

Sequenzierung saisonal zirkulierender Influenzaviren mit der MiSeq™ i100 Series

Genauer Nachweis von Influenza-A- und Influenza-B-Viren mithilfe gezielter Sequenzierung



Genauer Nachweis und genomische Charakterisierung von Influenza-A- und Influenza-B-Stämmen für die virologische Surveillance



Flexible anreicherungs-basierte Bibliotheks-vorbereitungslösungen, die die Anforderungen der Anwender erfüllen



Schnelle Ergebnisse dank umfassendem Sequenzierungsworkflow auf der MiSeq i100 Series und DRAGEN™-Sekundäranalyse

Einleitung

Inflenzaviren sind eine häufige Ursache für akute Atemwegsinfektionen, die weltweit eine signifikante Morbidität und Mortalität nach sich ziehen können.¹ Das Genom von Influenza A- und Influenza-B-Viren besteht aus acht Einzelstrang-RNA-Segmenten in negativ-Strang-Orientierung. Hämagglutinin(HA)- und Neuraminidase(NA)-Genomsegmente sind dabei wichtig für die Immunität und bilden das Fundament für die Klassifizierung von Subtypen.² Mutationen in HA- und NA-Genprodukten sind wichtige Ziele beim Unterlaufen der Immunantwort, einschließlich der Evasion von Wirtsantikörpern, der Entwicklung von Arzneimittelresistenzen und der Erhöhung der Virulenz.² Daher ist eine kontinuierliche Überwachung in Form einer robusten und zeitnahen virologischen Surveillance erforderlich, anhand derer sich die Zusammensetzung von Impfstoffen festlegen, das Pandemiepotenzial bestimmen und die Reaktion in öffentlichen Gesundheitswesen steuern lässt.^{3,4}

In der Vergangenheit stützte sich die Influenza-Surveillance maßgeblich auf die Isolation und Amplifikation von Viren mithilfe von Zellkulturen vor der genetischen Charakterisierung. Diese Methode war effektiv, jedoch kam es zu deutlichen Verzögerungen bis zur Verfügbarkeit der Ergebnisse. Außerdem bestand die Möglichkeit von Verzerrungen durch Veränderung von Virusgenomsequenzen aufgrund der Anpassung während der Kultivierung.⁵ Im Gegensatz dazu ermöglicht die NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) das schnelle, verzerrungsfreie genomische Profiling, was die Geschwindigkeit und Auflösung des Nachweises von Inflenzaviren sowie deren Charakterisierung verbessert.

Dadurch wird ein „sequenzorientierter“ Ansatz direkt anhand von Proben aus der klinischen Forschung ermöglicht.⁶ Gezielte NGS-Methoden, einschließlich anreicherungsbasierter Sequenzierung, liefern hochpräzise Varianteninformationen bei zugleich erheblich reduzierter Durchlaufzeit, was eine genomische Echtzeit-Surveillance von Inflenzaviren und damit eine fokussierte, zeitnahe Reaktion im öffentlichen Gesundheitswesen ermöglicht.

Im vorliegenden Anwendungshinweis werden der Nachweis und die Charakterisierung von Influenza-A- und Influenza-B-Viren in für Forschungszwecke erstellten und Nasenabstrichproben aus der Praxis unter Verwendung eines flexiblen NGS-Workflows erläutert, der die anreicherungsbasierte Illumina-Bibliotheksvorbereitung, die MiSeq i100 Series sowie die geräteinterne DRAGEN-Sekundäranalyse umfasst und in weniger als 24 Stunden abgeschlossen werden kann ([Abbildung 1](#)).

Methoden

Proben

Insgesamt wurden 39 Proben getestet, darunter 12 für Forschungszwecke erstellte Proben sowie 27 anonymisierte influenzazpositive Nasopharyngealabstrich-Restproben ([Tabelle 1](#)). Die anonymisierten klinischen Restproben und die zugehörigen RT-PCR-Ergebnisse wurden von Aegis Labs (Nashville, Tennessee, USA) bereitgestellt.

