

# 华大智造ATOPlex 结核分枝杆菌扩增测序组合产品

快速、精准的测序方案为结核分枝杆菌的鉴定、耐药预测和溯源提供强大工具

## 亮点

- 建库操作简便

- 基于自主研发的ATOPlex多重PCR建库平台, 仅需单管内2步扩增即可实现靶区域扩增建库

- 软件分析功能全

- 参考WHO发布的《结核耐药相关变异目录》注释变异, 全部覆盖一、二级耐药相关变异1200+个; 共计覆盖变异7000+个; 扩增区域大小达到25.9 Kb;
- 涵盖目录收录的15种一线、二线抗结核药物耐药基因信息52个基因或基因片段的变异信息
- 支持结核分枝杆菌复合群(MTBC) 鉴定, spoligotype分型鉴定; 174种分枝杆菌鉴定
- 进化溯源分析

- 全流程速度快

- 搭配DNBSEQ-G99ARS测序仪, 从核酸到报告全流程最快24h完成; 适配DNBSEQ-E25测序仪, 从核酸到报告全流程最快30h完成;

- 样本无需培养

- 靶向测序的高灵敏度支持痰液、灌洗液等混合样本; 无需培养

## 简介

基于华大智造自主研发的试剂、高通量测序平台以及分析软件, 覆盖从样本到结果全流程, 搭配DNBSEQ-G99ARS平台, 是目前全球中小通量测序仪中速度最快的机型之一, 12小时可完成 PE150测序; 同时适配小型、轻便的DNBSEQ-E25平台; 独有的DNBSEQ测序技术, 为下游分析提供高质量的测序数据保障; 靶向MTB耐药和鉴定区域进行快速、精准的测序; 配套软件实现MTBC鉴定和分型, 分枝杆菌鉴定, 变异检测, 耐药预测, 进化溯源分析, 自动生成报告; 为MTB的变异监测和耐药研究提供强有力的工具支撑。

表1 推荐参数

预期用途	推荐读长	单样本数据量	推荐通量/FC
MTBC鉴定和分型, 分枝杆菌鉴定, 变异检测, 耐药预测, 进化溯源分析	PE 150+10+10	3 M Reads	~24 样本 (DNBSEQ-G99) ~8样本 (DNBSEQ-E25)



图1 基于DNBSEQ-G99平台的全流程示意图 (~24样本)



图2 靶向基因测序产品路线

## 数据展示 (DNBSEQ-G99)

### ■ 测试样本

选取痰液样本、单菌培养物样本、国家标准品样本来源的核酸样本及1例阴性样本共计24例,完成建库、测序和分析的全流程, DNBSEQ-G99ARS平台测序结果如下表所示,数据产出112.31M reads, Q30达95.87%, 拆分率为93.04%, 测序数据质量优异, 满足分析需求

表2 测序数据

	Total reads (M)	Q30 (%)	SplitRate (%)
下机结果	112.31	95.87	93.04

## ■ 序列检测结果

24例样本的序列检测结果如下图所示, MTB阳性样本的100×覆盖度(%)均达到90%以上, MTB阳性样本鉴定结果全部为positive;内参(GAPDH)是指引入了以人GAPDH基因作为模板所设计的引物, 可以作为样本的质控指标, 标准品和单菌培养物样本中不含有源基因组, 因此内参(GAPDH)占比%为0;在单样本3M reads的推荐数据量条件下, 序列检测结果佳, 满足不同类型样本的后续分析需求;

