

Secuenciación de virus de la gripe de circulación estacional con MiSeq™ i100 Series

Detección precisa de virus de la gripe A y B mediante secuenciación selectiva



Detección precisa y caracterización genómica de las cepas de gripe A y B para la vigilancia vírica



Soluciones flexibles de preparación de librerías basadas en enriquecimiento para satisfacer las necesidades del usuario



Resultados rápidos con un flujo de trabajo de secuenciación integral en MiSeq i100 Series y análisis secundario de DRAGEN™

Introducción

Los virus de la gripe son una causa frecuente de infecciones respiratorias agudas que pueden dar lugar a una morbilidad y mortalidad significativas en todo el mundo.¹ Los virus de la gripe A y B tienen genomas compuestos por ocho segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo. Cabe destacar que los segmentos del genoma de la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) son importantes para la inmunidad y son la base de la clasificación de subtipos.² Las mutaciones en los productos de los genes HA y NA son objetivos importantes de la respuesta inmunitaria, incluidos el escape de los anticuerpos del huésped, el desarrollo de resistencia a los fármacos y el aumento de la virulencia.² Por lo tanto, se necesita una supervisión continua en forma de vigilancia vírica sólida y oportuna para informar sobre la composición de la vacuna, evaluar el potencial pandémico y guiar las respuestas de salud pública.^{3,4}

Históricamente, la vigilancia de la gripe dependía, en gran medida, del aislamiento y la amplificación del virus mediante métodos de cultivo celular antes de la caracterización genética. Aunque es eficaz, este método requería retrasos significativos en el tiempo hasta los resultados y podría sesgar las secuencias del genoma vírico debido a la adaptación durante el cultivo.⁵ Por el contrario, la secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) proporciona una generación de perfiles genómicos imparciales; de este modo, aumenta la velocidad

y mejora la resolución de la detección y caracterización del virus de la gripe, lo que permite un enfoque "primero en secuencia" directamente a partir de muestras de investigación clínica.⁶ Métodos de NGS selectivos, incluida la secuenciación basada en enriquecimiento, proporcionan información de variantes muy precisa a la vez que reducen significativamente el tiempo de respuesta, lo que da como resultado una vigilancia genómica en tiempo real de los virus de la gripe para ofrecer respuestas oportunas de salud pública.

Esta nota de aplicación demuestra la detección y caracterización de virus de la gripe A y B en muestras artificiales y muestras de hisopos nasales del mundo real mediante un flujo de trabajo de NGS flexible que incluye la preparación de librerías basada en enriquecimiento de Illumina, MiSeq i100 Series y el análisis secundario de DRAGEN integrado, y se puede completar en menos de 24 horas ([figura 1](#)).

Métodos

Muestras

Se analizó un total de 39 muestras: 12 muestras artificiales y 27 muestras anonimizadas de muestras de hisopos nasofaríngeos residuales positivos para gripe ([tabla 1](#)). Aegis Labs (Nashville, TN, EE. UU.) proporcionó muestras clínicas de restos sin identificar y los resultados de RT-PCR asociados.



Figura 1: Flujo de trabajo de NGS completo para la secuenciación de virus de la gripe

Combina la preparación de librerías de Illumina con un enfoque de enriquecimiento de objetivos con la secuenciación en MiSeq i100 Series y el análisis secundario de DRAGEN para una detección y una caracterización genómica precisas de los virus de gripe A y gripe B.

Las muestras artificiales se prepararon añadiendo de 10 a 10 000 copias de ARN genómico de gripe A (H1N1, H3N2) o gripe B en 10 ng de ARN de control humano universal (UHRR) (Agilent Technologies, n.º de catálogo 740000-41) (tabla 2 y tabla 3).

