



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114891908 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 12

(21) 申请号 202210731579.3

(22) 申请日 2022.06.25

(71) 申请人 上海交通大学医学院附属瑞金医院  
地址 200001 上海市黄浦区瑞金二路197号

(72) 发明人 瞿介明 徐燕萍 韩朋 饶冠华  
蒋智

(74) 专利代理机构 天津兆谦源专利代理事务所  
(普通合伙) 12265

专利代理师 许黛君

(51) Int. Cl.

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

C12R 1/01 (2006.01)

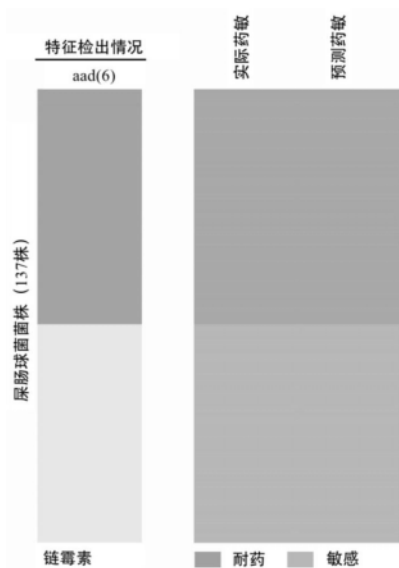
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合、试剂盒及测序方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合、试剂盒及测序方法,预测屎肠球菌对链霉素药敏表型的特征基因为aad(6),预测屎肠球菌对万古霉素药敏表型的特征基因为vanA和vanRB,预测屎肠球菌对替考拉宁药敏表型的特征基因为vanA,若基因检测结果为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药。通过检测特征组合中的基因的存在与否判断屎肠球菌对链霉素、万古霉素、替考拉宁的药敏表型。本发明提供的特征组合预测药敏表型的准确率高,有利于临床开展对屎肠球菌相关感染的精准治疗。



1. 一种用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合,其特征在于,抗生素包括链霉素、万古霉素和替考拉宁的一种或几种组合;

预测屎肠球菌对链霉素药敏表型的特征基因为aad (6),若基因检测结果为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药;和/或

预测屎肠球菌对万古霉素药敏表型的特征基因为vanA和vanRB,基因同时进行检测,若基因检测结果均为阴性,推测为敏感,若任一基因检测结果为阳性,推测为耐药;和/或

预测屎肠球菌对替考拉宁药敏表型的特征基因为vanA,若基因检测结果均为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药。

2. 含有权利要求书1所述用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合检测试剂的试剂盒。

3. 采用权利要求2所述试剂盒对屎肠球菌进行药敏表型的测序方法,其特征在于,采用全基因组测序方法或宏基因组测序方法。

## 用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合、试剂盒及测序方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因测序技术,具体说,是一种用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合、试剂盒及测序方法。

### 背景技术

[0002] 屎肠球菌是临床常见条件致病菌之一,可引起尿路感染、呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎和败血症等。近年来,由于临床介入性治疗及广谱抗菌药物的不合理使用,使肠球菌的固有耐药性和获得耐药性逐渐增强,耐药率逐年上升。尤其是耐万古霉素等屎肠球菌的出现给临床治疗带来了极大的困难。临床精准治疗需根据药敏检测结果和耐药基因表型检测结果选用抗菌药物。因此,建立准确、快速的检测方法对屎肠球菌进行耐药表型预测,对指导临床治疗十分重要。

[0003] 屎肠球菌对各类抗生素产生耐药可以通过靶位改变、产生各种酶类(如钝化酶、水解酶等)、获得可转移的耐药基因、主动外排等机制介导。例如,屎肠球菌对糖肽类抗生素(万古霉素等)的耐药机制主要是可产生一种前体作用在药物的末端,从而阻碍抗菌药物发挥抑制细菌细胞壁生物合成的作用,目前多项研究已经证实耐糖肽类等抗菌药物的耐药基因有VanA、VanB、VanC、VanD、VanE、VanG 6种,但不同基因对不同抗菌药物的耐药性存在差异。

[0004] 目前针对屎肠球菌耐药性检测的方法可分为表型检测和基因型检测。在表型检测方面,临床的主要方法是微生物培养+药敏实验,该方法存在培养时间长,培养阳性率低等局限性,而无法完全满足临床精准治疗的需求。在基因检测方面,主要是针对特定耐药基因进行检测,但未对抗生素耐药和敏感进行预测。因此急需寻找一种快速,不依赖于培养且一次全面检测临床常用抗生素药敏表型的方法以指导临床精准治疗。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种用于筛选屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合、试剂盒及用途,可一次性分析链霉素、万古霉素、替考拉宁3种抗生素耐药情况,具有较好的敏感性和特异性。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合,抗生素包括链霉素、万古霉素和替考拉宁的一种或几种组合;

