

华大智造ATOplex猴痘病毒靶向扩增测序组合产品助力深圳首次猴痘疫情的流行病学、遗传特征和临床表征调查

深圳市疾病预防控制中心利用华大智造ATOplex猴痘病毒靶向扩增测序组合产品，对所有确定的猴痘阳性病例分别进行了全基因组测序，完成深圳首例猴痘病例病毒溯源。对深圳首次爆发的猴痘疫情进行了全面的检测和流行病学研究，旨在为未来有效预防猴痘疫情再次爆发和应对策略建立强有力的参考。

相关成果于2023年发表于*Biosafety and Health*上，题目为 “Investigation into the epidemiology, genetic characteristics, and clinical manifestations of the first monkeypox outbreak in Shenzhen, China”¹。

推荐应用：病原微生物-猴痘病毒的鉴定和溯源

推荐机型：DNBSEQ-G99RS, DNBSEQ-E25RS, MGISEQ-200RS, MGISEQ-2000RS

• ATOplex平台赋能猴痘的精准靶向检测与溯源

利用基于ATOplex多重PCR技术开发的猴痘病毒靶向扩增测序组合产品，可以快速、精准、靶向对猴痘病毒进行快速鉴定及病毒溯源，为猴痘疫情进行实时监控。

• 完整的猴痘检测与溯源组合产品

此组合产品涵盖核酸提取与文库构建试剂盒、自动化系统、DNBSEQ测序平台和生信分析软件，全方位赋能猴痘的检测与溯源。

• 自动化系统高度匹配样本处理与建库全流程

猴痘的核酸提取，文库构建均可借助华大智造自研的自动化平台实现高效、快捷的实验流程。

• 测序数据产出高效且质量高

DNBSEQ测序技术具有高准确性，低重复序列率以及低标签跳跃等重要特性；而DNBSEQ-G99测序速度快，内置计算模块，测序生信一体化，4.5小时即可完成SE100+10+10测序，数据产出高效且优质。



背景介绍

猴痘是由猴痘病毒(MPXV)引起的一种人畜共患传染病，主要在西非和中非森林地区发生零星感染和暴发。1958年，猴痘病毒在丹麦在用于研究的猴子身上首次发现。1970年，在刚果民主共和国的一名9个月龄男婴身上发现了人类感染的第一例病例。这种疾病的流行病学范式在2022年发生了转变，病毒蔓延到其流行地区以外，导致多个国家出现病例。截至2023年6月，猴痘已渗透到全球111个国家或地区。这种显著的地理传播和随后的国际影响促使世界卫生组织(WHO) 于2022年7月将猴痘列为国际关注的突发公共卫生事件。中国国家卫生健康委决定，自2023年9月20日起将猴痘纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病进行管理，采取乙类传染病的预防、控制措施。

该病发病特征主要是皮疹，有些人可能首先出现发热、肌痛或咽痛。皮疹通常从面部开始，然后蔓延至全身，皮疹开始时是扁平疮，然后发展成充满液体的水泡，可能会发痒或疼痛。皮疹愈合后，病灶处变干，然后结痂并脱落^{2,3}。

MPXV是一种长度为197kb的双链DNA病毒，由大约200个基因组成。核酸扩增和血清学检测能以低成本快速诊断猴痘病例，但这些检测不能用于监测MPXV的来源、谱系、传播和基因组变异。新出现的变异可能会使得样本中的病毒载量被低估，甚至导致误诊⁴，然而基因组学则可实现猴痘病毒快速准确鉴定及溯源，具有灵敏度高、特异性高、低假阳性率等特点。

研究描述

2023年6月8日22时，深圳市疾病预防控制中心接到福田区疾控中心通报的一例猴痘疑似病例，并立即抽调人员开展流行病学调查。收集了大量样本用于猴痘病毒的分子检测和病毒测序。

本次病毒溯源采用基于华大智造ATOplex多重PCR技术开发的猴痘病毒靶向扩增测序组合产品完成了MPXV的全基因组测序，并确定了突变位点、共有序列和猴痘病毒谱系，最终在短时间内得到了高度可信的毒株序列全长。

实验方法

样本准备

指示病例（病例1）在治疗新冠期间发现猴痘病毒感染。后续病例（病例2和病例3）是在筛查其密切接触者时发现。三例病例均为未婚男性，年龄分别为25、27和26岁，自2023年5月起均居住在深圳，无国际旅行史，无与海外个人或动物接触史。

