

# Séquençage des virus grippaux à circulation saisonnière avec la série MiSeq<sup>MC</sup> i100

Détection précise des virus de la grippe A et B à l'aide du séquençage ciblé



Détection précise et caractérisation génomique des souches de grippe A et B pour la surveillance virale



Solutions flexibles de préparation de bibliothèques basées sur l'enrichissement pour répondre aux besoins des utilisateurs



Résultats rapides grâce à un flux de travail de séquençage complet sur la série MiSeq i100 et analyse secondaire DRAGEN<sup>MC</sup>

## Introduction

Les virus de la grippe sont une cause fréquente d'infections respiratoires aiguës qui peuvent entraîner une morbidité et une mortalité significatives dans le monde<sup>1</sup>. Les virus de la grippe A et B ont des génomes composés de huit segments d'ARN à brin unique, de polarité négative. Il convient de noter que les segments du génome de l'hémagglutinine (HA) et de la neuraminidase (NA) sont importants pour l'immunité et constituent la base de la classification des sous-types<sup>2</sup>. Les mutations dans les produits géniques HA et NA sont des cibles importantes de la réponse immunitaire, notamment l'échappement aux anticorps hôtes, le développement d'une résistance aux médicaments et l'augmentation de la virulence<sup>2</sup>. Par conséquent, une surveillance continue sous la forme d'une surveillance virale robuste et opportune est nécessaire pour déterminer la composition des vaccins, évaluer le potentiel pandémique et guider les réponses en matière de santé publique<sup>3,4</sup>.

Historiquement, la surveillance du virus de la grippe dépendait fortement de l'isolation et de l'amplification du virus à l'aide de méthodes de culture cellulaire avant la caractérisation génétique. Bien qu'efficace, cette méthode produit des retards importants dans le délai d'obtention des résultats et pourrait biaiser les séquences du génome viral en raison de l'adaptation pendant la culture<sup>5</sup>. À l'inverse, le séquençage de nouvelle génération (SNG) fournit un profilage génomique rapide et impartial, améliorant la vitesse et la résolution de la détection et de la caractérisation du virus de la grippe et permettant une approche

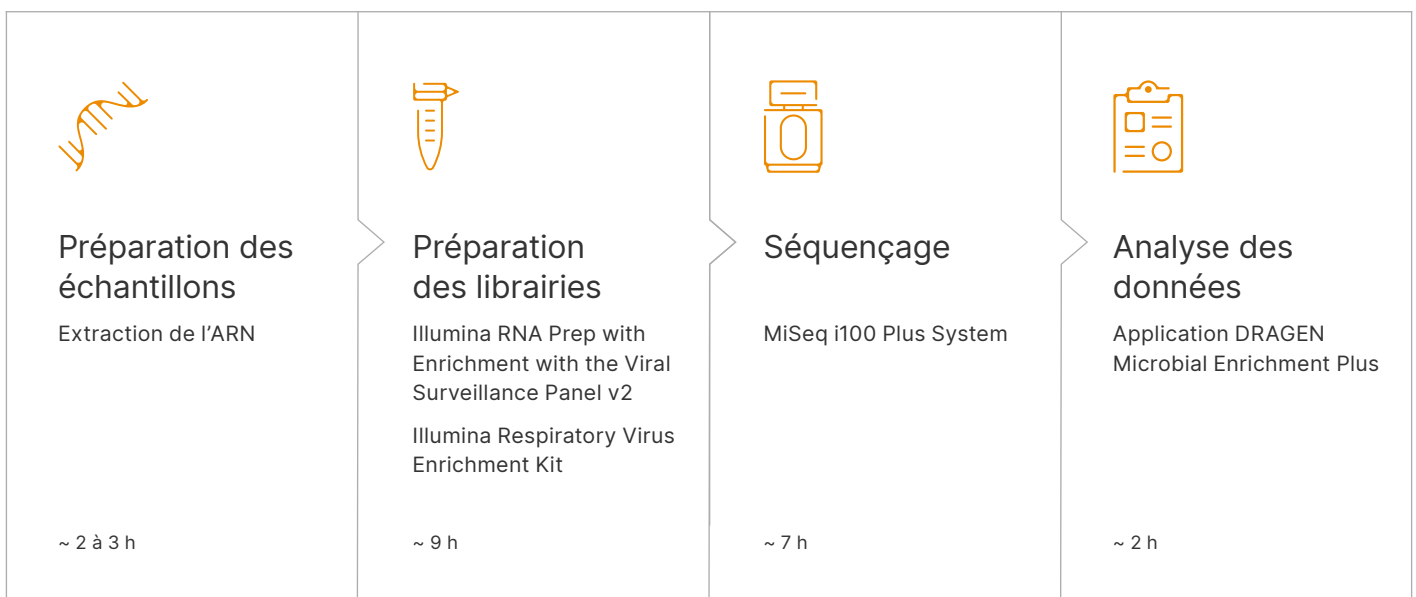
« axée sur la séquence » directement à partir d'échantillons de recherche clinique<sup>6</sup>. Les méthodes de SNG ciblé, notamment le séquençage basé sur l'enrichissement, fournissent des renseignements très précis sur les variants tout en réduisant considérablement le temps de traitement et permettent ainsi une surveillance génomique en temps réel des virus grippaux afin de favoriser l'obtention de réponses, précises et opportunes, en matière de santé publique.

