

运用高通量测序技术诊断重症鹦鹉热

华大智造DNBSEQ平台的宏基因组测序在病原诊断中性能表现更加优异

某研究团队采用基于华大智造DNBSEQ 平台的宏基因组高通量测序 (Metagenomic next-generation sequencing , mNGS) 技术进行鹦鹉热的检测，并与其他平台进行了比较，发现与MinION或Illumina平台相比，华大智造DNBSEQ 测序平台产生了更多的数据，并提供了关于鹦鹉热衣原体L99的最全面的基因组信息。

具体研究已于2021年发表于*BMC Genomics*杂志，题目为“Metagenomic diagnosis of severe psittacosis using multiple sequencing platforms”¹。

推荐应用：病原微生物 - 鹦鹉热衣原体

推荐机型：DNBSEQ-G99ARS

• 宏基因组测序性能突出

基于华大智造 DNBSEQ 测序平台的宏基因组测序技术能够获得更多的 reads 总数、更高的基因组覆盖度及测序深度，具有更高的检测灵敏度。

• 灵活多样的产品组合

华大智造的样品前处理、自动化建库、对测序数据自动化解读等技术，能够实现从样本输入到报告输出，提升效率并节约人力。



背景介绍

新型传染病(emerging infectious diseases)发生时,辨认新型病原体是防控疾病关键的一步¹。如图1所示,红色代表新型传染病;蓝色代表暴发控制后再次出现的疾病;黑色代表“人为制造的”疾病,人类历史上已有很多次新型传染病的发生。我们的公共卫生系统,时刻受到这些传染病的威胁²⁻⁴。其中由病原微生物(如:鹦鹉热)引起的发热和传染感染是临床医生最为棘手的病症。这些病原体往往呈现多样化和复杂化的趋势,威胁人类健康。传统的病原微生物检测方法存在周期长、过程复杂以及灵敏度低等特点,而疾病的快速、准确的诊断是有效治疗、病情监测和控制疾病蔓延的重要前提。

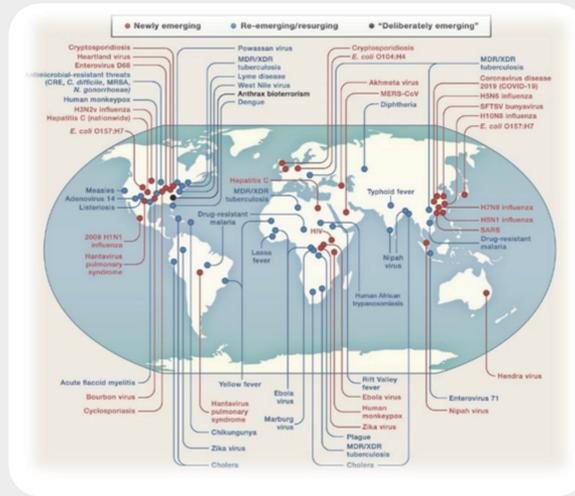


图1.1981-2020年新出现的传染病¹

微生物组分析方法和标准在过去几年发展迅速⁵。作为新兴的检测方法,病原宏基因组测序技术能够综合分析来自患者样本的病原微生物的基因物质(DNA和RNA),进而实现未知病原种属的快速鉴定和深入分析⁶(图2)。目前,这种方法已广泛应用到对临床不明原因发热、高度怀疑感染的血液、脑脊液、肺泡灌洗液、痰液、胸腔积液等样本的检测,为临床提供了有力的证据,找到了许多疑难杂症的幕后真凶,正在改变医生诊断和治疗感染性疾病的方式⁷。