在三例患者发烧期间，对患者进行了SARS-CoV-2抗原检测，收集了大量样本，包括鼻咽拭子、口咽拭子、水泡液、血液（抗凝剂和非抗凝剂）、肛门拭子和尿液样本，用于猴痘病毒的分子检测和病毒基因组测序。

猴痘病毒核酸提取及纯化使用商业化试剂盒（qEx-DNA/RNA病毒，天龙科技）和核酸提取仪

（天龙GeneRotex96，天龙科技），利用约200μL充分混合的样本溶液（包括血清、皮疹物质、结痂、水泡液和疑似患者的口咽或鼻咽分泌物）进行核酸提取，提取后的核酸样本分别进行荧光PCR检测和猴痘全基因组测序。

文库制备及测序

华大智造 ATOplex 猴痘病毒靶向扩增测序组合产品基于华大智造 ATOplex 平台 (<https://ato-plex.mgi-tech.com/>) 针对猴痘参考基因组 (NC_063383.1) 进行引物设计并优化开发，靶向性对猴痘病毒基因组进行富集和测序文库构建。本研究利用该组合产品及 10μL 提取的病毒 DNA 进行测序文库构建，详细流程可参见相关说明书。所制备文库在 DNBSEQ-G99 上以 SE100+10+10 的策略完成测序。值得关注的是，该组合产品集成了华大智造的自动化提取和建库平台，在大样本情形下可极大的节约人力并提高效率。

分析流程

使用华大智造MPXV软件对测序数据进行分析，以确定突变位点、共有序列和猴痘病毒谱系。使用带有默认选项的 bwa mem 算法将高质量测序读数与猴痘参考基因组 (NC_063383.1) 进行比对⁵。随后使用Freebayes软件进行变异检测⁶，仅保留频率大于40%的突变位点。得出了组装的共有序列，从而确定猴痘病毒的谱系。

核酸提取 (~1h)	建库 (~9h)	测序 (~5-50h)	分析 (~1-3h)
 • MGIEasy 微生物DNA提取试剂盒 (MD01T-99)  MGISP-960RS	 ATOPlex MPXV 建库试剂盒套装  • MGISP-100RS 或  • MGISP-960RS 或  • DNBElab-D4	 • DNBSEQ-G99RS • SE100, ~5 h • PE150, ~12h 或  • DNBSEQ-E25RS • SE100, ~5 h • PE150, ~20h 或  • MGISEQ-200RS • SE100 (FCS), ~10 h • SE100 (FCL), ~13 h • PE150 (FCS), ~28 h • PE150 (FCL), ~40 h 或  • MGISEQ-2000RS • SE100 (FCS), ~13 h • SE100 (FCL), ~25 h • PE150 (FCS), ~31 h • PE150 (FCL), ~50 h	 MGI MPXV组装溯源软件 • SE100/5M: ~1h /16 样本 • SE100/20M: ~2.5h/16 样本 • PE150/1.5 M: ~50 min /16 样本 • PE150/6 M: ~3 h /16 样本  微生物快速识别平台

结果

实时定量荧光PCR和SARS-CoV-2抗原检测

首先开展了猴痘病毒的实时荧光定量PCR鉴定和SARS-CoV-2抗原检测。如表1所示，三个病例的鼻咽拭子和疱疹拭子均为猴痘病毒阳性，其中两个病例的口咽拭子和肛门拭子也为阳性。每个患者在发热期间的SARS-CoV-2抗原检测均为阳性，表明存在二次感染，因此无法排除相关症状是由SARS-CoV-2感染引起的可能性。

样本	病例1	病例2	病例3
鼻咽拭子	35	35	37
口咽拭子	阴性	29	31
疱液	31	27	34
肛门拭子	28	34	阴性
尿液	阴性	阴性	阴性
鼻咽拭子(SARS-CoV-2 抗原检测)	阳性	阳性	阳性

表1. 三例样本实时定量荧光PCR和SARS-CoV-2抗原检测结果

猴痘病毒全基因组测序鉴定及溯源分析

如图1所示，利用从GISAID收集的不同MPXV谱系，与本研究分析的3个MPXV序列进行比对，基于极大似然估计法构建了不同MPXV谱系的系统

发育树。随后将本研究中的3例MPXV序列和从GISAID下载的45个MPXV序列（样本收集时间为2023年1月1日至2023年7月3日）进行进一步比对而构建了系统发育树如图2所示，再通过基因组测序的Nextclade分析（<https://clades.nextstrain.org/>），结果显示3例深圳病例均感染了人类猴痘病毒（hMpxV, B.1.3进化分支）。