表3 24例样本序列检测结果总览

样本名称	样本类型	有效reads	结核分枝杆菌reads相对比例(%)	1×覆盖(%)	100×覆盖(%)	MTB鉴定结果	内参(GAPDH)reads	外参reads	结核分枝杆菌reads	内参(GAPDH)占比(%)	外参占比(%)	判定
1	痰液	5146010	97.11	100	98.46	Positive	2686	142965	4800090	0.05	2.78	PASS
2	痰液	5788876	99.84	100	100	Positive	69	9002	5542659	0	0.16	PASS
3	痰液	5823218	99.98	100	100	Positive	6	958	5645869	0	0.02	PASS
4	痰液	5819392	99.97	100	100	Positive	2	1906	5608538	0	0.03	PASS
5	痰液	5786734	99.98	100	100	Positive	42	903	5602553	0	0.02	PASS
6	痰液	5668554	99.83	100	100	Positive	122	9015	5420242	0	0.16	PASS
7	痰液	5707164	93.37	100	100	Positive	2424	359993	5068560	0.04	6.31	PASS
8	痰液	5803756	99.9	100	100	Positive	23	5700	5565849	0	0.1	PASS
9	痰液	5777082	99.74	100	100	Positive	16	14224	5508454	0	0.25	PASS
10	痰液	5666674	22.07	99.98	97.99	Positive	360	4209089	1191795	0.01	74.28	PASS
11	痰液	5723198	98.4	100	100	Positive	157	87700	5381639	0	1.53	PASS
12	痰液	5794532	99.98	100	100	Positive	3	852	5613262	0	0.01	PASS
13	痰液	5091964	97.56	100	97.09	Positive	2909	119048	4764541	0.06	2.34	PASS
14	痰液	5751950	99.85	100	100	Positive	44	8162	5504996	0	0.14	PASS
15	痰液	5792116	99.98	100	100	Positive	0	856	5616091	0	0.01	PASS
16	痰液	5785048	99.96	100	100	Positive	6	2079	5559192	0	0.04	PASS
17	痰液	5806896	99.98	100	100	Positive	78	1200	5621252	0	0.02	PASS
18	痰液	5654510	97.89	100	100	Positive	173	114269	5297297	0	2.02	PASS
19	单菌培养物	1004984	100	100	100	Positive	0	42	985334	0	0	PASS
20	单菌培养物	5771786	99.97	100	100	Positive	0	1580	5577239	0	0.03	PASS
21	单菌培养物	4611074	99.99	100	100	Positive	0	529	4472212	0	0.01	PASS
22	单菌培养物	879688	100	100	99.03	Positive	0	22	863971	0	0	PASS
23	耐药参考品	5623214	93.8	99.77	99.77	Positive	1	317378	4801624	0	5.64	PASS
24(NG)	阴性对照	3040686	0.01	53.81	0	Negative	1	3039023	424	0	99.95	Low Coverage

\*备注:

结核分枝杆菌reads相对比例:[结核分枝杆菌reads/(结核分枝杆菌reads+外参reads)] \* 100%。

内参(GAPDH)占比(%):[内参(GAPDH)reads/有效reads] \* 100%

外参占比(%):[外参reads/有效reads] \* 100%

100x覆盖≥90%,判定为"PASS", 否则判定为"Low Coverage"。

## ■ 单菌样本检测结果

24例样本中, 13~16号样本是单菌培养物样本, 23号样本为已知表型药敏结果和耐药位点信息的国家标准参考品样本 (来源<http://aoc.nifdc.org.cn/sell/home/search.html>, 已知信息见表4)。这些样本都经过华大智造结核分枝杆菌全基因组测序流程和MTB-Explorer的全基因组分析模块分析, 对两种方案的鉴定结果、耐药变异检出结果进行一致性比较, 用于评估ATOplex测序方案的准确性。单菌培养物样本 (13~16号) 的ATOplex报告结果与WGS方法鉴定到的结果一致(未展示)。

23号参考品的ATOplex测序方案报告结果提示该样本具有利福平和异烟肼耐药, 共计检出4个《目录》1收录的耐药相关突变位点。其中, 乙硫异烟胺(ethionamide, ETH)是异烟肼(isoniazid, INH)的类似物, 变异inhA\_c-777t (fabG1\_c-15t)是这两种药物的共有耐药相关变异位点, 被检出; 其他已知位点均被检出(表5)。此外, ATOplex和WGS测序方案检出embB\_M306I变异, 突变频率为99.85%, 为乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)耐药相关变异。