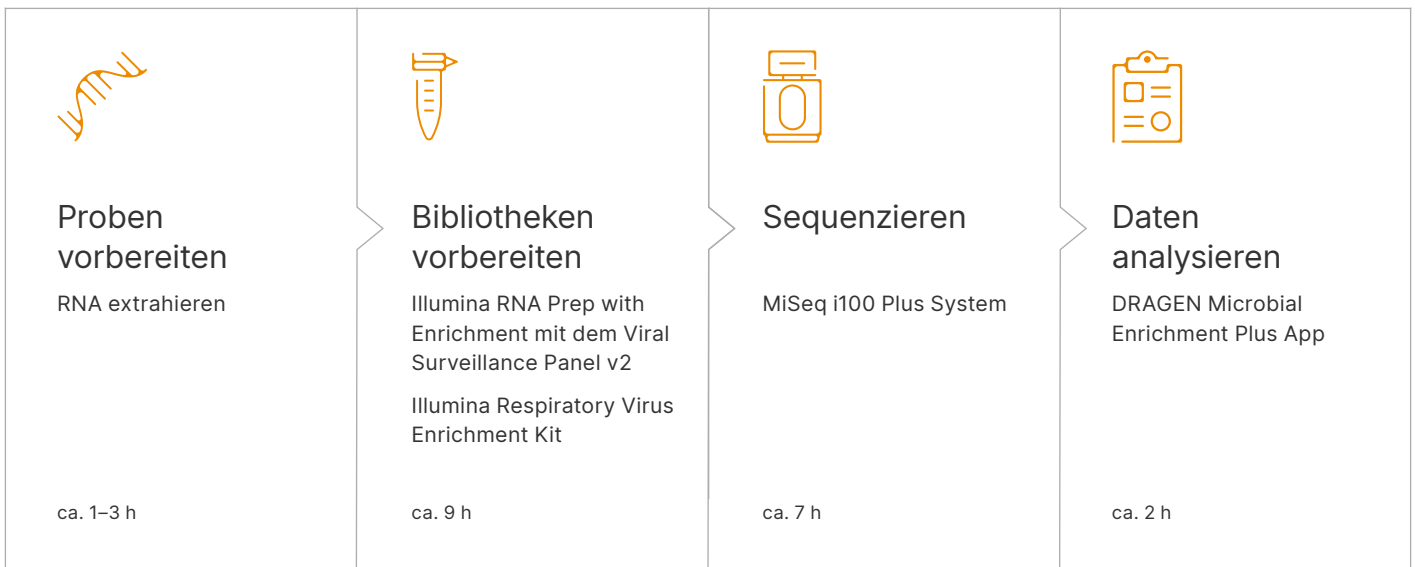


Abbildung 1: Umfassender NGS-Workflow für die Sequenzierung des Inflenzavirus

Die Kombination der Illumina-Bibliotheksvorbereitung auf Basis eines Target-Anreicherungsverfahrens mit der Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und der DRAGEN-Sekundäranalyse ermöglicht den genauen Nachweis sowie die entsprechende Charakterisierung von Influenza-A- und Influenza-B-Viren.

Die für Forschungszwecke erstellten Proben wurden durch Spiking von 10–10.000 Kopien genomischer Influenza-A- (H1N1, H3N2) oder Influenza-B-RNA in 10 ng Universal Human Reference RNA (UHRR) (Agilent Technologies, Katalog-Nr. 740000-41) vorbereitet (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Die Nasenabstrichproben wurden einem molekularbiologischen Diagnosetest auf Influenza A (H1N1, H3N2) und Influenza B unterzogen. Die Nukleinsäuren wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem QIASymphony SP Instrument (QIAGEN, Katalog-Nr. 9001301) extrahiert.

