

Sequenziamento dei virus dell'influenza circolanti stagionalmente con MiSeq™ i100 Series

Rilevamento accurato dei virus dell'influenza A e B mediante sequenziamento mirato



Rilevamento accurato e caratterizzazione genomica dei ceppi dell'influenza A e B per la sorveglianza virale



Soluzioni flessibili per la preparazione delle librerie basate su arricchimento per soddisfare le esigenze degli utenti



Risultati rapidi con un flusso di lavoro end-to-end di sequenziamento su MiSeq i100 Series e analisi secondaria DRAGEN™

Introduzione

I virus dell'influenza sono una causa comune di infezioni respiratorie acute che possono causare morbilità e mortalità significative in tutto il mondo.¹ I virus dell'influenza A e B hanno genomi composti da otto segmenti di RNA a singolo filamento con senso negativo. Occorre tenere presente che i segmenti del genoma dell'emoagglutinina (HA, hemagglutinin) e della neuraminidasi (NA, neuraminidase) sono importanti per l'immunità e sono la base per la classificazione dei sottotipi.² Le mutazioni nei prodotti genici di HA e NA sono importanti bersagli delle risposte immunitarie, quali ad esempio l'elusione degli anticorpi dell'ospite, lo sviluppo di resistenza ai farmaci, l'aumento della virulenza.² Pertanto, è necessario un monitoraggio continuo sotto forma di sorveglianza virale solida e tempestiva per informare la composizione del vaccino, valutare il potenziale della pandemia e guidare le risposte della sanità pubblica.^{3,4}

Storicamente, la sorveglianza dell'influenza dipendeva notevolmente dall'isolamento e dall'amplificazione del virus utilizzando metodi di coltura cellulare prima della caratterizzazione genetica. Sebbene efficace, questo metodo faceva riscontrare ritardi significativi nel recupero dei risultati e poteva influenzare le sequenze del genoma virale a causa dell'adattamento in fase di coltura.⁵ Al contrario, il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) fornisce una mappatura genomica rapida e imparziale, aumentando la velocità e la risoluzione del rilevamento

e della caratterizzazione del virus dell'influenza, consentendo un approccio incentrato sulla sequenza direttamente dai campioni di ricerca clinica.⁶

Metodi NGS mirati, incluso il sequenziamento basato sull'arricchimento, forniscono informazioni altamente accurate sulle varianti, riducendo significativamente i tempi di risposta, con conseguente sorveglianza genomica in tempo reale dei virus dell'influenza per supportare risposte tempestive e accurate da parte della sanità pubblica.

Questa nota sull'applicazione dimostra il rilevamento e la caratterizzazione dei virus dell'influenza A e B in campioni artificiali e campioni di tamponi nasali reali utilizzando un flusso di lavoro NGS flessibile che include la preparazione delle librerie basate sull'arricchimento Illumina, MiSeq i100 Series e l'analisi secondaria DRAGEN integrata; queste procedure possono essere completate in meno di 24 ore (Figura 1).

Metodi

Campioni

In totale sono stati analizzati 39 campioni, inclusi 12 campioni artificiali e 27 campioni di tamponi nasofaringei residui positivi all'influenza deidentificati (Tabella 1). Aegis Labs (Nashville, TN, Stati Uniti) ha fornito campioni clinici residui deidentificati e i risultati RT-PCR associati.



I campioni artificiali sono stati preparati aggiungendo 10-10.000 copie di RNA genomico dell'influenza A (H1N1, H3N2) o dell'influenza B in 10 ng di RNA di riferimento umano universale (UHRR, Universal Human Reference RNA) (Agilent Technologies, n. di catalogo 740000-41) (Tabella 2 e Tabella 3).

I campioni di tamponi nasali sono stati sottoposti a test molecolari diagnostici per l'influenza A (H1N1, H3N2) e l'influenza B. Gli acidi nucleici sono stati estratti utilizzando QIASymphony SP Instrument (QIAGEN, n. di catalogo 9001301), in base alle istruzioni del produttore.

Tabella 1: campioni analizzati per la valutazione delle prestazioni

Tipo di campione	Rilevamento previsto	N. di campioni
Campioni artificiali (RNA genomico in UHRR)	Influenza A (H1N1)	4 ^a
	Influenza A (H3N2)	4 ^a
	Influenza B (lignaggio Yamagata)	4 ^a
N. totale di campioni artificiali		12
Campioni clinici di tamponi nasofaringei positivi all'influenza	Influenza A (H1N1)	7
	Influenza A (H3N2)	11
	Influenza B (lignaggio Victoria)	9
N. totale di campioni di tamponi		27
N. totale di campioni		39
a. Ogni campione artificiale è una titolazione di 10, 100, 1.000 e 10.000 copie virali addizionate a UHRR per uno studio sul limite di rilevamento; ogni titolazione ha un singolo replicato per un totale di quattro campioni per tipo di influenza.		