Cette note d'application démontre la détection et la caractérisation des virus de la grippe A et B dans les échantillons artificiels et les échantillons de prélèvement nasal en situation réelle à l'aide d'un flux de travail de SNG flexible qui comprend la préparation de bibliothèques basée sur l'enrichissement d'Illumina, la série MiSeq i100 et l'analyse secondaire intégrée DRAGEN, et qui peut être effectué en moins de 24 heures (figure 1).

## Méthodes

### Échantillons

Au total, 39 échantillons ont été testés, comprenant 12 échantillons artificiels et 27 échantillons anonymisés de prélèvements nasopharyngés restants positifs à la grippe (tableau 1). Les échantillons cliniques anonymisés restants et les résultats de RT-PCR associés ont été fournis par Aegis Labs (Nashville, Tennessee, États-Unis).



**Figure 1 : Flux de travail de SNG complet pour le séquençage des virus grippaux**

Combinez la préparation de bibliothèques d'Illumina en utilisant une approche basée sur l'enrichissement ciblé avec le séquençage sur la série MiSeq i100 et l'analyse secondaire DRAGEN pour une détection et une caractérisation génomique précises des virus de la grippe A et B.

Les échantillons artificiels ont été préparés en amplifiant 10 à 10 000 copies d'ARN génomique de la grippe A (H1N1, H3N2) ou de la grippe B dans 10 ng d'ARN de référence humaine universelle (UHRR, Universal Human Reference RNA) (Agilent Technologies, référence n° 740000-41) ([tableau 2](#) et [tableau 3](#)).

Les échantillons de prélèvement nasal ont fait l'objet de tests de diagnostic moléculaire pour la grippe A (H1N1, H3N2) et la grippe B. Les acides nucléiques ont été extraits à l'aide de QIAasympyphony SP Instrument (QIAGEN, référence n° 9001301), conformément aux instructions du fabricant.

Tableau 1 : Échantillons testés pour l'évaluation des performances

Type d'échantillon	Détection attendue	Nbre d'échantillons
Échantillons artificiels (ARN génomique dans l'UHRR)	Grippe A (H1N1)	4 <sup>a</sup>
	Grippe A (H3N2)	4 <sup>a</sup>
	Grippe B (lignée Yamagata)	4 <sup>a</sup>
<b>Nombre total d'échantillons artificiels</b>		<b>12</b>
Échantillons cliniques de prélèvements nasopharyngés positifs à la grippe	Grippe A (H1N1)	7
	Grippe A (H3N2)	11
	Grippe B (lignée Victoria)	9
<b>Nombre total d'échantillons de prélèvement</b>		<b>27</b>
<b>Nombre total d'échantillons</b>		<b>39</b>
<p>a. Chaque échantillon artificiel est un titrage de 10, 100, 1 000 et 10 000 copies virales ajoutées à l'UHRR pour une étude de limite de détection; chaque titrage a un réplicat unique pour un total de quatre échantillons par type de grippe.</p>		

