度扩增产物(检测扩增子)与引物连接, 与来自正常组织的过量浓度(驱动扩增子)杂交。然后, 患病组织特有的 DNA 链优先呈指数扩增[35], 这有助于识别疾病特异性序列。在确定 HHV-8 是 KS 的病因后, 发现它与多中心 Castleman 病[37]和原发性渗出性淋巴瘤[38]有关。使用 RDA 鉴定的其他病毒是人类 GB 病毒(GBV) [39], 一种与 HCV 密切相关的病毒, 但似乎没有致病性, 以及来自 Anelloviridae 家族的 TT 病毒(TTV) [40], 该病毒通常存在于血液中, 其意义尚不确定。尽管 RDA 具有价值, 但它非常繁琐, 而最近开发的一些生化方法更快、更实用。

2.4. 无偏放大方法

DNase 序列无关性单引物扩增(DNase SISPA)用于允许从血清中非特异性扩增病毒 RNA 或 DNA, 从而能够鉴定人类细小病毒 4 [41]。简而言之, 过滤后的血浆样本用 DNA 酶处理以去除人类 DNA, 然后提取病毒 RNA 和 DNA。此后, 用随机引物逆转录 RNA 并合成互补 DNA (cDNA), 然后用限制性内切酶消化病毒 DNA 或双链 DNA, 从 RNA 逆转录, 并连接接头以进行非特异性扩增、克隆和测序。类似的方法: 2004 年, 基于 cDNA-AFLP(扩增片段长度多态性) (VIDISCA) 的病毒发现被用于发现冠状病毒 NL-63。该方法从血浆、血清或培养上清液开始。首先通过离心去除细胞物质和线粒体, 然后进行 DNA 酶处理以消化细胞片段中存在的线粒体或细胞 DNA, 而病毒颗粒中的核酸仍然受到保护。然后分离病毒核酸, 将病毒 RNA 逆转录为 cDNA, 然后进行第二链合成。双链 DNA (直接来自病毒 DNA 或逆转录 RNA) 用限制性内切酶消化, 连接锚, 锚含有引物结合序列。随后进行 PCR 扩增, 最后进行核苷酸测序, 提供未知试剂的核苷酸序列, 不需要任何先前的序列知识[42]。

2.5. 测序技术的改进

2.5.1. 第一代测序

第一种广泛应用的测序方法是 Maxam 和 Gilbert 技术, 该技术依靠化学处理在一小部分 DNA 链中产生断裂, 分别针对四个核苷酸中的每一个产生断裂。然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳将这些单独切割的产物中的每一个分离成单独的片段[43]。Fred Sanger 开发了一种方法, 后来在很大程度上取代了 Maxam 和 Gilbert 方法。这依赖于 DNA 聚合酶在引物延伸和互补 DNA 合成过程中掺入正常和链终止核苷酸的混合物。当引入链终止核苷酸时, 会产生不同长度的片段, 每个片段都以各自的链终止核苷酸结束[44]。最初, 三联核苷酸被放射性标记, 但一旦被四种不同的荧光标记所取代[45], 它为自动毛细管电泳开辟了道路, 这是今天仍在使用的桑格测序版本。每个毛细管都有一个单独的读数, 称为电泳图, 它以颜色显示了每个位置结合的相应核苷酸。扩大自动化桑格测序依赖于增加并行运行的毛细血管数量。不幸的是, 这增加了仪器的占地面积, 尽管桑格测序的优雅暴露了其有限的可扩展性: 本质上, 每个测序反应和电泳发生的毛细管都旨在提供一个共识序列读取。因此, 人类基因组计划所需的大量自动化测序仪突显了自动化桑格测序的局限性。因此, 要使测序更具可扩展性, 需要一种方法, 允许在一个反应中同时对多个不同的模板进行测序。已经开发了几种不同的解决方案, 并被称为下一代测序(NGS)或大规模并行测序(MPS) [46] [47]。

2.5.2. 下一代测序技术的发展

上述测序策略虽原理各异, 均通过物理隔离反应体系实现大规模并行化独立检测(表 4)。新一代测序(NGS)技术迭代中, PacBio 单分子实时测序(SMRT)与牛津纳米孔技术(ONT)等突破性方法可获取长读长单基因组序列, 被统称为第三代测序或单分子测序(SMS), 以此区别于短读长 NGS 技术。