Tabella 2: numeri di copie virali per i campioni artificiali

Copie/reazione	Copie/μl
10	1,2
100	12
1.000	118
10.000	1.175

Tabella 3: ceppi dell'influenza utilizzati per i campioni artificiali

Tipo	Ceppo	Fornitore	N. di catalogo
Influenza A (H1N1)	A/PR/8/34	ATCC	VR-95DQ
Influenza A (H2N3)	A/Hong Kong/8/68	ATCC	VR-1679D
Influenza B (lignaggio Yamagata)	B/Florida/4/2006	ATCC	VR-1804DQ

Preparazione delle librerie

Le librerie pronte per il sequenziamento sono state preparate da campioni utilizzando Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (Illumina, n. di catalogo 20100469) o Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, n. di catalogo 20040536) e Viral Surveillance Panel v2 Kit (Illumina, n. di catalogo 20108081). Le librerie preparate con Illumina RNA Prep with Enrichment sono state sequenziate prima dell'arricchimento (definite "librerie shotgun") per il confronto.

Sequenziamento

Le librerie con arricchimento sono state sequenziate su MiSeq i100 Plus System (Illumina, n. di catalogo 20115695) utilizzando una cella a flusso 25M con una configurazione della corsa di 2 × 151 bp. Le librerie shotgun sono state sequenziate su NextSeq™ 550 System (Illumina, n. di catalogo SY-415-1002) con una configurazione della corsa di 2 × 151 bp per il confronto.

Analisi dei dati

I set di dati FASTQ sono stati sottoposti a downsampling a 500.000 cluster o 2 milioni di letture paired-end (PE). I file FASTQ sono stati analizzati utilizzando l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus su MiSeq i100 Plus System o in BaseSpace™ Sequence Hub con Viral Surveillance Panel v2 o i riferimenti Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit. Le librerie shotgun sono state analizzate con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus e i riferimenti Viral Surveillance Panel v2. Le analisi statistiche e la visualizzazione dei dati sono state eseguite utilizzando [GraphPad Prism 10](#) e [JMP 18](#).

Risultati

Metriche di sequenziamento

Le librerie con arricchimento sono state sequenziate su due corse su MiSeq i100 Plus System. Tutte le corse hanno generato dati di alta qualità con più del 94% delle letture che attraversano il filtro (PF, passing filter). Il numero totale di letture PE PF ha superato 64 milioni di letture per corsa, supportando un'analisi a valle ad alta affidabilità. Per entrambe le corse, la durata combinata della corsa e dell'analisi dello strumento è stata inferiore a 10 ore (Tabella 4). Questo dimostra che MiSeq i100 Plus System offre la velocità e l'efficienza per fornire risultati tempestivi importanti per il monitoraggio della salute pubblica e della risposta sanitaria pubblica.

Copertura del genoma su diverse concentrazioni di genoma virale

La valutazione della copertura del genoma, della profondità mediana del sequenziamento e delle letture per kilobase per milione di letture mappate (RPKM, Reads Per Kilobase Per Million Mapped Reads) ha mostrato le eccezionali prestazioni sia di Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit sia di Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 nel rilevare i sottotipi di influenza fino a 100 copie virali (Figura 2).

Rilevamento dell'influenza A e B nei campioni di tamponi nasofaringei

Per valutare le prestazioni in campioni reali, i campioni di tamponi nasofaringei positivi all'influenza sono stati elaborati utilizzando approcci di arricchimento e sequenziamento shotgun. Le librerie shotgun sequenziate su NextSeq 550 System hanno dimostrato una copertura genomica inferiore, in particolare nei campioni con abbondanza virale inferiore (come indicato da valori qRT-PCR Ct più elevati), rispetto ai flussi di lavoro di arricchimento su MiSeq i100 Plus System (Figura 3).

Sia Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit sia Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 hanno rilevato con successo l'influenza A (H1N1) con il 71% dei campioni di tamponi nasali che hanno raggiunto più del 95% di basi richiamabili e hanno mantenuto una forte copertura in campioni con cariche virali inferiori (Figura 3A). Prestazioni simili sono state osservate per l'influenza A H3N2, con l'82% dei campioni che hanno raggiunto più del 95% di basi richiamabili (Figura 3B), e per l'influenza B, con il 77% dei campioni che hanno raggiunto più del 95% di basi richiamabili (Figura 3C). I campioni di tamponi nasali rappresentativi con valori Ct bassi ed elevata abbondanza virale hanno dimostrato una copertura completa del genoma con entrambi i kit di preparazione delle librerie (Figura 4).