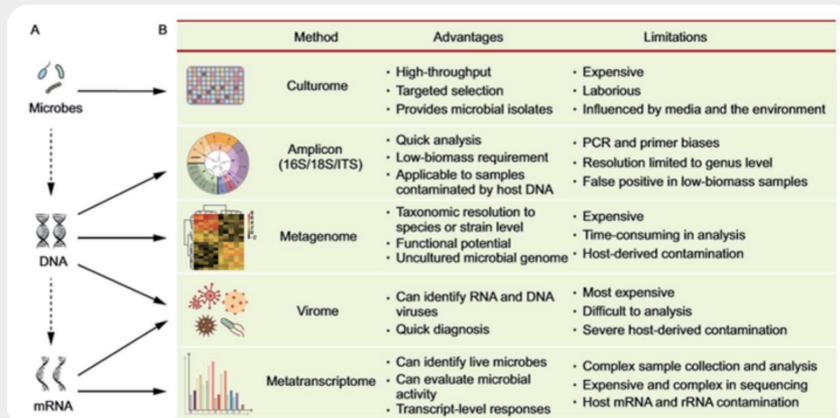


图2.高通量测序技术在微生物研究中的优势和局限性⁶

研究描述

鹦鹉热是一种人畜共患的细胞内病原体，可导致一系列严重疾病，包括无症状的短暂携带、轻度肺炎和可导致呼吸和多器官系统衰竭的严重肺炎，在极少数情况下，还可导致死亡。然而，早期诊断与非特异性临床表现相混淆，罕见感染的临床怀疑程度低，大多数临床实验室的诊断分析有限等制约了鹦鹉热的确诊。

本研究报告了一例用 mNGS 技术诊断致死性鹦鹉热的病例，研究结果表明标本类型以及测序平台的选择在重症肺炎病因的诊断中都是重要的⁷。病原微生物宏基因组检测方法的重大优势在于对未知病原的鉴定。虽然病原体的类型未知，但可通过与数据库比对，直接对病原基因组或者转录组进行全面分析，查找线索，让致病微生物无所遁形。针对病原微生物检测，华大智造提供宏基因组测序一站式产品组合(图3)。



图3.病原微生物宏基因组检测方法流程

实验方法

样本制备

研究收集了一位重症鹦鹉热患者(60岁,女)的下呼吸道样本(支气管肺泡灌洗液,痰)以及血液样本以提取DNA以及RNA,随后将RNA样本反转录为双链DNA。

文库制备与测序

对上述得到的三种样本的宏基因组DNA,使用 MGIEasy DNA 文库快速制备试剂套装(已停产,建议使用 MGI Easy 通用 DNA 文库制备试剂套装)构建DNA文库,流程如下:将提取到的宏基因组DNA片段化为300bp,经过产物纯化以及测序接头连接后,经由PCR扩增和酶切消化后,富集得到所建立好的DNA文库,加载至DNBSEQ测序仪上完成双端100bp(PE100)的测序。

同时,使用Illumina以及MinION平台方法,对三种样本的宏基因组DNA进行建库及测序。在需要处理大量样本时,华大智造能够提供自动化提取及建库的方案,以达到节约人力、提高工作效率的目的。

分析流程

使用 PycoQC 以及 SOAPnuke 对低质量的测序数据进行过滤,高质量的测序数据使用 Centrifuge 进行分类后,分别使用 Bowtie2 以及 MEGAHIT 进行对齐以及组装。样本中得到的基因组随后与数据库中其它的鹦鹉热病原体基因组进行了系统发育分析,并鉴定了样本基因组中的耐药基因以及毒力因子。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
一位重症鹦鹉热患者的下呼吸道样本(支气管肺泡灌洗液,痰)以及血液样本	 MGIEasy 通用DNA文库制备试剂套装  DNBSEQ-G99ARS 测序仪	PycoQC SOAPnuke Centrifuge Bowtie2 MEGAHIT	病原鉴定 系统发育分析 耐药基因以及毒力因子的鉴定

结果分析

准确鉴定病理样本中的主要病原

华大智造 DNBSEQ 测序平台对支气管肺泡灌洗液、痰以血液样本分别产出了 10.2Gb、11.3Gb 以及 8.7Gb 的测序数据，测序读长为 100bp。分析结果表明，鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*) 为主要的病原，分别在支气管肺泡灌洗液、痰以及血液样本中获得了 39,385、30,320 和 14,478 条 reads (表 1)。对组装得到的基因组分析结果表明，该样本的鹦鹉热衣原体毒株属于 ompA 位点的 E 基因型，并命名为鹦鹉热衣原体 L99 分离株。

测序数据可用于准确组装病原基因组

将 DNBSEQ 测序平台的测序数据，比对至鹦鹉热衣原体 L99 分离株基因组，支气管肺泡灌洗液、痰以及血液样本的覆盖区域分别可达 99.5%、99.0% 以及 88.0%，且覆盖深度分别可达 6.8×、5.2× 以及 2.5×，该结果也同样说明，支气管肺泡灌洗液为检测鹦鹉热衣原体最合适的检测样本(图 5)。