应用于病原体发现时存在两种策略:

- 1) 靶向富集策略: 基于 PCR 等扩增技术, 采用跨物种/属保守序列引物对目标病原体特异性富集, 经测序完成鉴定;
- 2) 非靶向宏基因组策略: 通过非特异性扩增或核酸直接测序, 系统性检测样本中潜在感染源, 经生物信息学数据库比对确定病原体, 该路径定义为宏基因组学分析。

2.5.3. 下一代测序的应用

NGS 的发展和人类基因组计划的数据为发现新的药物提供了一种新的途径: 默克尔细胞癌(MCC)是一种罕见但具有攻击性的皮肤癌症病因, 影响免疫功能低下或老年人, 通过数字转录组减法(DTS)确定[48]。

Table 4. Overview of next-generation and third-generation sequencing methods
表 4. 下一代和第三代测序方法概述

方法	分离	化学原理	检测
454 测序	与在皮滴度孔上分离的珠子相连的 DNA	随着引物的延伸, 焦磷酸盐被释放; ATP 产生, 荧光素酶介导荧光素转化为氧荧光素	光被释放
离子激流	DNA 在微加工孔中的珠子上分离	随着引物的延伸, 氢(质子)被释放出来。	半导体芯片检测电压的变化
Illumina	纳米细胞上的寡核苷酸捕获 DNA(与适配器结合)	桥接放大产生集群。测序的扩展是可逆的终止 dNTP	四个 dNTP 用不同的荧光团标记; 激光激发荧光团, 荧光灯由数码相机记录。
PacBio 单分子实时(SMRT)测序	带有数千个透明底皮滴定井的流槽: 零模式波导(ZMW)	聚合酶被固定在 ZMD 的底部, 并通过引物延伸添加荧光核苷酸	通过固定化聚合酶添加顺序碱基, 检测光信号的电影
牛津纳米孔技术	单个 DNA 分子通过纳米孔连接合成电阻聚合物膜	核苷酸碱基在通过时占据一个纳米孔, 导致电流的变化	目前与连续一系列碱基通过纳米孔相关的变化被生物信息学地分解成一个核苷酸序列。

简而言之, 来自下一代焦磷酸测序的 RNA 文库与预期的转录组(代表来自国家生物技术信息中心(NCBI)数据库的转录人类基因的预期 mRNA 序列的转录组)进行了比对。在剩余的(减去的)mRNA 转录物中, 发现一个与多瘤病毒序列相匹配。进一步的研究发现, 这种默克尔细胞多瘤病毒(MCPyV)整合在绝大多数 MCC 组织中[48]。

NGS 为诊断和病原体发现提供了一种新的宏基因组方法。涉及转座酶的非特异性 DNA 扩增用作文库制备, 然后是 Illumina 的 NGS, 其使用固相桥扩增, 允许对低浓度 DNA 文库进行直接测序[49]。这种无偏倚的方法用于在接受同一供体实体器官移植后死亡的三名患者中鉴定一种新型沙粒病毒[50]。它还允许对归国旅行者的感染进行无偏见地诊断[51]。这些宏基因组学方法已被证明与多重 PCR 等常规诊断方法具有良好的相关性[52] [53], 但如果病毒载量足够高, 效果最好[53] [54]。在下一代文库制备之前, 可以通过首先用探针捕获富集病毒序列来提高灵敏度[55]-[57]。