Tabelle 1: Proben, die zur Performancebewertung getestet wurden

Probentyp	Erwartete Erkennung	Anzahl der Proben
Für Forschungszwecke erstellte Proben (genomische RNA in UHRR (Universal Human Reference RNA))	Influenza A (H1N1)	4 ^a
	Influenza A (H3N2)	4 ^a
	Influenza B (Yamagata-Lineage)	4 ^a
Gesamtzahl für Forschungszwecke erstellter Proben		12
Klinische influenzazpositive Nasopharyngeal-abstrichproben	Influenza A (H1N1)	7
	Influenza A (H3N2)	11
	Influenza B (Victoria-Lineage)	9
Gesamtzahl der Abstrichproben		27
Gesamtzahl der Proben		39
<p>a. Jede für Forschungszwecke erstellte Probe besteht aus einer Titration von 10, 100, 1.000 und 10.000 Viruskopien, die zur Bestimmung der Nachweisgrenze in UHRR gespickt wurden. Für jede Titration der insgesamt vier Proben pro Influenzotyp wurde ein einzelnes Replikat erstellt.</p>		

Tabelle 2: Viruskopienzahl der für Forschungszwecke hergestellten Proben

Kopien/Reaktion	Kopien/µl
10	1,2
100	12
1.000	118
10.000	1.175

Tabelle 3: In für Forschungszwecke erstellten Proben verwendete Influenzastämme

Typ	Stamm	Anbieter	Katalog-Nr.
Influenza A (H1N1)	A/PR/8/34	ATCC	VR-95DQ
Influenza A (H2N3)	A/Hongkong/8/68	ATCC	VR-1679D
Influenza B (Yamagata-Lineage)	B/Florida/4/2006	ATCC	VR-1804DQ

Bibliotheksvorbereitung

Für die Sequenzierung geeignete Bibliotheken wurden aus Proben entweder mit dem Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20100469) oder mit Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, Katalog-Nr. 20040536) und dem Viral Surveillance Panel v2 Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20108081) vorbereitet. Mit Illumina RNA Prep with Enrichment vorbereitete Bibliotheken wurden vor der Anreicherung (als „Shotgun-Bibliotheken“ bezeichnet) zum Vergleich sequenziert.

Sequenzierung

Angereicherte Bibliotheken wurden auf dem MiSeq i100 Plus System (Illumina, Katalog-Nr. 20115695) mit einer 25M-Fließzelle und einer Laufkonfiguration von 2 × 151 bp sequenziert. Shotgun-Bibliotheken wurden zum Vergleich auf dem NextSeq™ 550 System (Illumina, Katalog-Nr. SY-415-1002) mit einer Laufkonfiguration von 2 × 151 bp sequenziert.

Datenanalyse

FASTQ-Datensätze wurden einem Downsampling auf 500.000 Cluster bzw. 2 Mio. Paired-End(PE)-Reads unterzogen. FASTQ-Dateien wurden mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App analysiert, entweder auf dem MiSeq i100 Plus System oder in BaseSpace™ Sequence Hub. Hierbei kamen Viral Surveillance Panel v2- oder Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit-Referenzen zum Einsatz. Die Shotgun-Bibliotheken wurden mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App und Viral Surveillance Panel v2-Referenzen analysiert. Statistische Analysen und die Datenvisualisierung wurden mit [GraphPad Prism 10](#) und [JMP 18](#) durchgeführt.

Ergebnisse

Sequenzierungsmetriken

Angereicherte Bibliotheken wurden in zwei Läufen auf dem MiSeq i100 Plus System sequenziert. Bei allen Läufen wurden hochwertige Daten mit > 94 % nach Filterung (PF, Passing Filter) generiert. Die Gesamtzahl der PE-Reads nach Filterung lag über 64 Mio. Reads pro Lauf und eignet sich somit für eine hochgradig zuverlässige nachgeschaltete Analyse. Bei beiden Läufen lag die kombinierte Geräteauf- und Analysedauer unter 10 Stunden (Tabelle 4). Dies unterstreicht, dass das MiSeq i100 Plus System die Geschwindigkeit und Effizienz für die zeitnahe Bereitstellung von Ergebnissen bietet, die für die Überwachung und Reaktion im öffentlichen Gesundheitswesen unerlässlich sind.