Tableau 2 : Nombre de copies virales pour les échantillons artificiels

Copies/réaction	Copies/µl
10	1,2
100	12
1 000	118
10 000	1 175

Tableau 3 : Souches grippales utilisées pour les échantillons artificiels

Type	Souche	Fournisseur	N° de référence
Grippe A (H1N1)	A/PR/8/34	ATCC	VR-95DQ
Grippe A (H2N3)	A/Hong Kong/8/68	ATCC	VR-1679D
Grippe B (lignée Yamagata)	B/Florida/4/2006	ATCC	VR-1804DQ

## Préparation des bibliothèques

Les bibliothèques prêtes pour le séquençage ont été préparées à partir d'échantillons à l'aide d'Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (Illumina, référence n° 20100469) ou d'Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, référence n° 20040536) et de la trousse Viral Surveillance Panel v2 Kit (Illumina, référence n° 20108081). Les bibliothèques préparées avec Illumina RNA Prep with Enrichment ont été séquencées avant l'enrichissement (appelées « bibliothèques à séquençage aléatoire ») à des fins de comparaison.

## Séquençage

Les bibliothèques enrichies ont été séquencées sur MiSeq i100 Plus System (Illumina, référence n° 20115695) à l'aide d'une Flow Cell 25M et d'une configuration d'analyse de 2 × 151 pb. Les bibliothèques à séquençage aléatoire ont été séquencées sur NextSeq<sup>MC</sup> 550 System (Illumina, référence n° SY-415-1002) avec une configuration d'analyse de 2 × 151 pb pour comparaison.

## Analyse des données

Les ensembles de données FASTQ ont été sous-échantillonnés à 500 000 amplifiats ou à 2 millions de lectures appariées (PE, Paired-end). Les fichiers FASTQ ont été analysés à l'aide de l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus intégrée à MiSeq i100 Plus System ou dans BaseSpace<sup>MC</sup> Sequence Hub with Viral Surveillance Panel v2 ou dans les références d'Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit. Les bibliothèques à séquençage aléatoire ont été analysées avec l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus et les références du Viral Surveillance Panel v2. Les analyses statistiques et la visualisation des données ont été effectuées à l'aide de [GraphPad Prism 10](#) et [JMP 18](#).

## Résultats

### Indicateurs de séquençage

Les bibliothèques enrichies ont été séquençées sur deux analyses sur MiSeq i100 Plus System. Toutes les analyses ont généré des données de haute qualité avec > 94 % des lectures passant le filtre (PF). Le nombre total de lectures appariées PF a dépassé 64 millions de lectures par analyse, garantissant une analyse en aval avec un haut niveau de confiance. Pour les deux analyses, la durée d'analyse combinée de l'instrument et les durées d'analyse était inférieure à 10 heures (tableau 4). Cela démontre que MiSeq i100 Plus System offre la vitesse et l'efficacité nécessaires pour fournir des résultats rapides importants pour la surveillance et la réaction en matière de santé publique.

### Couverture génomique à travers différentes concentrations de génome viral

L'évaluation de la couverture génomique, de la profondeur médiane de séquençage et des lectures par kilobase par million de lectures cartographiées (RPKM, Reads per Kilobase per Million mapped reads) a montré la performance exceptionnelle d'Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit et d'Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 pour détecter les sous-types des virus de la grippe jusqu'à 100 copies virales (figure 2).

### Détection de la grippe A et B dans les échantillons de prélèvements nasopharyngés

Pour évaluer la performance dans des échantillons réels, les échantillons de prélèvements nasopharyngés positifs à la grippe ont été traités à l'aide d'enrichissement et d'approches de séquençage aléatoire. Les bibliothèques à séquençage aléatoire séquençées sur NextSeq 550 System ont démontré une couverture génomique plus faible, en particulier dans les échantillons avec une abondance virale plus faible (comme indiqué par des valeurs de Ct de qRT-PCR plus élevées), par rapport aux flux de travail d'enrichissement sur MiSeq i100 Plus System (figure 3).