表4 国家标准品 (23号样本) 的已知耐药和变异信息

样本号	菌株编号	表型耐药	基因突变位点
23	94024'	IR(利福平、异烟肼耐药)	rpoB 526、inhA -15、katG 315

表5 国家标准品 (23号样本) 检出的耐药相关变异及信息

序号	变异 (通用名)	基因	核苷酸突变	氨基酸突变	覆盖深度	突变频率 (%)	药物	耐药置信水平	与参考品说明书的信息对比*	与全基因组分析结果对比
1	rpoB_H445Y	rpoB	c.1333C>T	p.His445Tyr	8090	99.58%	RIF	Assoc w R	一致	一致
2	inhA_c-777t (fabG1_c-15t)	fabG1	c.-15C>T	NA	1726	99.42%	ETH	Assoc w R	一致	一致
3	inhA_c-777t (fabG1_c-15t)	fabG1	c.-15C>T	NA	1726	99.42%	INH	Assoc w R	一致	一致
4	katG_S315T	katG	c.944G>C	p.Ser315Thr	24251	99.88%	INH	Assoc w R	一致	一致
5	embB_M306I	embB	c.918G>A	p.Met306Ile	23825	99.85%	EMB	Assoc w R	不一致	一致

\*备注:

分枝杆菌的存在两种注释编码系统2, 国家标准品和常规分子耐药检测试剂盒均依据Escherichia coli(GenBank Vo0339)进行编码, 基于测序方法的工具依据M.tuberculosis H37RV(GenBank AL123456)进行注释编码, 因此, 我们在与参考品说明书中的信息比较一致性时, 对两种系统进行了换算

## ■ 痰液样本检测结果

对18例痰液样本用常规分子耐药检测试剂盒进行检测 (DNA微阵列芯片, 检测突变包括rpoB 511、513、516、526、531、533; inhA -15和KatG 315), 并与ATOplex测序方案报告的结果相比较, 用于评估方案的检测性能(表6)。分子耐药法共检出10例样本具有rpoB耐药变异, ATOplex测序方案全部检出(表6, 绿色), 其他分子耐药法未报告耐药的8例样本, ATOplex测序方案检出一例具有rpoB\_H526Y利福平耐药变异, 7例具有katG\_S 315T异烟肼耐药变异(表6, 橙色), ATOplex测序方案能够提供更全面的耐药变异信息。

表6 18例混合痰液样本ATOplex结果与芯片结果比较

检测方法/样本数 (例)	DNA微阵列芯片检测变异				
	rpoB耐药变异	katG耐药变异	无变异 (敏感)	合计	
ATOplex测序报告结果	rpoB耐药变异	10	0	1 (rpoB_H526Y)	11
	katG耐药变异	0	0	7(katG_S 315T)	7
	无耐药相关变异	0	0	0	0
	合计	10	0	8	18

## 报告展示

### ■ 基本信息报告

MTB-Explorer分析软件能够对同一批次分析的所有样本生成汇总报告, 点击对应链接可打开单个样本报告。

以7号痰液样本作为示例展示(图3), 基本信息页面展示样本的分枝杆菌鉴定结果, 分枝杆菌感染类型, 样本中分枝杆菌的丰度比例 (MTB reads/NTM reads %), 轮状图展示出7号样本所检出的15种药物对应的耐药变异位点的个数。

样本名称	分枝杆菌感染类型	分枝杆菌丰度(%)
Sample7	Mixed	MTB(62.37); NTM(8.62)