Genom-Coverage bei unterschiedlichen Virusgenomkonzentrationen

Die Evaluierung der Genom-Coverage, der medianen Sequenzierungstiefe und der Reads pro Kilobase pro Million gemappter Reads (RPKM, Reads per Kilobase per Million) zeigte eine herausragende Performance sowohl des Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit als auch des Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 beim Nachweis von Influenza-Subtypen ab 100 Viruskopien (Abbildung 2).

Nachweis von Influenza A und B in Nasopharyngealabstrichproben

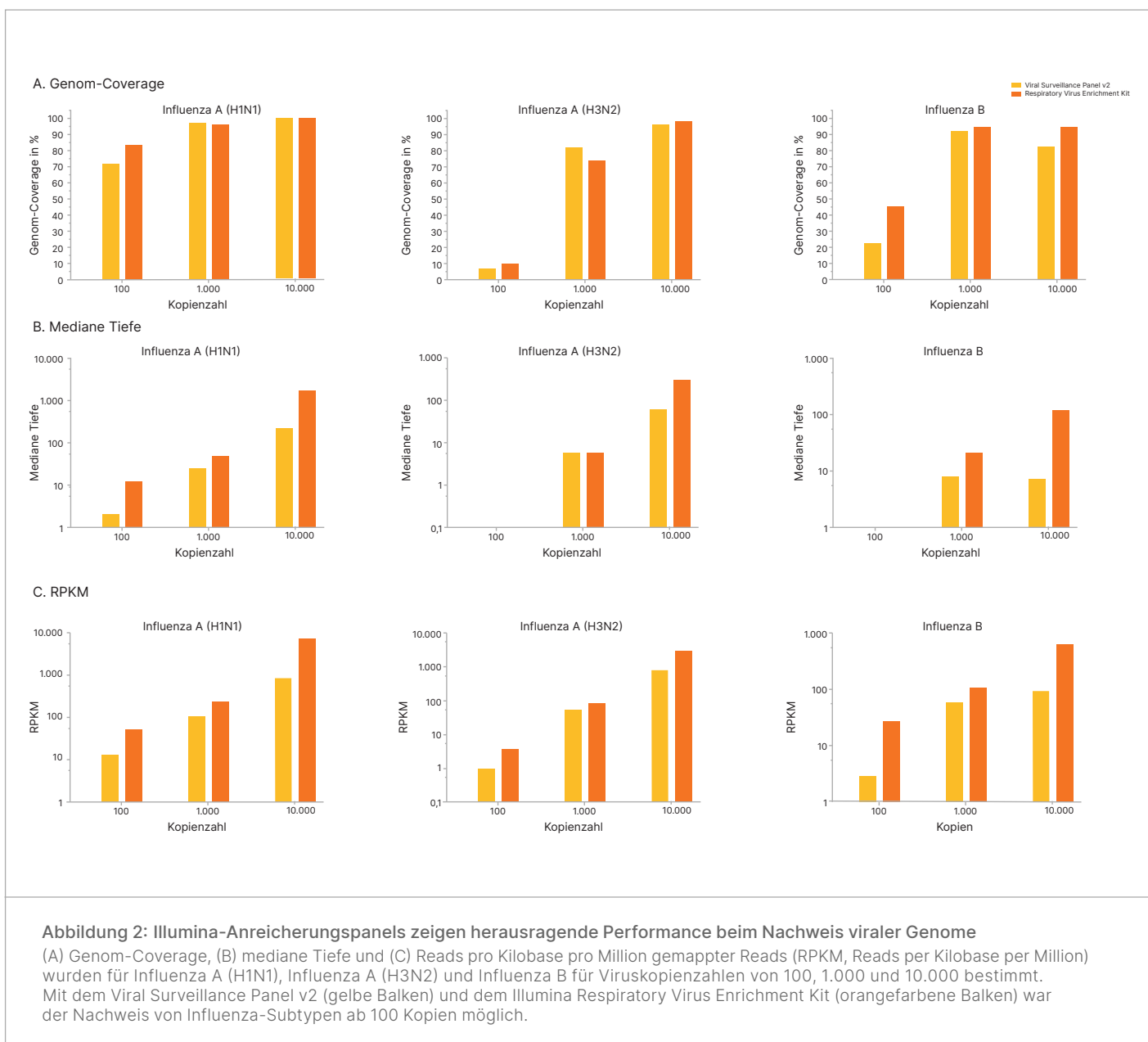
Zur Beurteilung der Performance bei Proben aus der Praxis wurden influenzazpositive Nasopharyngealabstrichproben mit Anreicherungs- und Shotgun-Sequenzierungsverfahren verarbeitet. Auf dem NextSeq 550 System sequenzierte Shotgun-Bibliotheken zeigten eine im Vergleich zu Anreicherungsworkflows auf dem MiSeq i100 Plus System geringere Genom-Coverage, insbesondere bei Proben mit geringerer Virenabundanz (erkennbar an höheren qRT-PCR-Ct-Werten) (Abbildung 3).

