

基于全基因组测序的肺结核病原学诊断

产品介绍



泽塔生物科技（上海）有限公司

二零一七年二月

肺结核病原全基因组测序诊断

简介

耐药结核 (Drug-resistant tuberculosis) 是控制结核病一个重要的挑战。除耐多药结核(MDR-TB)外 泛耐药结核(XDR-TB)也在近年出现。

耐药结核的临床管理十分复杂。处方药物有耳毒性，肾毒性，肝毒性，致泻，呕吐及生理失调等副作用。在没有获得药物敏感试验结果之前，患者可能被迫接受无效并带有副作用的化学治疗。如果有一种病原检测方法，可以一次性进行所有的药物抗性测试，并且在临床所需要的短时间内返回医师富有诊断价值的信息，那么这对患者是十分有益的。分枝杆菌的耐药性基本上是其自身的遗传突变导致的，这使得遗传学检测能够得到可靠的表型信息。根据已发现的遗传突变开发，已经有商业化的，经过FDA许可，WHO推荐的结核分枝杆菌遗传检测试剂盒出售。由于技术本身的局限，市场销售的基于探针/引物的分子诊断，药物敏感试验只检测有限的几个目标区域，得到有限的药物敏感测试结果。

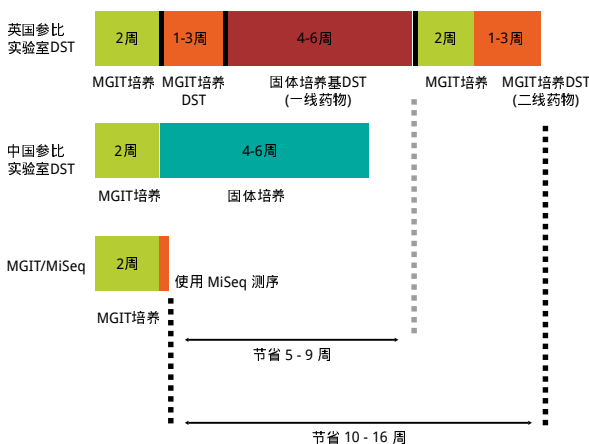


图 1: 全基因组测序和现有鉴定药敏手段周期比较

微生物全基因组测序方法使得结核一站式诊

断成为现实。通过对培养阳性的分枝杆菌进行全基因组测序，不仅可以获得直接的一线 and 二线抗结核药物的耐药信息，还可以获得高分辨率分子分型。

现实中的感染，由于相当比例的NTM的存在，进行菌种特异性的遗传突变-表型推测变得困难。ZetaBio使用自行开发的通用微生物基因组鉴定及分析系统MicrobeTrakar完成微生物WGS数据分析工作。使用ZetaBio的专利技术可以跳过传统的培养鉴定步骤，直接利用WGS数据得到可靠的微生物鉴定(根据 FDA/CDC/NIST 正在建立的标准)。得到可靠的物种识别后，MicrobeTrakar使用其内嵌的物种特异性遗传突变知识库进行表型推断。知识库中，所有的蛋白序列及突变知识全部经过专家人工和计算机程序校订。

MicrobeTrakar 是通用微生物鉴定分析系统，所以无论输入的检材实际是何种微生物，都可以得到正确的鉴定及表型推断。这使得NTM，口腔寄生菌污染造成的MGIT培养阳性得到区分，提供史无前例的诊断分辨力。

为快速获阳性培养，我们目前建议使用分枝杆菌快速培养生长指示管 (Mycobacterial Growth Indicator Tube, MGIT) 进行原始检材的微生物培养工作，然后对培养阳性的样本进行微生物全基因组测序检验。MicrobeTrakar 现在可以接受¹Illumina® 及 ²PacBio®RS 系列测序设备WGS文库策略的测序输出数据。尚不接受³Oxford Nanopore® 系统的原始数据，但可接受基因组拼装。

¹ Illumina Inc. 的注册商标

² Pacific Biosciences的注册商标

³ 美国牛津纳米孔公司的注册商标

	全基因组测序	线性探针	⁴ GeneXpert	MGIT液体培养	固体培养
实验通量	高	中	低	较高	中
药敏检测	一线、二线药物	INH/RIF	RIF	一、二和三线药物	一、二和三线药物
NTM鉴定	是	否	否	否	否
基因分型	是	否	否	-	-
测试成本	较高	中	较高	较低	低
污染影响	较小	小	小	大	中
检验周期	2-3周	2-3天	2-3小时	3-4周	6-8周

表 1: 病原学诊断手段比较

业务模式

ZetaBio 提供微生物WGS的数据分析API服务，同时接受数据递交方式的数据分析工作。如果客户单位没有测序能力，ZetaBio可以使用自身的供应链提供收样测试服务。如果提供生物样本，需要根据有关规范对其进行灭活处置。

步骤	周期
MGIT培养阳性样本 提取培养基总DNA	7-10d 2h
Illumina MiSeq/HiSeq测序 数据传输及分析	3-7d 1-2h
总周期3w	

表 2: 技术流程（拥有测序设备的诊断实验室）

性能

微生物全基因组测序在诊断性能上超过任何其他检验手段。除了可以直接鉴定感染的是何种分枝杆菌（47种，见表5），解决多年一直困扰临床的问题之外（临床培阳样本中含有20%左右的NTM）。对于肺结核诊断，MicrobeTrakr检验MTB的32个耐药相关蛋白（见表4），并根据近1000个突变知识点（见表3例子）对受测样本进行抗性表型判断，远超任何使用分子探针的技术。使用全基因组测序技术的优势：

- 识别分枝杆菌假阳性
- 比培养节省30天时间
- 完全评估32个耐药相关基因
- 数据分析通量每天196个样本
- 帮助制定合理的化疗方案

蛋白	位置	突变及影响
INH A	94	S → A: 造成 INH 和 ETH 抗性
INH A	148	D → G: 造成 吡啶霉素 抗性
INH A	158	Y → A: 催化活性降低1500倍
INH A	158	Y → F: 催化活性降低24倍
INH A	158	Y → S: 不影响催化活性

表 3: 精细可靠的突变知识库

结核分枝杆菌耐药相关蛋白			
RS12	UPPP	LPRG	PAND
FLQE2	RPOB	CH10	GYRA
SIGF	WHB7A	EMBC	DRRA
BLAC	EMBA	NAT	DNAK
A85B	AFTA	RECA	LEXA
INH A	TYSY	GRE A	DNAE2
AAC2	SYI	SSB	FLQE3
KATG	EMBB	MMR	TIG

表 4: TB耐药检测Panel