[0007] 预测屎肠球菌对链霉素药敏表型的特征基因为aad(6),若基因检测结果为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药;和/或

[0008] 预测屎肠球菌对万古霉素药敏表型的特征基因为vanA和vanRB,基因同时进行检测,若基因检测结果均为阴性,推测为敏感,若任一基因检测结果为阳性,推测为耐药;和/或

[0009] 预测屎肠球菌对替考拉宁药敏表型的特征基因为vanA,若基因检测结果均为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药。

[0010] 含有上述用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合检测试剂的试剂盒。

[0011] 采用上述试剂盒对屎肠球菌进行药敏表型的测序方法,采用全基因组测序方法或宏基因组测序方法。

[0012] 本发明的有益效果是:本发明是基于核酸分子检测耐药的方法,可不依赖于临床培养,直接针对临床标本或其他方式取得的屎肠球菌基因组核酸检测本发明提供的耐药特征组合,根据检测结果预测其抗生素药敏表型,具有检测周期短,检测灵敏度高的特点。

### 附图说明

[0013] 图1是用于链霉素药敏表型预测的特征基因在公共数据库下载的屎肠球菌菌株中的检出结果(左半)与实际药敏表型结果和预测药敏表型结果之间的对应关系(右半)图。

[0014] 图2是用于万古霉素药敏表型预测的特征基因在公共数据库下载的屎肠球菌菌株中的检出结果(左半)与实际药敏表型结果和预测药敏表型结果之间的对应关系(右半)图。

[0015] 图3是用于替考拉宁敏表型预测的特征基因在公共数据库下载的屎肠球菌菌株中的检出结果(左半)与实际药敏表型结果和预测药敏表型结果之间的对应关系(右半)图。

### 具体实施方式

[0016] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述;显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0017] 本发明的用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合,抗生素包括链霉素、万古霉素和替考拉宁的一种或几种组合;

[0018] 预测屎肠球菌对链霉素药敏表型的特征基因为aad(6),若基因检测结果为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药;和/或

[0019] 预测屎肠球菌对万古霉素药敏表型的特征基因为vanA和vanRB,基因同时进行检测,若基因检测结果均为阴性,推测为敏感,若任一基因检测结果为阳性,推测为耐药;和/或

[0020] 预测屎肠球菌对替考拉宁药敏表型的特征基因为vanA,若基因检测结果均为阴性,推测为敏感,若基因检测结果为阳性,推测为耐药。

[0021] 含有上述用于预测屎肠球菌对抗生素药敏表型的特征基因组合检测试剂的试剂盒。

[0022] 采用上述试剂盒对屎肠球菌进行药敏表型的测序方法,采用全基因组测序方法或宏基因组测序方法。

[0023] 实施例1用特征组合对公共数据库中屎肠球菌的药敏表型进行预测

[0024] 1.1数据收集:收集公共数据库(NCBI NDARO数据库和PATRIC数据库)中屎肠球菌基因组信息及其对应抗生素药敏表型数据,其中万古霉素耐药株984株,敏感株853株;替考

拉宁耐药株114株,敏感株23株;链霉素耐药株71株,敏感株66株。

[0025] 1.2耐药基因检测:用ncbi-blast (v2.9.0+) 软件将组装好的基因组序列与耐药数据库进行比对(参数:-evaluate 1e-5-outfmt 0-num\_alignments 10000),进行上述耐药基因检测。与该耐药基因的参考序列的比对一致率高于90%且覆盖率高于60%,则认为有该耐药基因检出。

[0026] 1.3统计各屎肠球菌菌株中耐药基因的检出情况。

[0027] 1.4药敏结果预测:对于某一株菌的任一种抗生素的药敏预测,检测出特征组合中的任一种特征,则认为该菌株对该抗生素表型耐药;否则,则判断为敏感。通过各菌株中的检出的特征预测得到的药敏结果,和实际药敏表型高度一致。预测结果如表1所示,特征组合预测链霉素、万古霉素、替考拉宁的药敏表型准确率分别为1、0.994、1,特异性和敏感度也在较高的水平。以上结果说明,利用上述特征组合,对屎肠球菌表型耐药和表型敏感有较好的区分效果。

[0028] 表1.特征组合预测公共数据库来源菌株的药敏表型性能

抗生素	预测耐药/ 表型耐药	预测耐药/ 表型敏感	预测敏感/ 表型敏感	预测敏感/ 表型耐药	准确率	敏感度	特异性
[0029] 万古霉素	984	9	844	0	0.994	1	1
替考拉宁	114	0	23	0	1	1	0.989
链霉素	71	0	66	0	1	1	1