Top ten species	Number of unique reads(n)		
	BALF	Sputum	Blood
<i>Chlamydia psittaci</i> ^a	39,385	30,320	14,478
<i>Propionibacterium acnes</i> ^a	64	59	171
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^a	54	102	150
<i>Chlamydia abortus</i>	46	23	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a	29	22	24
<i>Salmonella enterica</i> ^a	27	56	43
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a	20	16	29
<i>Moraxella osloensis</i> ^a	17	9	26
<i>Micrococcus luteus</i>	10	8	/
<i>Escherichia coli</i> ^a	8	10	50
<i>Enterococcus faecium</i>	/	/	11
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	/	/	11

^aindicates species that were detected in all three sample types. "/" indicates species that were not among the top ten species of the corresponding sample

表1.华大智造平台在三种样本中测得的主要物种类别

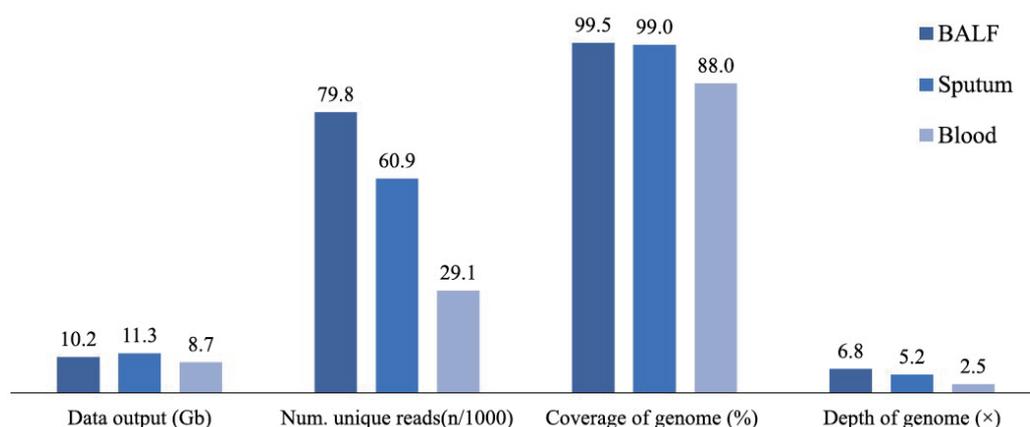


图5.华大智造平台对不同类型样本的鹦鹉热衣原体测序结果

华大智造测序平台性能表现优越

对比 DNBSEQ 测序平台与 Illumina 以及 MinION 平台测序数据发现，DNBSEQ 测序平台表现更加优异，包括更多的测序 reads 数、更高的基因组覆盖度以及更高的测序深度(图 6)。

对所有测序数据进行比较分析，在三个平台的测序结果间，没有发现单个碱基的突变。接着将华大智造平台与其它平台的的测序数据联合分析，组装

得到了含有 34 个 Contigs 的鸚鵡热衣原体基因组。系统发育分析显示该 L99 分离株与参考基因组鸚鵡热衣原体 MN 分离株 (NC_018627.1) 以及 01DC12 分离株 (NC_019391.1) 高度同源(图 7)。同时，通过由这些测序数据组装的高质量基因组分析发现，该分离株不存在耐药因子以及毒力因子。