Das Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit und das Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 konnten jeweils Influenza A (H1N1) bei 71 % der Nasenabstrichproben nachweisen. Hierbei wurden > 95 % der callfähigen Basen erreicht. Auch bei Proben mit geringer Viruslast zeigte sich eine robuste Coverage (Abbildung 3A). Eine vergleichbare Performance zeigte sich bei Influenza A H3N2, wo bei 82 % der Proben > 95 % der callfähigen Basen erreicht wurden (Abbildung 3B), und bei Influenza B, wo bei 77 % der Proben > 95 % der callfähigen Basen erreicht wurden (Abbildung 3C). Bei repräsentativen Nasenabstrichproben mit niedrigen Ct-Werten und hoher Virenabundanz zeigte sich bei beiden Bibliotheksvorbereitungskits eine umfassende Genom-Coverage (Abbildung 4).

Tabelle 4: Sequenzierungsmetriken für die MiSeq i100 Series^a

Lauf	Bibliothekstyp	Anzahl der Proben	Laufzeit der Sequenzierung	Analysedauer mit DRAGEN Microbial Enrichment Plus ^b	Gesamtzahl der PE-Reads nach Filterung	% PF
1	Viral Surveillance Panel v2	30	7 h 11 min	1 h 41 min	67.382.396	95,25 %
2	Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit	30	7 h 12 min	2 h 18 min	67.083.162	94,36 %

- a. Diese Tabelle enthält keine Metriken für Shotgun-Bibliotheken.
 b. Die Analyse wurde im MiSeq i100 Plus System durchgeführt.
 c. Die Analyse wurde in BaseSpace Sequence Hub durchgeführt.