在一项外国科学团队的研究中, 开发了两种快速且低成本的病毒 RNA 宏基因组学检测方法, SMART-9N 和 Rapid SMART-9N。这项技术以改造 SMART (Switch Mechanism at 5' End of RNA Template)技术为基础, 采用随机引物代替 oligo-dT, 兼容纳米孔测序。其中 SMART-9N 方法需单独制备文库, 使用 Q5 聚合酶, 而 Rapid SMART-9N 方法则是集成条形码 PCR, 使用 LongAmp Taq 聚合酶。实验采用塞卡病毒(ZIKV)、黄热病毒(YFV)和严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)作为模型病毒。首先提取病毒的 RNA, 采用金标准多重 PCR 作为对照组, SMART-9N 和 Rapid SMART-9N 作为实验组对病毒 RNA 进行测序分析。在原始数据处理中, 使用 Guppy (v2.2.7 GPU)对 MinION 生成的 FAST5 文件进行实时碱基识别, 通过 Porechop (v0.3.2)去除测序接头(adapters), 按条形码拆分样本, 并过滤低质量读段(默认 $Q \geq 7$)。初步处理后进行序列比对, 使用 Minimap2 (v2.28.0)将纯净读段比对至目标病毒参考基因组, 使用 SAMtools (v1.9)将 SAM 文件转为排序 BAM 文件, 优化存储与检索效率。通过 SAMtools depth 计算全基因组覆盖百分比($\geq 1 \times 10^4 \times$ 深度的比例), 平板(Tablet v1.19.05.28)可视化覆盖均匀性, 评估扩增偏好性, NanoStat (v1.1.2)统计 N50(半数以上组装 contigs 的最短长度)及平均读长, 查看读长质量。随后进行变异检测, 对照组多重 PCR 样本采用 ARTIC 流程(artic minion + Nanopolish)进行引物修剪和变异调用, 实验组宏基因组样本通过 Medka (medaka_variant)检测 SNP/InDel 并生成共识序列。使用 Kraken2 (v2.0.8-beta)及 MiniKraken2_v1 数据库(8GB), 对未比对的读段进行病毒分类, 对分类为病毒的读段二次比对至

NCBI 病毒库(如 Siphoviridae dsDNA 病毒), 验证共存病原体。最后输出结果: 覆盖率、深度分布、最长读长、N50 值和病原体分类比例, 生成共识序列。最后实验结果显示, 与对照组多重 PCR 相比, 宏基因组学检测方法具有高灵敏度、长度长、成本低和检测效率高的优点, 尤其是 Rapid SMART-9N 方法。且宏基因组学更适用于低病毒载量的标本; 覆盖原始数据到变体检测, 支持病原体鉴定与进化分析; 兼容靶向(扩增子)与非靶向(宏基因组)策略, 满足新病毒发现需求, 为新发病毒检测提供更高效且低成本检测方法[58]。

宏基因组学 NGS 在临床中是一个非常强大的工具, 其为我们提供了检测标本中所有的 DNA 开放视图, 与经典的特异性分析相比能更好地检测出被遗漏的未被发现的病原体。在 2018 年尼日利亚的拉沙热疫情中, 使用了宏基因组测序技术检测拉沙热病毒(LASV), 使用 MinION 对遗传多样性 RNA 病毒进行便携式宏基因组测序, 无需寄送标本和特异性富集病原体, 加快了疫情中对病原体的基因组的测序[59]。

然而, 宏基因组 NGS 仍面临一些挑战, 阻碍了其广泛采用。NGS 的一个挑战是计算和生物信息学需要组装序列读取并将其与现有数据库进行匹配, 以识别已知和可能的新型病原体[60]。宏基因组 NGS 也会产生信息, 包括具有未知临床意义的病毒基因组序列, 这些序列可能是非致病性的, 如无核病毒。然而, anellovirus 病毒载量已被用于监测器官移植受者的免疫抑制程度[57]。Marius Zeeb 团队为了解决 NGS 数据的关键问题, 建立了瑞士 HIV 队列研究病毒 NGS 数据库(SHCND), 该数据库用于储存和处理 HIV 基因组学数据, 还可用于 HIV 的耐药突变检测, 为 HIV 发病机制、治疗、耐药性和分子流行病学方面的多个研究项目做出了贡献[61]。在 Benjamin Voigt 等人的研究中, 采用 AI 对 NGS 进行读长分类[62]。他们使用并证明了 transformer 神经网络可以不依赖参考数据库在结构域水平上基于生物体蛋白质氨基酸序列的短段进行分类, 且支持在分类中对未知的细菌和病毒蛋白进行无参考检测, 以此促进了潜在的新病原体检测。