为了进一步探索本研究中三个病例与全球其他猴痘病例的基因组相关性，基于核心基因组SNP，利用从GISAID下载的2023年以来71例猴痘病例的基因组序列，使用极大似然估计法以及iTOL优化构建了一个包含6个国内案例的进化树（3例来自深圳，2例来自重庆，1例来自杭州）。结果显示深圳和杭州病例属于同一进化分支，具有高度的同源性。深圳的中国-SZ-2023-06-case3株是由中国-SZ-2023-06-case2株基因组经过持续进化和突变产生的新变异株，不能排除病例1、2和3属于同一传播链的可能性。后续进一步对全球所有B.1.3基因序列进行系统发育树分析，发现深圳和杭州四例本地病例与近期日本猴痘病例处于同一进化分支上。从进化的角度来看，这四个中国病例与2023年1月、2月和3月收集的日本株系（GISAID ID: EPI_ISL_17445514, EPI_ISL_17445515, EPI_ISL_17692269）高度同源。

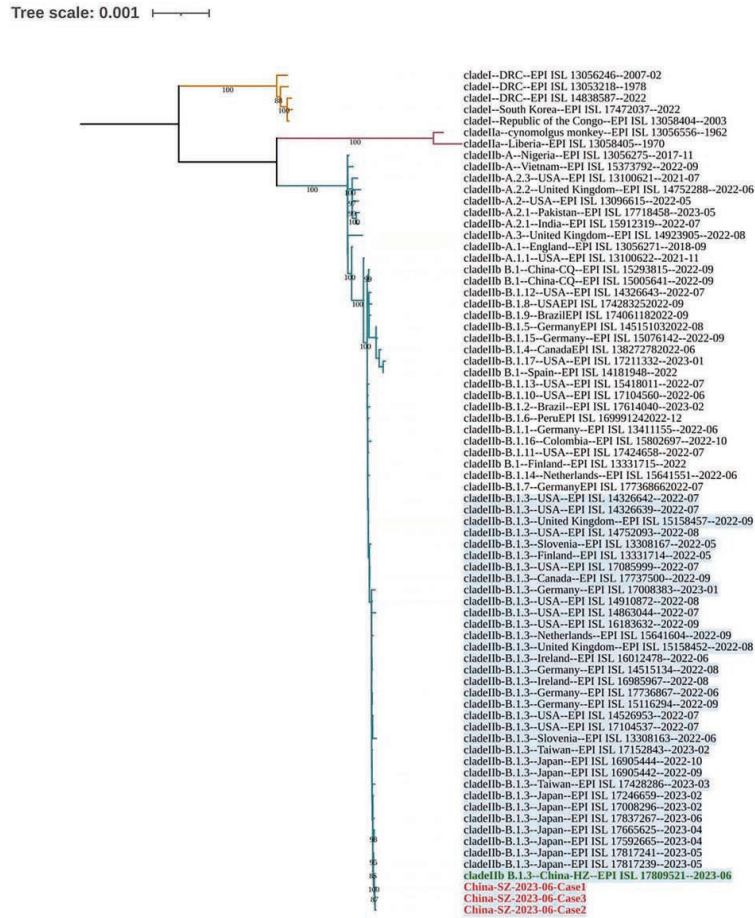


图1. 基于极大似然估计法构建的MPXV不同谱系的系统发育树

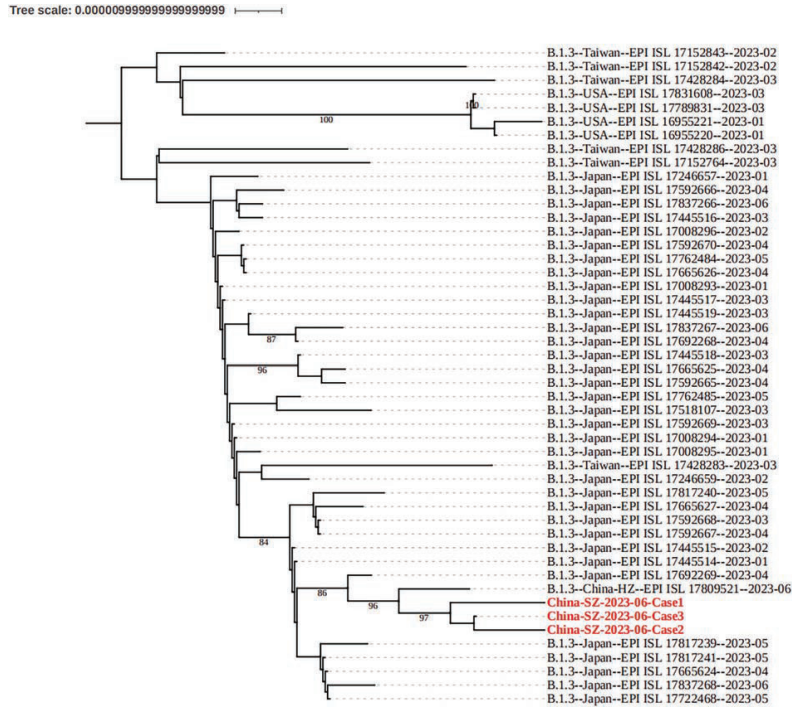


图2. 在中国深圳发现的3个MPXV案例与从GISAID下载的45个MPXV全基因组序列（样本采集时间为2023年1月1日至2023年7月3日）比对构建的系统发育树

仅供研究使用，不适用于临床诊断

总结

本研究以深圳发现的三例猴痘疑似病例为研究对象，利用华大智造推出的基于ATOPllex多重PCR技术开发的猴痘病毒靶向扩增测序组合产品，该组合产品中除了猴痘病毒提取纯化及靶向建库试剂外，还包含华大智造DNBSEQ测序平台和MPXV分析软件以及DNBelab-D4、MGISP-100或MGISP-960高通量自动化文库制备系统等，实现从样本到报告的全流程支持，对猴痘病毒进行全长基因组检测，同时也可对病毒进行相对定量。该全流程方案在此次深圳猴痘疫情防控过程中起到了重要作用，为猴痘病毒的监测与溯源提供了强大的工具。

该猴痘疫情的研究和观察奠定了监测和流行病信息报告在管理和控制未来疫情中发挥关键作用的基础。全面的流行病信息报告系统有助于提供实时动态更新并帮助当局做出迅速决策。鉴于人员的全球流动特征，应重点关注和加强深圳乃至世界其他地区的监控系统。

参考文献

1. J. Wan, et al. Investigation into the epidemiology, genetic characteristics, and clinical manifestations of the first monkeypox outbreak in Shenzhen, China. Biosafety and Health. 2023.