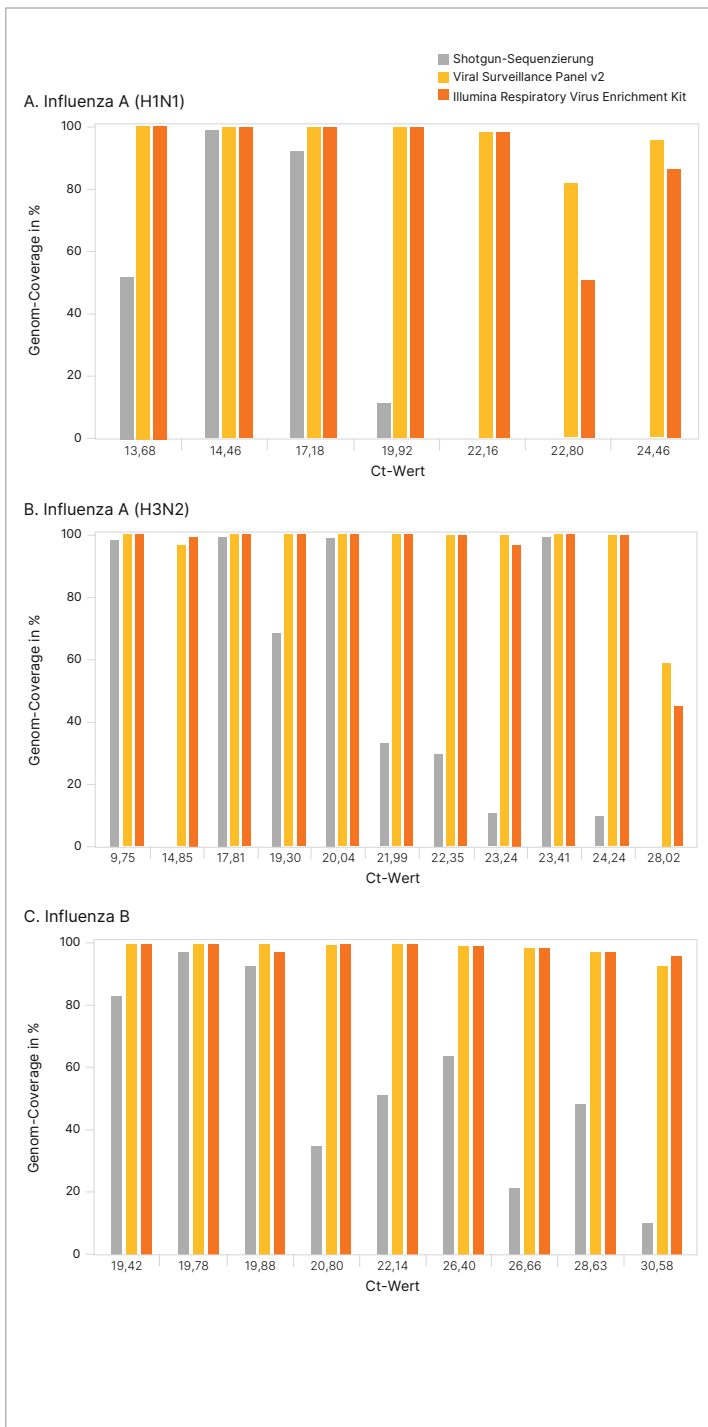


Abbildung 3: Nachweis von Influenza-Subtypen in Nasopharyngealabstrichproben

Mit dem Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (gelbe Balken) und dem Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 (orangefarbene Balken) konnten (A) Influenza A H1N1, (B) Influenza A H3N2 und (C) Influenza B in klinischen Proben bei unterschiedlicher Virenabundanz (durch den qRT-PCR-Ct-Wert) nachgewiesen werden. Die Genom-Coverage blieb bei den meisten Virenabundanz gleich, war bei den Proben mit der niedrigsten Virenabundanz jedoch geringer. Die Daten wurden mit Daten zur Shotgun-Sequenzierung (graue Balken) verglichen.