Las muestras de hisopos nasales se sometieron a pruebas moleculares diagnósticas para la gripe A (H1N1, H3N2) y la gripe B. Los ácidos nucleicos se extrajeron utilizando QIAasymphony SP Instrument (QIAGEN, n.º de catálogo 9001301) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 1: Muestras analizadas para la evaluación del rendimiento

Tipo de muestra	Detección esperada	N.º de muestras
Muestras artificiales (ARN genómico en UHRR)	Gripe A (H1N1)	4 ^a
	Gripe A (H3N2)	4 ^a
	Gripe B (linaje Yamagata)	4 ^a
N.º total de muestras artificiales		12
Muestras clínicas de hisopos nasofaríngeos positivas para gripe	Gripe A (H1N1)	7
	Gripe A (H3N2)	11
	Gripe B (linaje Victoria)	9
N.º total de muestras de hisopos		27
N.º total de muestras		39
a. Cada muestra artificial es una valoración de 10, 100, 1000 y 10 000 copias víricas añadidas a UHRR para un estudio de límite de detección; cada valoración tiene una sola réplica para un total de cuatro muestras por tipo de gripe.		

Tabla 2: Números de copias víricas para muestras artificiales

Copias/reacción	Copias/µl
10	1,2
100	12
1000	118
10 000	1175

Tabla 3: Cepas de gripe utilizadas para muestras artificiales

Tipo	Cepa	Proveedor	N.º de catálogo
Gripe A (H1N1)	A/PR/8/34	ATCC	VR-95DQ
Gripe A (H2N3)	A/Hong Kong/8/68	ATCC	VR-1679D
Gripe B (linaje Yamagata)	B/Florida/4/2006	ATCC	VR-1804DQ

Preparación de librerías

Las librerías listas para secuenciación se prepararon a partir de muestras utilizando Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (Illumina, n.º de catálogo 20100469) o Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, n.º de catálogo 20040536) y Viral Surveillance Panel v2 Kit (Illumina, n.º de catálogo 20108081). Las librerías preparadas con Illumina RNA Prep with Enrichment se secuenciaron antes del enriquecimiento (denominadas "librerías de secuenciación indiscriminada") para su comparación.

Secuenciación

Se secuenciaron librerías enriquecidas en MiSeq i100 Plus System (Illumina, n.º de catálogo 20115695) utilizando una celda de flujo de 25 M con el experimento configurado a 2 × 151 pb. A efectos comparativos, se secuenciaron librerías de secuenciación indiscriminada en NextSeq™ 550 System (Illumina, n.º de catálogo SY-415-1002) con el experimento configurado a 2 × 151 pb.

Análisis de datos

Los conjuntos de datos FASTQ se redujeron a 500 000 grupos o 2 millones de lecturas "paired-end (PE)". Los archivos FASTQ se analizaron con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus, bien de forma integrada en MiSeq i100 Plus System o en BaseSpace™ Sequence Hub con los controles de Viral Surveillance Panel v2 o Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit. Las librerías de secuenciación indiscriminada se analizaron con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus y los controles de Viral Surveillance Panel v2. Los análisis estadísticos y la visualización de datos se llevaron a cabo con [GraphPad Prism 10](#) y [JMP 18](#).

Resultados

Criterios de medición de secuenciación

Las librerías enriquecidas se secuenciaron en dos experimentos en MiSeq i100 Plus System. Todos los experimentos generaron datos de alta calidad con >94 % de lecturas que superaron el filtro (PF). El número total de lecturas PE que pasaron el filtro superó los 64 millones de lecturas por experimento, lo que permite disfrutar de una elevada confianza en los análisis sucesivos. En ambos experimentos, la duración del experimento y de los análisis combinados del instrumento fueron inferiores a 10 horas (tabla 4). Esto demuestra que MiSeq i100 Plus System ofrece la rapidez y la eficiencia necesarias para ofrecer resultados importantes a tiempo para una mejor supervisión y respuesta de la salud pública.

Cobertura genómica con diversas concentraciones del genoma vírico

La evaluación de la cobertura del genoma, la mediana de la profundidad de secuenciación y las lecturas por kilobase por millón de lecturas asignadas (RPKM) mostraron el rendimiento excepcional tanto de Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit como de Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 en la detección de subtipos de gripe hasta 100 copias víricas (figura 2).

Detección de gripe A y B en muestras de hisopos nasofaríngeos

Para evaluar el rendimiento en muestras reales, las muestras de hisopos nasofaríngeos positivos para gripe se procesaron siguiendo estrategias de secuenciación indiscriminada y de enriquecimiento. Las librerías de secuenciación indiscriminadas secuenciadas en NextSeq 550 System demostraron una menor cobertura del genoma, especialmente en muestras con menor abundancia vírica (como se indica por valores Ct de qRT-PCR más altos), en relación con los flujos de trabajo de enriquecimiento en MiSeq i100 Plus System (figura 3).