宏基因组学 NGS 在“同一健康”(One Health)框架下可扩展应用于非人类宿主及节肢动物载体病原体筛查。蝙蝠等自然宿主携带的丝状病毒科(埃博拉病毒、马尔堡病毒)、副粘病毒科(亨德拉病毒、尼帕病毒)、冠状病毒科(严重急性呼吸综合征冠状病毒、中东呼吸综合征冠状病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型)等新兴人类病原体表明, 其宏基因组学分析能预警潜在人畜共患病毒, 为跨物种传播风险提供早期识别依据[63]。

3. 结论: 识别和监测现在和未来的新发感染

宏基因组学技术的演进实现了对人类、环境、人畜共患宿主及媒介中病原体的无预设性发现, 为病原体鉴定带来变革性突破。二代测序与三代长读长测序技术的迭代, 大幅缩短新发传染源基因组从鉴定至全特征分析周期。此效能凸显于严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)疫情: 其基因组在发现数周内即完成国际共享与全面解析。若无该快速表征体系, 诊断试剂的年内开发及新冠疫苗创纪录的快速研发与获批均不可实现。

分子流行病学及分子钟模型证实, 新发感染多源自非人哺乳动物宿主。人类免疫缺陷病毒(HIV)溯源灵长类, 蝙蝠携带的高致病性病毒已多次突破种间屏障并具大流行潜力。因此, 流行病监测亟须采用全健康(One Health)策略, 整合兽医与人类健康监测体系, 纳入节肢动物媒介研究。

全球化进程增强国际联通性, 高人口密度与城市化则提升呼吸道病原体传播风险。大陆性暴发感染可迅即蔓延全球, 然亦为跨国协作创造机遇。基于信息共享与技术协同的全球联防机制, 对当前及未来新发传染病的快速识别与应对具有关键作用。

参考文献

- [1] Morens, D.M., Folkers, G.K. and Fauci, A.S. (2004) The Challenge of Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases.