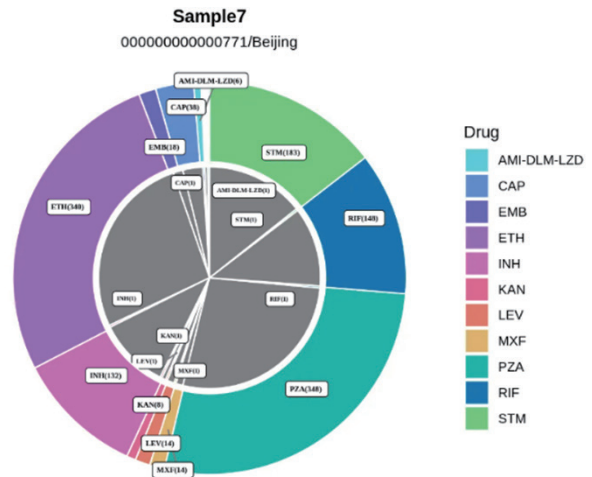


图3 基本信息和耐药结果总览

备注: 标题表示该样本的名称和谱系, 彩色外圈表示WHO收录的与抗结核药耐药相关的变异数目, 灰色内圈表示该样本所检测到的对应的耐药基因变异数目。

单样本报告还展示目标扩增区域的实际覆盖深度图(样本7, 图4), 可直观的查看目标区域覆盖的均一性。

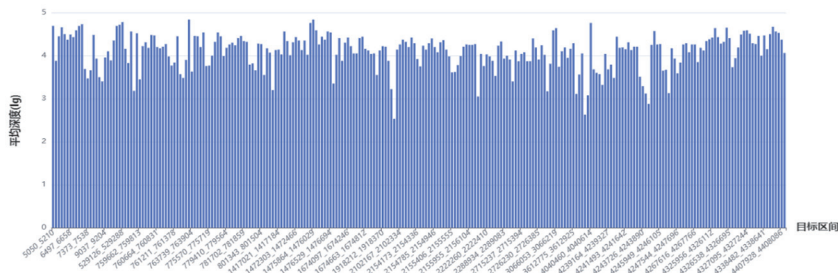


图4 7号样本目标区域深度图示例

## ■ 突变与耐药报告

突变检测报告页面如下(图5),页面包含突变数目统计结果(图5,表5),耐药相关突变结果(图5,表5.1);不确定显著性突变和耐药不相关突变结果(图5.表5.2,未完全展示);5.3其他突变(图5.表5.3,未完全展示),报告展示每个变异位点的突变频率、突变深度、耐药置信水平注释;耐药变异报告页面还展示样本的IGV图(图6),为每个变异在基因组上对应位置的突变碱基的深度情况提供可视化窗口。

◆ 5. 突变数目统计

变异总数目	WHO收录耐药突变数目	耐药相关突变数目	不确定显著性突变、耐药不相关突变数目	其他突变数目
	68	8	58	64

注1: 点击“此处”查看“倍峰分枝树聚类总体突变目录及其与耐药的相关性”。  
注2: “耐药相关突变”及“不确定显著性突变、耐药不相关突变”为WHO收录的结果耐药突变名称中的对应分类突变,具体见表5.1和5.2。

◆ 5.1 耐药相关突变

基因	位置	野生核酸	突变核酸	核苷酸突变	氨基酸突变	覆盖深度	突变频率(%)	突变深度	药物	耐药置信水平	参考来源
<i>gyrA</i>	7,570	C	T	c.269C>T	p.Ala90Val	642	99.38%	638	LEV	Assoc w R	WHO 2021
<i>gyrA</i>	7,570	C	T	c.269C>T	p.Ala90Val	642	99.38%	638	MXF	Assoc w R	WHO 2021
<i>gpoB</i>	761,139	C	T	c.1333C>T	p.His440Tyr	8,603	99.50%	8,560	RIF	Assoc w R	WHO 2021
<i>rpsL</i>	781,687	A	G	c.128A>G	p.Lys43Arg	26,343	99.86%	26,305	STM	Assoc w R	WHO 2021
<i>ms</i>	1,473,246	A	G	n.1401A>G	NA	7,546	87.99%	6,640	AMI	Assoc w R	WHO 2021
<i>ms</i>	1,473,246	A	G	n.1401A>G	NA	7,546	87.99%	6,640	CAP	Assoc w R	WHO 2021
<i>ms</i>	1,473,246	A	G	n.1401A>G	NA	7,546	87.99%	6,640	KAN	Assoc w R	WHO 2021
<i>katG</i>	2,155,168	C	G	c.944G>C	p.Ser315Thr	19,656	99.92%	19,640	INH	Assoc w R	WHO 2021