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit et Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 ont tous deux détecté avec succès la grippe A (H1N1) avec 71 % des échantillons de prélèvement nasal atteignant > 95 % de bases appelables et maintenant une forte couverture dans les échantillons avec des charges virales plus faibles (figure 3A). Des performances similaires ont été observées pour la grippe A H3N2 avec 82 % des échantillons atteignant > 95 % de bases appelables (figure 3B) et pour la grippe B avec 77 % des échantillons atteignant > 95 % de bases appelables (figure 3C). Les échantillons représentatifs de prélèvement nasal avec de faibles valeurs de Ct et une abondance virale élevée ont démontré une couverture génomique complète avec les deux trousse de préparation de bibliothèques (figure 4).

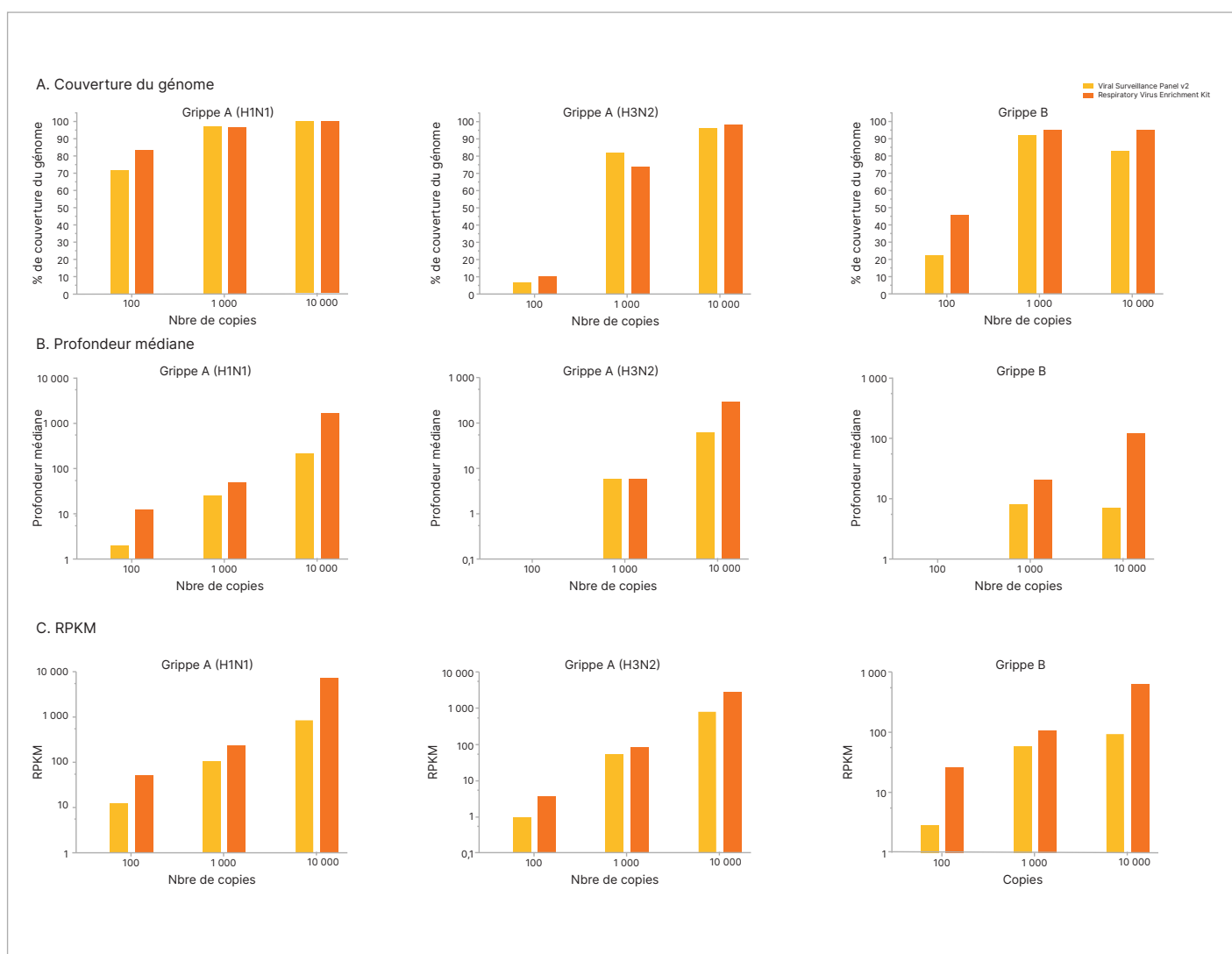
Tableau 4 : Indicateurs de séquençage pour la série MiSeq i100<sup>a</sup>

Analyse	Type de bibliothèque	Nbre d'échantillons	Durée de l'analyse de séquençage	Durée de l'analyse avec DRAGEN Microbial Enrichment Plus <sup>b</sup>	Nbre total de lectures appariées PF	% 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. Les indicateurs pour les bibliothèques à séquençage aléatoire ne sont pas inclus dans ce tableau.