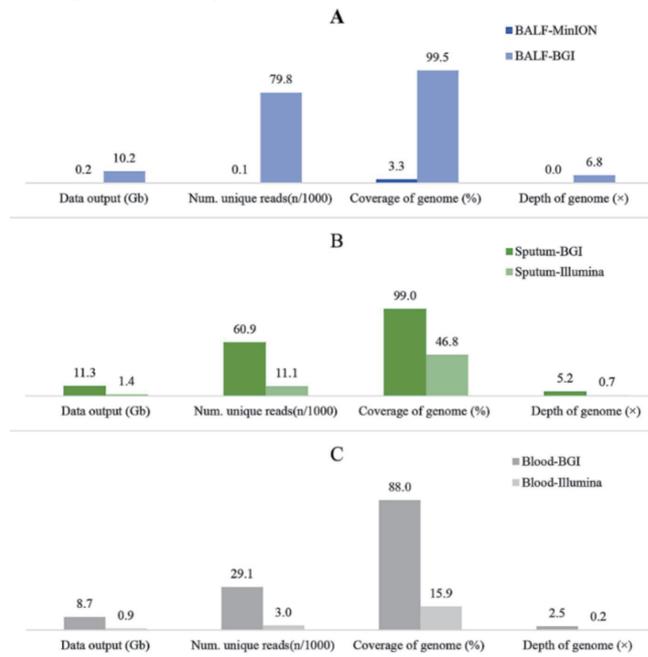


图6.华大智造DNBSEQ测序平台与其他平台的测序结果比较

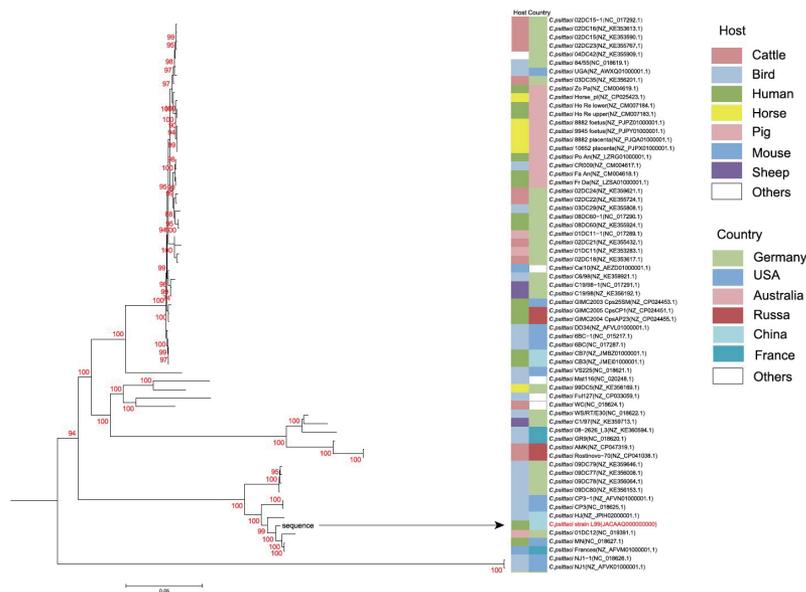


图7.鸚鵡热衣原体L99分离株的全基因组进化树

总结

基于对一位患重症鹦鹉热患者三个体液样本的宏基因组测序分析，该研究使用包括华大智造DNBSEQ 测序平台在内的三种测序平台，鉴定了引起该患者发病的病原物种，同时对三种测序平台的性能进行了评估。其中，华大智造测序平台能够产出的有效数据量最多，比对覆盖到全基因组的范围最广、测序深度最深，检测灵敏度最高。华大智造测序平台适合多种样本的病原检测，能够得到准确的检测结果。

针对大量样本的病原微生物检测，从样本的制备、DNA 提取、文库构建、测序、下机数据分析到最终的结果报告产出，华大智造能提供全流程的自动化方案，提供软硬件一体的病原快速鉴定系统（Platform of microorganisms Fast Identification, PFI），实现多样本重要病原的快速、准确鉴定，为相关疫情的防控提供有力的支持。



基因测序仪 DNBSEQ-G99ARS

参考文献

1. Wang, K. *et al.* Metagenomic diagnosis of severe psittacosis using multiple sequencing platforms. *BMC Genomics* 22, 1-6 (2021).
2. Morens, D. M., Folkers, G. K. & Fauci, A. S. Emerging infections: a perpetual challenge. *Lancet Infect Dis* 8, 710-719 (2008).
3. Morens, D. M., Folkers, G. K. & Fauci, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430, 242-249 (2004).
4. Morens, D. M. & Fauci, A. S. Emerging infectious diseases in 2012: 20 years after the institute of medicine report. *mBio* 3, e00494-12 (2012).
5. Knight, R. *et al.* Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol* 16, 410-422, (2018).
6. Qin, J. *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59-65 (2010).
7. Liu, Y.-X. *et al.* A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein Cell* 12, 315-330, (2021).

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪 DNBSEQ-G99ARS	900-000560-00
	MGISP-100RS 自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	PFI 微生物快速识别与组装溯源平台	900-000398-00
建库试剂	MGI Easy 通用 DNA 文库制备试剂套装 (16RXN)	1000006985
测序试剂	DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装 (G99 SM FCL PE150)	940-000410-00

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有，未经本公司书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2022年10月版

撰稿：王志杰 万沐春

责任编辑：王其伟

审稿：江遥