◆ 5.3 其他突变

基因	位置	野生核酸	突变核酸	核苷酸突变	氨基酸突变	覆盖深度	突变频率(%)	突变深度
<i>gyrA</i>	7,619	C	T	c.318C>T	p.Arg105Arg	643	3.11%	20
<i>Rv1313c</i>	1,471,679	C	T	c.-2174G>A	NA	14,228	99.76%	14,194
<i>Rv1313c</i>	1,472,240	GAC	CAT	c.-2737_-2735delGT--	NA	18,589	9.04%	1,680
<i>Rv1313c</i>	1,472,282	TTCCACCATGGACGA--	GTTAGCATCGAAGA--	c.-2810_-2777delATC--	NA	6,704	17.08%	1,145
<i>Rv1313c</i>	1,472,285	ACCATCGACGAAAG--	GCCAGTGAAGCAAG--	c.-2809_-2780delTC--	NA	6,704	3.57%	239
<i>Rv1313c</i>	1,472,285	ACCATCGACGAAAG--	GCCAGTGAAGCAAG--	c.-2809_-2780delTC--	NA	6,704	6.18%	414
<i>Rv1313c</i>	1,472,324	G	C	c.-2819C>G	NA	7,682	5.21%	400
<i>Rv1313c</i>	1,472,325	G	C	c.-2820C>G	NA	7,722	17.13%	1,323
<i>Rv1313c</i>	1,472,332	A	G	c.-2827T>C	NA	43,108	3.14%	1,353
<i>Rv1313c</i>	1,472,333	G	A	c.-2828C>T	NA	42,982	3.02%	1,297
<i>Rv1313c</i>	1,472,349	A	C	c.-2844T>G	NA	46,674	3.63%	1,694
<i>Rv1313c</i>	1,472,644	CGCC	TGCT	c.-3142_-3139delGG--	NA	30,120	9.08%	3,006
<i>Rv1313c</i>	1,472,647	C	T	c.-3142G>A	NA	30,120	6.85%	2,054
<i>Rv1313c</i>	1,472,655	GTGGGT	TTGGGC	c.-3155_-3150delAAC--	NA	28,872	46.72%	13,489

◆ 5.2 不确定显著性突变、耐药不相关突变

变异(通用名)	基因	位置	野生核酸	突变核酸	核苷酸突变	氨基酸突变	覆盖深度	突变频率(%)	突变深度	药物	耐药置信水平	参考来源
<i>gyrA_E21Q</i>	<i>gyrA</i>	7,362	G	C	c.61G>C	p.Glu21Gln	5,678	99.93%	5,674	LEV	Not assoc w R	WHO 2021
<i>gyrA_E21Q</i>	<i>gyrA</i>	7,362	G	C	c.61G>C	p.Glu21Gln	5,678	99.93%	5,674	MXF	Not assoc w R	WHO 2021
<i>gyrA_S95T</i>	<i>gyrA</i>	7,585	G	C	c.284G>C	p.Ser95Thr	642	100.00%	642	LEV	Not assoc w R	WHO 2021
<i>gyrA_S95T</i>	<i>gyrA</i>	7,585	G	C	c.284G>C	p.Ser95Thr	642	100.00%	642	MXF	Not assoc w R	WHO 2021
<i>gyrA_G988D</i>	<i>gyrA</i>	9,304	G	A	c.2003G>A	p.Gly688Asp	15,682	99.80%	15,650	LEV	Not assoc w R	WHO 2021
<i>gyrA_G988D</i>	<i>gyrA</i>	9,304	G	A	c.2003G>A	p.Gly688Asp	15,682	99.80%	15,650	MXF	Not assoc w R	WHO 2021
<i>mshA_A187V</i>	<i>mshA</i>	575,907	C	T	c.560C>T	p.Ala187Val	11,476	99.81%	11,454	ETH	Uncertain sig--	WHO 2021
<i>mshA_A187V</i>	<i>mshA</i>	575,907	C	T	c.560C>T	p.Ala187Val	11,476	99.81%	11,454	INH	Not assoc w R	WHO 2021
<i>ccsA_Q245M</i>	<i>ccsA</i>	620,625	A	G	c.735A>G	p.Ile245Met	2,776	99.86%	2,772	AMI	Not assoc w R	WHO 2021
<i>ccsA_Q245M</i>	<i>ccsA</i>	620,625	A	G	c.735A>G	p.Ile245Met	2,776	99.86%	2,772	CAP	Not assoc w R	WHO 2021
<i>mmpL5_I948V</i>	<i>mmpL5</i>	775,639	T	C	c.2842A>G	p.Ile948Val	11,195	99.84%	11,177	BDQ	Not assoc w R	WHO 2021
<i>mmpL5_I948V</i>	<i>mmpL5</i>	775,639	T	C	c.2842A>G	p.Ile948Val	11,195	99.84%	11,177	CFZ	Not assoc w R	WHO 2021
<i>mmpL5_T794I</i>	<i>mmpL5</i>	776,100	G	A	c.2381C>T	p.Thr794Ile	14,407	99.64%	14,355	BDQ	Not assoc w R	WHO 2021
<i>mmpL5_T794I</i>	<i>mmpL5</i>	776,100	G	A	c.2381C>T	p.Thr794Ile	14,407	99.64%	14,355	CFZ	Not assoc w R	WHO 2021