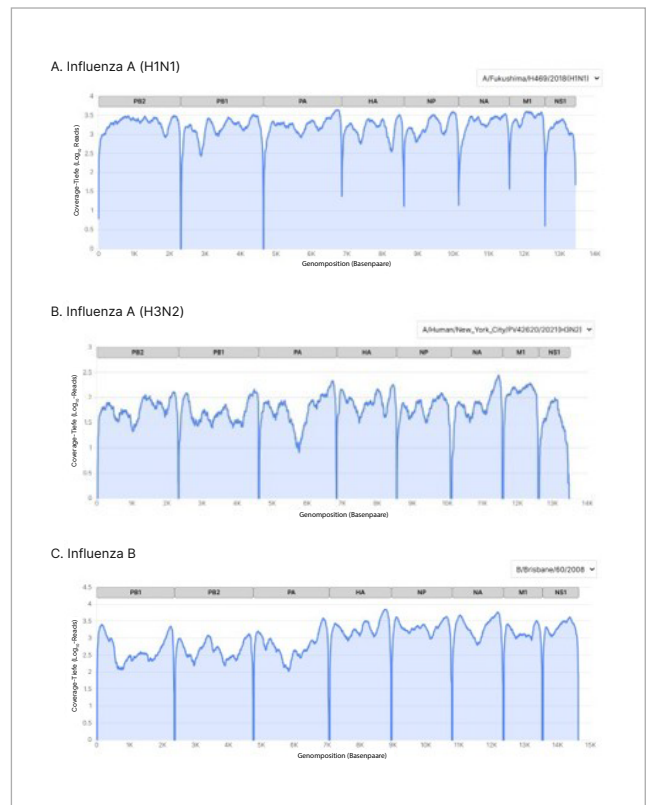


Abbildung 4: Genom-Coverage der Influenza-Subtypsegmente in Nasopharyngealabstrichproben

Beim Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit und Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 ließ sich für alle Segmente eine umfassende Genom-Coverage zeigen, einschließlich HA und NA für (A) Influenza A H1N1, (B) Influenza A H3N2 und (C) Influenza B in repräsentativen klinischen Proben mit niedrigem Ct-Wert und hoher Virenabundanz.

Zusammenfassung

Die MiSeq i100 Series eignet sich in Kombination mit hochwertiger Bibliotheksvorbereitung sowohl mit dem Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit als auch dem Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 für die gezielte Sequenzierung zum Influenzanachweis sowie zur Subtyp-Charakterisierung. Beide Anreicherungsmethoden lieferten eine Coverage des vollständigen Genoms von Influenzastämmen und zeigten sich dabei weniger anfällig für bekannte Herausforderungen bei der Influenza-Amplifikation. Der vorliegende Anwendungshinweis zeigt, dass die MiSeq i100 Series einen flexiblen, effizienten NGS-Workflow für die Influenzacharakterisierung ermöglicht, der schnelle Ergebnisse liefert und damit die Anforderungen der Anwender erfüllt.

Weitere Informationen

[MiSeq i100 Series](#)

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit](#)

Quellen

1. World Health Organization. Influenza (seasonal) fact sheet. [who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Veröffentlicht am 28. Februar 2025. Aufgerufen am 12. August 2025.
2. Maqsood R, Smith MF, Holland LRA, et al. [Influenza Virus Genomic Surveillance, Arizona, USA, 2023–2024](#). *Viruses*. 2024;16(5). doi:10.3390/v16050692
3. Roberts MC, Holt KE, Del Fiol G, Baccarelli AA, Allen CG. [Precision public health in the era of genomics and big data](#). *Nat Med*. 2024;30(7):1865-1873. doi:10.1038/s41591-024-03098-0
4. World Health Organization. Global Influenza Strategy 2019–2030. [who.int/publications/i/item/9789241515320](https://www.who.int/publications/i/item/9789241515320). Veröffentlicht am 15. März 2019. Aufgerufen am 21. April 2025.
5. Einfeld AJ, Neumann G, Kawaoka Y. [Influenza A virus isolation, culture and identification](#). *Nat Protoc*. 2014;9(11):2663-2681. doi:10.1038/nprot.2014.180
6. Armstrong GL, MacCannell DR, Taylor J, et al. [Pathogen Genomics in Public Health](#). *N Engl J Med*. 2019;381(26):2569-2580. doi:10.1056/NEJMs1813907



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03572 DEU v1.0