Tanto Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit como Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 lograron detectar gripe A (H1N1) con un 71 % de muestras de hisopos nasales, donde lograron >95 % de las bases llamables y mantuvieron una sólida cobertura en muestras con cargas víricas menores (figura 3A). Se observó un rendimiento similar para la gripe A H3N2, en el que un 82 % de las muestras alcanzó >95 % de bases llamables (figura 3B) y para la gripe B, en el que un 77 % de las muestras alcanzó >95 % de bases llamables (figura 3C). Las muestras representativas de hisopos nasales con valores Ct bajos y una abundancia vírica elevada presentaron una cobertura total del genoma con ambos kits de preparación de librerías (figura 4).

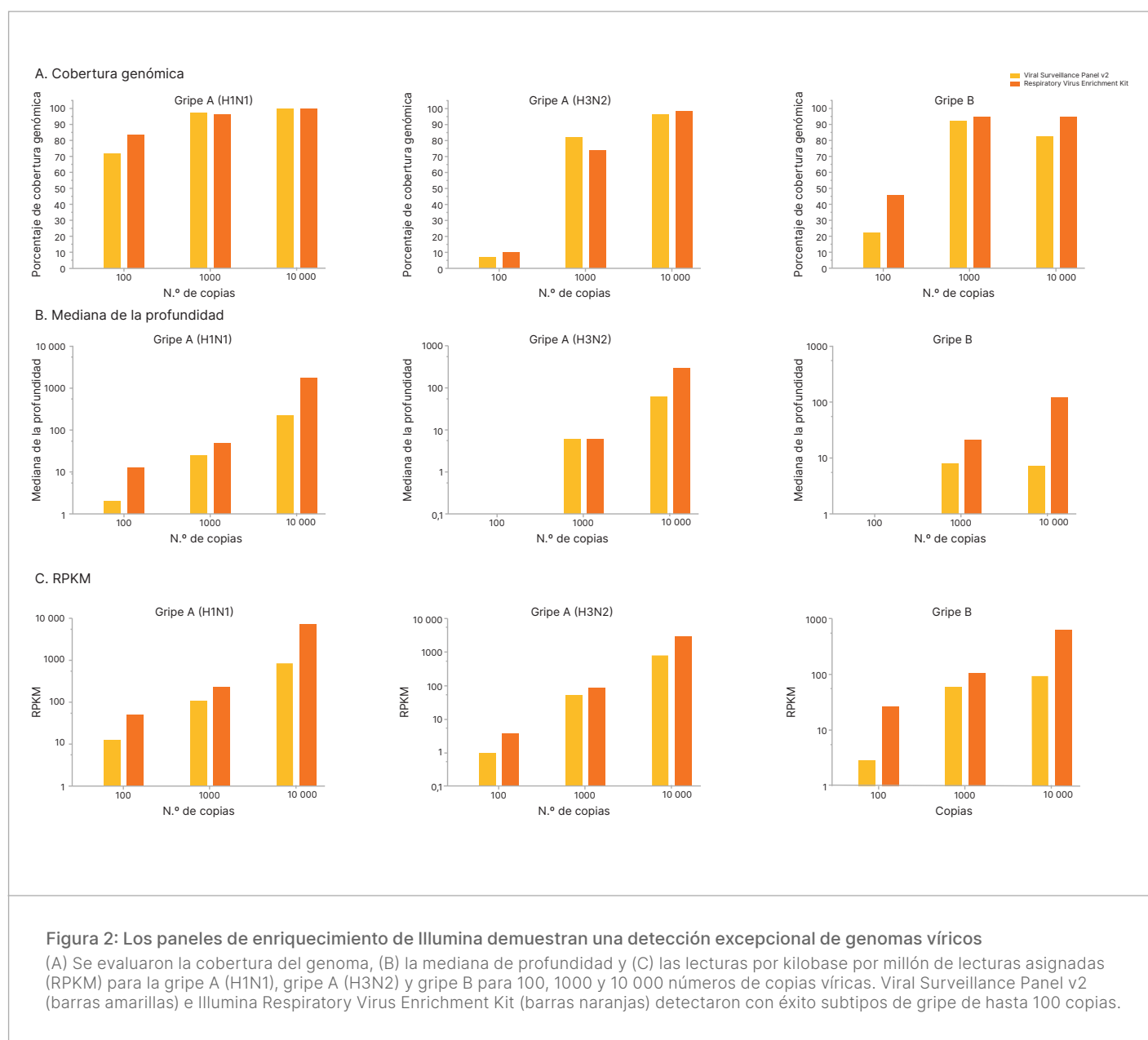
Tabla 4: Métricas de secuenciación para MiSeq i100 Series^a