- Nature*, **430**, 242-249. <https://doi.org/10.1038/nature02759>
- [2] Morse, S.S. (1995) Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, **1**, 7-15. <https://doi.org/10.3201/eid0101.950102>
- [3] Jacobsen, K. and Koopman, J. (2005) The Effects of Socioeconomic Development on Worldwide Hepatitis a Virus Seroprevalence Patterns. *International Journal of Epidemiology*, **34**, 600-609. <https://doi.org/10.1093/ije/dyi062>
- [4] Panagiotopoulos, T., Antoniadou, I., Valassi-Adam, E. and Berger, A. (1999) Increase in Congenital Rubella Occurrence after Immunisation in Greece: Retrospective Survey and Systematic Review How Does Herd Immunity Work? *BMJ*, **319**, 1462-1467. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7223.1462>
- [5] Coombes, R. (2017) Europe Steps up Action against Vaccine Hesitancy as Measles Outbreaks Continue. *BMJ*, **359**, j4803. <https://doi.org/10.1136/bmj.j4803>
- [6] Lo, N.C. and Hotez, P.J. (2017) Public Health and Economic Consequences of Vaccine Hesitancy for Measles in the United States. *JAMA Pediatrics*, **171**, 887-892. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1695>
- [7] Baur, D., Gladstone, B.P., Burkert, F., Carrara, E., Foschi, F., Döbele, S., *et al.* (2017) Effect of Antibiotic Stewardship on the Incidence of Infection and Colonisation with Antibiotic-Resistant Bacteria and Clostridium Difficile Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, **17**, 990-1001. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30325-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30325-0)
- [8] Byrd, A.L. and Segre, J.A. (2016) Adapting Koch's Postulates. *Science*, **351**, 224-226. <https://doi.org/10.1126/science.aad6753>
- [9] Falkow, S. (2004) Molecular Koch's Postulates Applied to Bacterial Pathogenicity—A Personal Recollection 15 Years Later. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 67-72. <https://doi.org/10.1038/nrmicro799>
- [10] O'Connor, S.M., Taylor, C.E. and Hughes, J.M. (2006) Emerging Infectious Determinants of Chronic Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, **12**, 1051-1057. <https://doi.org/10.3201/eid1207.060037>
- [11] Falkow, S. (1988) Molecular Koch's Postulates Applied to Microbial Pathogenicity. *Clinical Infectious Diseases*, **10**, S274-S276. https://doi.org/10.1093/cid/10.supplement_2.s274
- [12] Nicolás, I., Marimon, L., Barnadas, E., Saco, A., Rodríguez-Carunchio, L., Fusté, P., *et al.* (2019) HPV-Negative Tumors of the Uterine Cervix. *Modern Pathology*, **32**, 1189-1196. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0249-1>
- [13] Mesri, E.A., Feitelson, M.A. and Munger, K. (2014) Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. *Cell Host & Microbe*, **15**, 266-282. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.011>
- [14] Choi, I.J., Kook, M., Kim, Y., Cho, S., Lee, J.Y., Kim, C.G., *et al.* (2018) *Helicobacter pylori* Therapy for the Prevention of Metachronous Gastric Cancer. *New England Journal of Medicine*, **378**, 1085-1095. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1708423>
- [15] Karczewski, K.J. and Snyder, M.P. (2018) Integrative Omics for Health and Disease. *Nature Reviews Genetics*, **19**, 299-310. <https://doi.org/10.1038/nrg.2018.4>
- [16] Blevins, S.M. and Bronze, M.S. (2010) Robert Koch and the 'Golden Age' of Bacteriology. *International Journal of Infectious Diseases*, **14**, e744-e751. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.12.003>
- [17] Pasteur, L. (1881) On the Germ Theory. *Science*, **2**, 420-422. <https://doi.org/10.1126/science.os-2.62.420>
- [18] Lwoff, A. (1957) The Concept of Virus. *Microbiology*, **17**, 239-253. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-2-239>
- [19] Leland, D.S. and Ginocchio, C.C. (2007) Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clinical Microbiology Reviews*, **20**, 49-78. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-06>
- [20] Doern, G.V. (2000) Detection of Selected Fastidious Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, **30**, 166-173. <https://doi.org/10.1086/313586>
- [21] Curry, A., Appleton, H. and Dowsett, B. (2006) Application of Transmission Electron Microscopy to the Clinical Study of Viral and Bacterial Infections: Present and Future. *Micron*, **37**, 91-106. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.001>
- [22] Gocke, D.J. and Howe, C. (1970) Rapid Detection of Australia Antigen by Counterimmunoelectrophoresis. *The Journal of Immunology*, **104**, 1031-1032. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.104.4.1031>
- [23] Stanford, J.L. (1973) Immunodiffusion Analysis—A Rational Basis for the Taxonomy of Mycobacteria. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, **53**, 321-330.
- [24] Larremore, D.B., Fosdick, B.K., Bubar, K.M., Zhang, S., Kissler, S.M., Metcalf, C.J.E., *et al.* (2021) Estimating SARS-CoV-2 Seroprevalence and Epidemiological Parameters with Uncertainty from Serological Surveys. *eLife*, **10**, e64206. <https://doi.org/10.7554/elife.64206>
- [25] Lipkin, W.I. and Firth, C. (2013) Viral Surveillance and Discovery. *Current Opinion in Virology*, **3**, 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.010>