[0030] 实施例2用特征组合对临床标本分离的屎肠球菌菌株的药敏表型进行预测

[0031] 2.1样本采集:从某医院采集临床标本中分离的屎肠球菌435例,并收集相应的药敏结果。其中,万古霉素敏感耐药207株,敏感228株;替考拉宁耐药24株,敏感8株;链霉素耐药18株,敏感14株。

[0032] 2.2样本全基因组测序:对样本进行核酸提取、通过Qubit检测,确认DNA可以满足后续测序要求,对提取的核酸进行文库建库及高通量测序(Illumina Novaseq 6000PE150)。

[0033] 2.3测序数据质量控制:使用fastp (v0.19.5) 软件对得到的原始fastq序列数据进行过滤(参数设置:-q 15-u 40-l read\_length\*0.67),去除低质量和短序列;同时使用komplexity (v0.3.6) 软件计算序列信息复杂度(参数设置:-F-t 0.4),并过滤掉低复杂度的序列。

[0034] 2.4耐药基因检测:使用blastn (版本2.9.0+) 软件将reads序列与耐药基因参考序列进行比对。参考序列的比对一致率高于90%的reads大于1条,则认为有该耐药基因检出。

[0035] 2.5药敏表型结果判定:对于某一株菌的任一种抗生素的药敏预测,检测出特征组合中的任一种特征,则认为该菌株对该抗生素表型耐药;否则,则判断为敏感。将上述药敏预测结果与同时收集到的临床标本实际药敏测试结果进行对比,准确率(AUC),阳性符合率(PPV),阴性符合率(NPV),敏感度,特异性来均在0.9以上,检出结果总结于表2。以上结果说明,对实际收集的从临床标本中分离的屎肠球菌,利用相应特征组合也有着较高的准确率、敏感度和特异性,说明本发明有较高的实用价值。

[0036] 表2.特征组合预测医院收集的临床菌株药敏表型性能

	预测耐药/ 表型耐药	预测耐药/ 表型敏感	预测敏感/ 表型敏感	预测敏感/ 表型耐药	准确率	敏感度	特异性
[0037] 万古霉素	207	2	226	0	0.995	1	0.991
替考拉宁	24	0	8	0	1	1	1
链霉素	18	2	12	0	0.929	1	0.857

[0038] 实施例3用特征组合对临床标本中的屎肠球菌的药敏表型进行预测

[0039] 3.1样本采集:从某医院采集培养结果是屎肠球菌阳性患者的临床标本6例,样本类型包括肺泡灌洗液,痰液,血液,腹水,尿液。

[0040] 3.2样本高通量测序:对样本进行核酸提取、通过Qubit检测,确认DNA可以满足后续测序要求,对提取的核酸进行文库建库及高通量测序(Illumina CN500 SE75)。

[0041] 3.3测序数据指控,使用fastp(v0.19.5)软件对得到的原始fastq序列数据进行过滤(参数设置:-q 15-u 40-l read\_length\*0.67),去除低质量和短序列;同时使用komplexity(v0.3.6)软件计算序列信息复杂度(参数设置:-F-t 0.4),并过滤掉低复杂度的序列。

[0042] 3.4人源序列去除:将质控过滤得到的clean序列,使用bowtie2(v2.3.4.3)软件进行与人参考基因组序列(human\_38)进行比对(参数设置:--mm--very-sensitive-k 1),以过滤掉人源序列。

[0043] 3.5物种注释:使用SNAP(version beta1.0.18)软件single命令进行与微生物基因组序列数据库(收录序列来源于ncbi的refseq genome和genebank genome数据库)进行比对(参数设置:-map-d 3-F a-om 2-omax 5-xf 2.5),并采用LCA算法进行物种注释统计,最后统计检出病原菌特异性reads数和基因组覆盖度。

[0044] 3.6耐药基因鉴定:标准是使用blastn(版本2.9.0+)软件将reads序列与aad(6)、vanRB、vanA参考序列进行比对,比对一致率高于90%的reads大于1条,则认为有该耐药基因检出。

[0045] 3.7药敏表型预测:针对某一个抗生素,检测出特征组合中的任一种特征,则认为该菌株对该抗生素表型耐药;否则,则判断为敏感。当检出的基因组覆盖度小于一定比例且没有耐药特征检出时,由于不能确定该特征是否存在(特征可能存在于未覆盖的区域),因此无法给出预测。表3为部分临床标本统计结果:

[0046] 3.8由表3数据可见,利用上述特征组合,可预测绝大部分临床标本中的屎肠球菌对链霉素、万古霉素、替考拉的药敏表型,且准确率高,说明本发明在辅助屎肠球菌感染的治疗中有较高的应用价值。

[0047] 表3.部分临床标本检测结果信息

[0048]