图5 7号样本突变检测报告

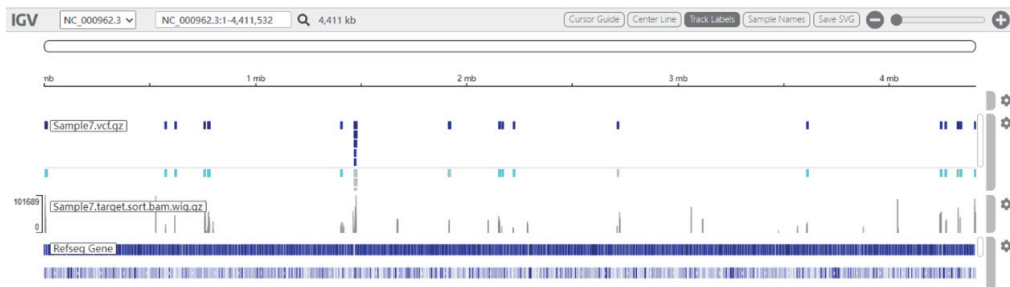


图6 7号样本的IGV图





## 总结

华大智造推出ATOPlex结核分枝杆菌扩增测序组合产品, 靶向区域覆盖全面, 全流程速度快, 数据质量优异, 软件功能强大, 能够为结核分枝杆菌复合群鉴定、分型、分枝杆菌物种鉴定、变异检测, 耐药预测, 进化溯源分析等提供强大的工具支撑。

## Reference

1. World Health Organization, Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance, Geneva: World Health Organization, 2021.
2. Andre E. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria. Clin Microbiol Infect. 2017 Mar;23(3):167-172.

## 订购信息

产品类型	产品名称	规格	货号
仪器	DNBSEQ-G99ARS 基因测序仪	/	900-000608-00
	DNBSEQ-G99RS 基因测序仪	/	900-000611-00
	DNBSEQ-E25RS 基因测序仪	/	900-000490-00
	DNBSEQ-E25ARS 基因测序仪	/	900-000473-00
试剂	ATOPlex MTB建库试剂盒套装	96 RXN	940-001601-00
	ATOPlex MTB建库试剂盒套装	576 RXN	940-001599-00
	DNBSEQ 一步法DNB制备试剂盒 V4.0	4 RXN	940-001654-00
	DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装	G99 FCL PE150	940-001269-00
	DNBSEQ-E25RS 高通量测序试剂套装	FCL PE150	940-000567-00
软件	MTB-Explorer软件	/	970-000385-00
	MTB-Explorer软件 (16人份)	/	970-000397-00
服务器	微生物快速识别平台(PFI)	/	900-000392-00

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

✉ MGI-service@mgi-tech.com

🌐 mgi-tech.com ☎ 4000-688-114



官方微信



官方中文网站

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、拷贝、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。