- [26] Mullis, K.B. (1990) The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, **262**, 56-65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- [27] Li, J. and Macdonald, J. (2015) Advances in Isothermal Amplification: Novel Strategies Inspired by Biological Processes. *Biosensors and Bioelectronics*, **64**, 196-211. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
- [28] Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A. and Andersson, B. (2005) Cloning of a Human Parvovirus by Molecular Screening of Respiratory Tract Samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12891-12896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>
- [29] Greub, G., Sahli, R., Brouillet, R. and Jaton, K. (2016) Ten Years of R&D and Full Automation in Molecular Diagnosis. *Future Microbiology*, **11**, 403-425. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.152>
- [30] Vermeulen, M., Lelie, N., Sykes, W., Crookes, R., Swanevelder, J., Gaggia, L., *et al.* (2009) Impact of Individual-Donation Nucleic Acid Testing on Risk of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B Virus, and Hepatitis C Virus Transmission by Blood Transfusion in South Africa. *Transfusion*, **49**, 1115-1125. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02110.x>
- [31] Gorzalski, A.J., Tian, H., Laverdure, C., Morzunov, S., Verma, S.C., VanHooser, S., *et al.* (2020) High-Throughput Transcription-Mediated Amplification on the Hologic Panther Is a Highly Sensitive Method of Detection for SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Virology*, **129**, Article ID: 104501. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104501>
- [32] Opota, O., Brouillet, R., Greub, G. and Jaton, K. (2020) Comparison of SARS-CoV-2 RT-PCR on a High-Throughput Molecular Diagnostic Platform and the Cobas SARS-CoV-2 Test for the Diagnostic of COVID-19 on Various Clinical Samples. *Pathogens and Disease*, **78**, ftaa061. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa061>
- [33] Raftery, P., Condell, O., Wasunna, C., Kpaka, J., Zwizwai, R., Nuha, M., *et al.* (2018) Establishing Ebola Virus Disease (EVD) Diagnostics Using Genexpert Technology at a Mobile Laboratory in Liberia: Impact on Outbreak Response, Case Management and Laboratory Systems Strengthening. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **12**, e0006135. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006135>
- [34] Zhen, W., Smith, E., Manji, R., Schron, D. and Berry, G.J. (2020) Clinical Evaluation of Three Sample-To-Answer Platforms for Detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, **58**, e00783-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.00783-20>
- [35] Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. and Wigler, M. (1993) Cloning the Differences between Two Complex Genomes. *Science*, **259**, 946-951. <https://doi.org/10.1126/science.8438152>
- [36] Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., *et al.* (1994) Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in Aids-Associated Kaposi's Sarcoma. *Science*, **266**, 1865-1869. <https://doi.org/10.1126/science.7997879>
- [37] Scheinberg, I.H. (1979) Thrombocytopenic Reaction to Aspirin and Acetaminophen. *The New England Journal of Medicine*, **300**, 678.
- [38] Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P.S., Said, J.W. and Knowles, D.M. (1995) Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences in Aids-Related Body-Cavity-Based Lymphomas. *New England Journal of Medicine*, **332**, 1186-1191. <https://doi.org/10.1056/nejm199505043321802>
- [39] Simons, J.N., Pilot-Matias, T.J., Leary, T.P., Dawson, G.J., Desai, S.M., Schlauder, G.G., *et al.* (1995) Identification of Two Flavivirus-Like Genomes in the GB Hepatitis Agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 3401-3405. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3401>
- [40] Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1997) A Novel DNA Virus (TTV) Associated with Elevated Transaminase Levels in Posttransfusion Hepatitis of Unknown Etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **241**, 92-97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7765>
- [41] Jones, M.S., Kapoor, A., Lukashov, V.V., Simmonds, P., Hecht, F. and Delwart, E. (2005) New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome. *Journal of Virology*, **79**, 8230-8236. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8230-8236.2005>
- [42] van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J.M., Wolthers, K.C., *et al.* (2004) Identification of a New Human Coronavirus. *Nature Medicine*, **10**, 368-373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
- [43] Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) A New Method for Sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 560-564. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
- [44] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- [45] Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson, C.W., Zagursky, R.J., *et al.* (1987) A System for Rapid DNA Sequencing with Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. *Science*, **238**, 336-341. <https://doi.org/10.1126/science.2443975>