2. WHO, 2022–23 Mpox (monkeypox) outbreak: Global trends, World Health Organization produced on June 13 2023. https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/, 2023 (accessed 6 June 2023).
3. N. Girometti, et al. Demographic and clinical characteristics of confirmed human monkeypox virus cases in individuals attending a sexual health centre in London, UK: an observational analysis. Lancet Infectious Diseases. 2022.
4. CC. Wu, et al. Rapid identification of full-length genome and tracing variations of monkeypox virus in clinical specimens based on mNGS and amplicon sequencing. Virologica Sinica. 2023.
5. H. Li, et al. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler Transform. Bioinformatics. 2009.
6. E. Garrison, et al. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing [Preprint]. arXiv. 2012.



DNBSEQ-G99RS 基因测序仪



MGISP-100自动化样本制备系统

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	DNBSEQ-G99ARS 基因测序仪	900-000560-00
	MGISP-100RS 基因测序文库制备仪	900-000070-00
	高通量自动化样本制备系统MGISP-960RS	900-000093-00（配置2）
		900-000107-00（配置7）
软件	MGI MPXV 组装溯源软件	970-000525-00
提取试剂	MGIEasy 微生物 DNA 提取试剂盒（MD01T-96，96人份/盒）	1000027955
建库试剂	ATOPlex MPXV建库试剂盒套装（96 RXN）	940-002482-00
	DNBSEQ 一步法 DNB 制备试剂盒 OS-DB（4 RXN）	1000026466
测序试剂	DNBSEQ-G99RS高通量测序试剂套装（G99 FCL PE150）	940-001269-00

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。

版本：2024年12月版

撰稿：赵静
责任编辑：王其伟
审稿：江遥