Experimento	Tipo de librería	N.º de muestras	Duración del experimento de secuenciación	Duración del análisis con DRAGEN Microbial Enrichment Plus ^b	N.º total de lecturas PE PF	% de 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. En esta tabla no se han incluido las métricas de las librerías de secuenciación indiscriminada.

b. El análisis se efectuó en MiSeq i100 Plus System.

c. El análisis se efectuó en BaseSpace Sequence Hub.



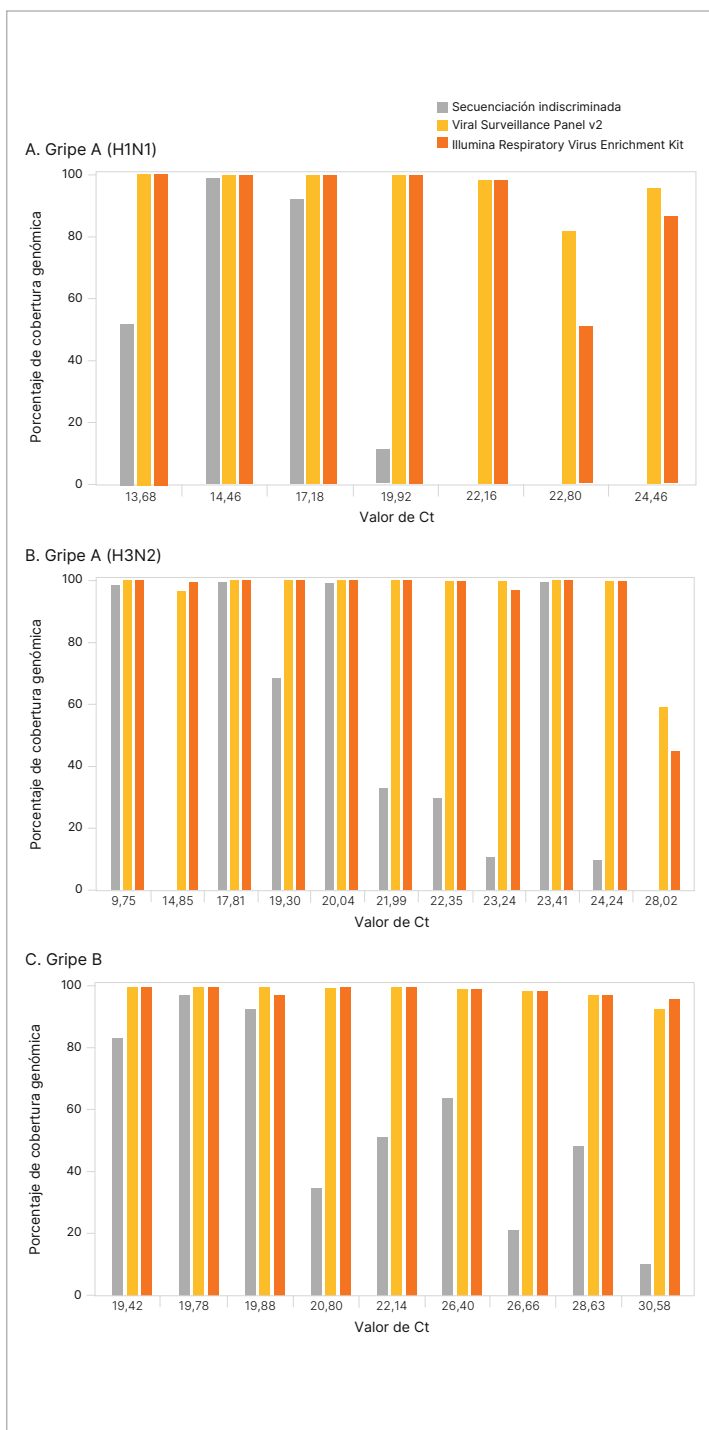


Figura 3: Detección de subtipos de gripe en muestras de hisopos nasofaríngeos

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barras amarillas) e Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 (barras naranjas) detectaron con éxito (A) gripe A H1N1, (B) gripe A H3N2 y (C) gripe B en muestras clínicas en un rango muy amplio de abundancia vírica (indicada por el valor Ct de qRT-PCR). La cobertura del genoma se mantuvo en la mayoría de los niveles de abundancia vírica con una cobertura reducida en el caso de las muestras de menor carga vírica. Los datos se compararon con la secuenciación indiscriminada (barras grises).

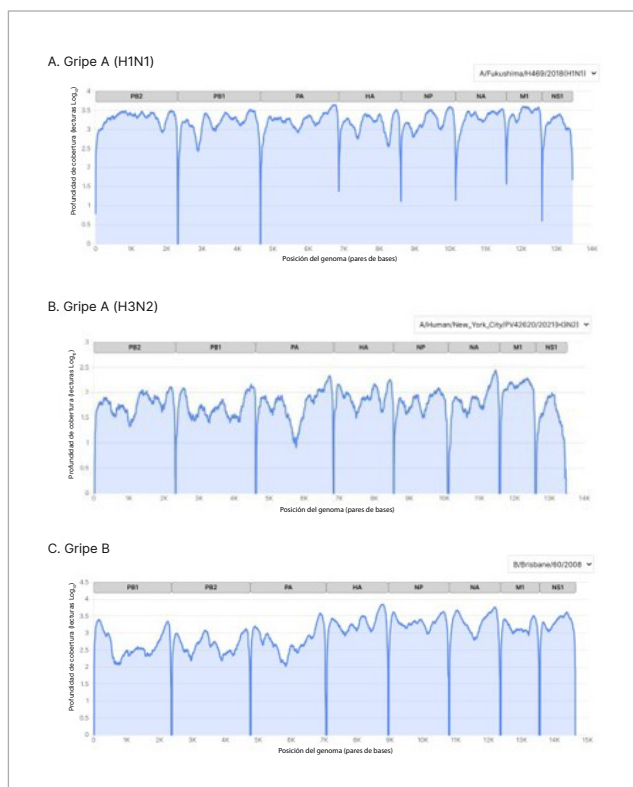


Figura 4: Cobertura genómica de segmentos del subtipo de gripe en muestras de hisopos nasofaríngeos

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit e Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 mostraron una cobertura genómica completa para todos los segmentos, incluidos HA y NA para (A) gripe A H1N1, (B) gripe A H3N2 y (C) gripe B en muestras clínicas representativas con valores Ct bajos y abundancia vírica alta.

Resumen

MiSeq i100 Series, en combinación con la preparación de librerías de alta calidad utilizando Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit o Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2, demostró capacidades de secuenciación selectiva para la detección de la gripe y la caracterización de subtipos. Ambos métodos basados en el enriquecimiento proporcionaron una cobertura completa del genoma de las cepas de gripe con menos sensibilidad a los desafíos conocidos en la amplificación de la gripe. Esta nota de aplicación demuestra que MiSeq i100 Series forma parte de un flujo de trabajo de NGS flexible y eficiente para la caracterización de la gripe que ofrece resultados rápidos para satisfacer las necesidades del usuario.

Más información

[MiSeq i100 Series](#)

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit](#)

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Hoja informativa sobre la gripe (estacional). [who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)). Fecha de publicación: 28 de febrero de 2025. Fecha de consulta: 12 de agosto de 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. Organización Mundial de la Salud. Global Influenza Strategy 2019–2030. [who.int/publications/i/item/9789241515320](https://www.who.int/publications/i/item/9789241515320). Fecha de publicación: 15 de marzo de 2019. Fecha de consulta: 21 de abril de 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



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03572 ESP v1.0