样本号	标本类型	目标物种	基因组覆盖率	抗生素	耐药特征	预测	药敏表型	是否一致
S1	腹水	屎肠球菌	87.4116	链霉素	未检出	S	S	一致
				万古霉素	未检出	S	S	一致
				替考拉宁	未检出	S	S	一致
S2	血液	屎肠球菌	60.0773 3	链霉素	未检出	S	S	一致
				万古霉素	未检出	S	S	一致
				替考拉宁	未检出	S	S	一致
S3	肺泡灌洗液	屎肠球菌	91.5289	链霉素	未检出	S	S	一致
				万古霉素	未检出	S	S	一致
				替考拉宁	未检出	S	S	一致
S4	血液	屎肠球菌	40.0645	链霉素	aad(6)	R	R	一致
				万古霉素	未检出	/	S	未知
				替考拉宁	未检出	/	S	未知
S5	尿液	屎肠球菌	82.2237	链霉素	aad(6)	R	R	一致
				万古霉素	vanA	R	R	一致
				替考拉宁	vanA	R	R	一致
S6	痰液	屎肠球菌	79.3688	链霉素	aad(6)	R	R	一致
				万古霉素	vanA	R	R	一致
				替考拉宁	vanA	R	R	一致

[0049] “/”表示在当前基因组覆盖度下,无法对药敏表型进行预测。

[0050] 以上所述的实施例仅用于说明本发明的技术思想及特点,其目的在于使本领域内的技术人员能够理解本发明的内容并据以实施,不能仅以本实施例来限定本发明的专利范围,即凡本发明所揭示的精神所作的同等变化或修饰,仍落在本发明的专利范围内。

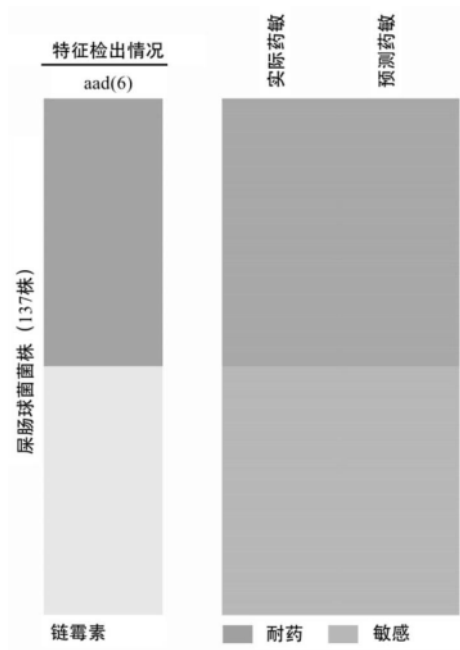


图1

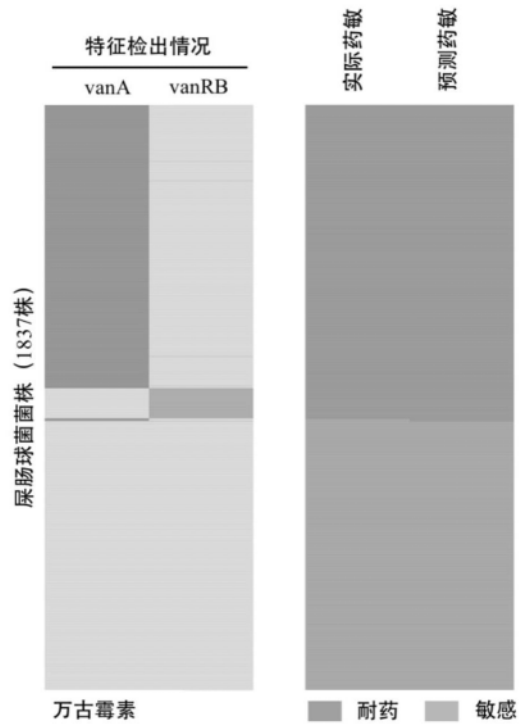


图2



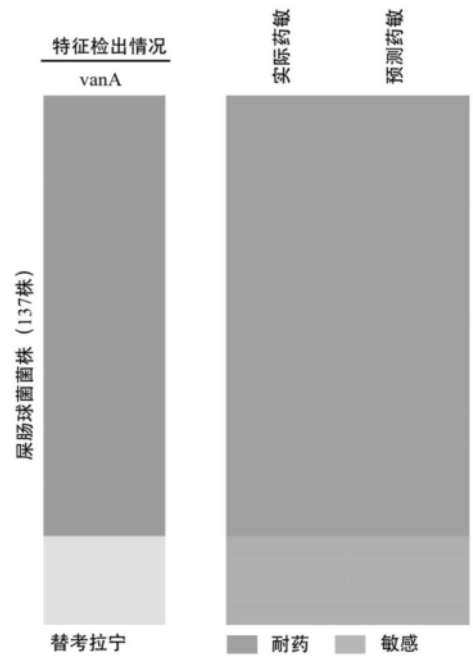


图3