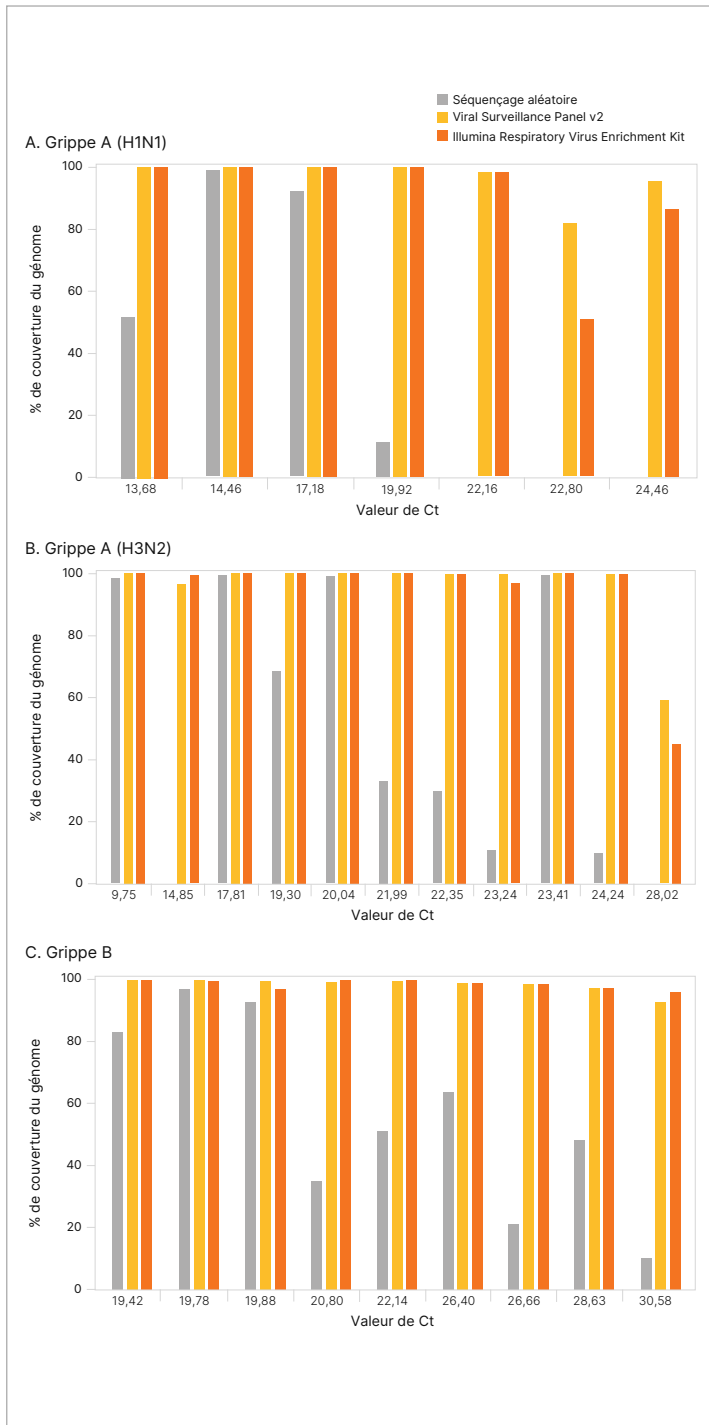
b. L'analyse a été effectuée au moyen du MiSeq i100 Plus System.

c. L'analyse a été effectuée dans BaseSpace Sequence Hub.