- [46] van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. and Thermes, C. (2014) Ten Years of Next-Generation Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, **30**, 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- [47] von Bubnoff, A. (2008) Next-Generation Sequencing: The Race Is On. *Cell*, **132**, 721-723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.028>
- [48] Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. and Moore, P.S. (2008) Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science*, **319**, 1096-1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- [49] Marine, R., Polson, S.W., Ravel, J., Hatfull, G., Russell, D., Sullivan, M., *et al.* (2011) Evaluation of a Transposase Protocol for Rapid Generation of Shotgun High-Throughput Sequencing Libraries from Nanogram Quantities of DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 8071-8079. <https://doi.org/10.1128/aem.05610-11>
- [50] Palacios, G., Druce, J., Du, L., Tran, T., Birch, C., Briese, T., *et al.* (2008) A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *New England Journal of Medicine*, **358**, 991-998. <https://doi.org/10.1056/nejmoa073785>
- [51] Jerome, H., Taylor, C., Sreenu, V.B., Klymenko, T., Filipe, A.D.S., Jackson, C., *et al.* (2019) Metagenomic Next-Generation Sequencing Aids the Diagnosis of Viral Infections in Febrile Returning Travellers. *Journal of Infection*, **79**, 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.08.003>
- [52] Graf, E.H., Simmon, K.E., Tardif, K.D., Hymas, W., Flygare, S., Eilbeck, K., *et al.* (2016) Unbiased Detection of Respiratory Viruses by Use of RNA Sequencing-Based Metagenomics: A Systematic Comparison to a Commercial PCR Panel. *Journal of Clinical Microbiology*, **54**, 1000-1007. <https://doi.org/10.1128/jcm.03060-15>
- [53] Huang, B., Jennison, A., Whitley, D., McMahon, J., Hewitson, G., Graham, R., *et al.* (2019) Illumina Sequencing of Clinical Samples for Virus Detection in a Public Health Laboratory. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 5409. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41830-w>
- [54] Kustin, T., Ling, G., Sharabi, S., Ram, D., Friedman, N., Zuckerman, N., *et al.* (2019) A Method to Identify Respiratory Virus Infections in Clinical Samples Using Next-Generation Sequencing. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 2606. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37483-w>
- [55] O'Flaherty, B.M., Li, Y., Tao, Y., Paden, C.R., Queen, K., Zhang, J., *et al.* (2018) Comprehensive Viral Enrichment Enables Sensitive Respiratory Virus Genomic Identification and Analysis by Next Generation Sequencing. *Genome Research*, **28**, 869-877. <https://doi.org/10.1101/gr.226316.117>
- [56] Wylie, T.N., Wylie, K.M., Herter, B.N. and Storch, G.A. (2015) Enhanced Virome Sequencing Using Targeted Sequence Capture. *Genome Research*, **25**, 1910-1920. <https://doi.org/10.1101/gr.191049.115>
- [57] Wylie, K.M., Wylie, T.N., Buller, R., Herter, B., Cannella, M.T. and Storch, G.A. (2018) Detection of Viruses in Clinical Samples by Use of Metagenomic Sequencing and Targeted Sequence Capture. *Journal of Clinical Microbiology*, **56**, e01123-18. <https://doi.org/10.1128/jcm.01123-18>
- [58] Claro, I.M., Ramundo, M.S., *et al.* (2021) Rapid Viral Metagenomics Using SMART-9N Amplification and Nanopore Sequencing. *Wellcome Open Research*, **6**, 241.
- [59] Kafetzopoulou, L.E., Pullan, S.T., Lemey, P., Suchard, M.A., Ehichioya, D.U., Pahlmann, M., *et al.* (2019) Metagenomic Sequencing at the Epicenter of the Nigeria 2018 Lassa Fever Outbreak. *Science*, **363**, 74-77. <https://doi.org/10.1126/science.aau9343>
- [60] Dutilh, B.E., Reyes, A., Hall, R.J. and Whiteson, K.L. (2017) Editorial: Virus Discovery by Metagenomics: The (Im)possibilities. *Frontiers in Microbiology*, **8**, Article 1710. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01710>
- [61] Zeeb, M., Frischknecht, P., Balakrishna, S., Jörmann, L., Tschumi, J., Zsichla, L., *et al.* (2025) Addressing Data Management and Analysis Challenges in Viral Genomics: The Swiss HIV Cohort Study Viral Next Generation Sequencing Database. *PLOS Digital Health*, **4**, e0000825. <https://doi.org/10.1371/journal.pdig.0000825>
- [62] Voigt, B., Fischer, O., Krumnow, C., Herta, C. and Dabrowski, P.W. (2021) NGS Read Classification Using AI. *PLOS ONE*, **16**, e0261548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261548>
- [63] Geldenhuys, M., Mortlock, M., Weyer, J., Bezuidt, O., Seamark, E.C.J., Kearney, T., *et al.* (2018) A Metagenomic Viral Discovery Approach Identifies Potential Zoonotic and Novel Mammalian Viruses in Neoromicia Bats within South Africa. *PLOS ONE*, **13**, e0194527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194527>