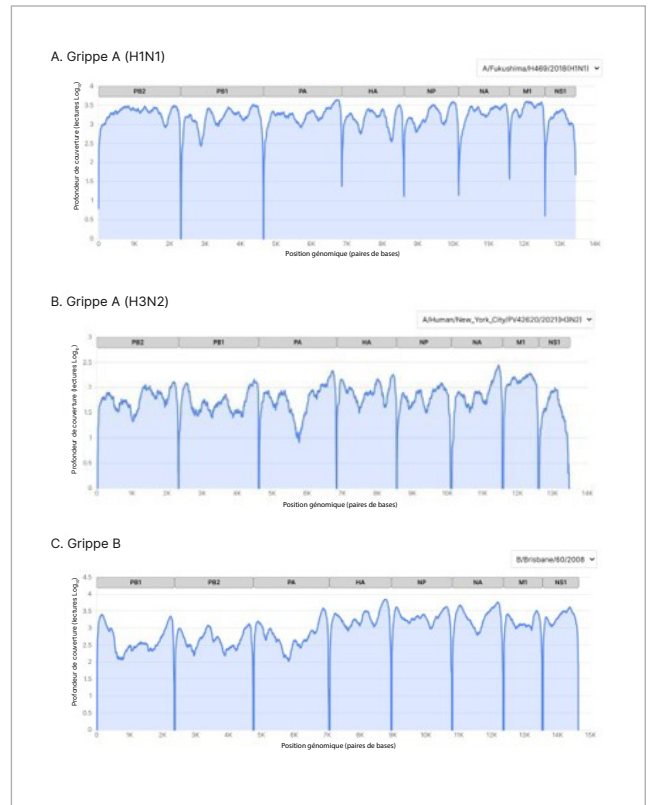
**Figure 2 : Les panels d'enrichissement d'Illumina démontrent une détection exceptionnelle des génomes viraux**

(A) La couverture génomique, (B) la profondeur médiane et (C) les lectures par kilobase par million de lectures cartographiées (RPKM) ont été évaluées pour la grippe A (H1N1), la grippe A (H3N2) et la grippe B pour 100, 1 000 et 10 000 copies virales. Viral Surveillance Panel v2 (barres jaunes) et Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barres orange) ont détecté avec succès les sous-types de grippe jusqu'à 100 copies.



**Figure 3 : Détection des sous-types de grippe dans les échantillons de prélèvements nasopharyngés**

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barres jaunes) et Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 (barres orange) ont détecté avec succès (A) la grippe A H1N1, (B) la grippe A H3N2 et (C) la grippe B dans des échantillons cliniques sur une gamme d'abondance virale (indiquée par la valeur Ct de la qRT-PCR). La couverture génomique a été maintenue dans la plupart des niveaux d'abondance virale avec une couverture réduite pour les échantillons présentant la plus faible abondance virale. Les données ont été comparées au séquençage aléatoire (barres grises).



**Figure 4 : Couverture génomique des segments de sous-types de grippe dans les échantillons de prélèvements nasopharyngés**

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit et Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2 ont tous deux montré une couverture génomique complète pour tous les segments, y compris HA et NA pour (A) la grippe A H1N1, (B) la grippe A H3N2 et (C) la grippe B dans des échantillons cliniques représentatifs avec de faibles valeurs de Ct et une abondance virale élevée.

## Résumé

La série MiSeq i100, combinée à une préparation de bibliothèques de haute qualité à l'aide d'Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit ou d'Illumina RNA Prep with Enrichment with the Viral Surveillance Panel v2, a démontré des capacités de séquençage ciblé pour la détection de la grippe et la caractérisation des sous-types. Les deux méthodes basées sur l'enrichissement ont permis d'obtenir une couverture génomique complète des souches du virus grippal avec une sensibilité moindre aux défis connus en matière d'amplification du virus de la grippe. Cette note d'application démontre que la série MiSeq i100 fait partie d'un flux de travail de SNG flexible et efficace pour la caractérisation du virus de la grippe qui fournit des résultats rapides pour répondre aux besoins des utilisateurs.

## En savoir plus

[Série MiSeq i100](#)

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit](#)

## Références

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)). Publié le 28 février 2025. Consulté le 12 août 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). Publié le 15 mars 2019. Consulté le 21 avril 2025.
5. Eisfeld 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/NEJMsr1813907

**illumina**<sup>MD</sup>

Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 |  
Téléphone : + (1) 858 202-4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-03572 FRA v1.0