Tabella 4: metriche di sequenziamento per MiSeq i100 Series^a

Corsa	Tipo di libreria	N. di campioni	Durata della corsa di sequenziamento	Durata dell'analisi con DRAGEN Microbial Enrichment Plus ^b	N. totale di letture PE PF	% PF
1	Viral Surveillance Panel v2	30	7 ore e 11 min	1 ora e 41 min	67.382.396	95,25%
2	Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit	30	7 ore e 12 min	2 ore e 18 min	67.083.162	94,36%

a. Le metriche per le librerie shotgun non sono incluse in questa tabella.

b. L'analisi è stata eseguita su MiSeq i100 Plus System.

c. L'analisi è stata eseguita in BaseSpace Sequence Hub.

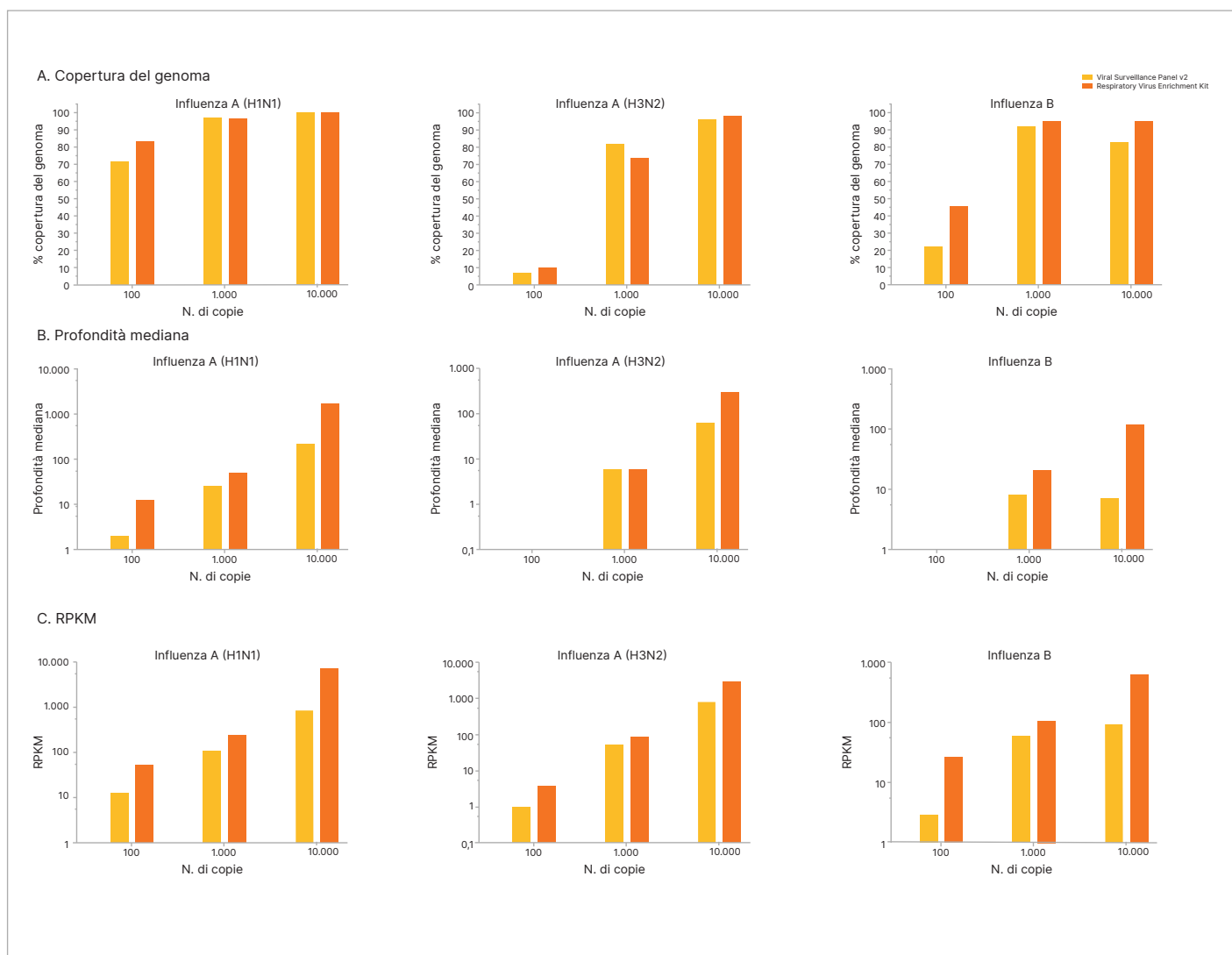


Figura 2: i pannelli di arricchimento Illumina dimostrano un rilevamento eccezionale dei genomi virali

(A) La copertura del genoma, (B) la profondità mediana e (C) le letture per kilobase per milione di letture mappate (RPKM) sono state valutate per l'influenza A (H1N1), l'influenza A (H3N2) e l'influenza B per 100, 1.000 e 10.000 numeri di copie virali. Viral Surveillance Panel v2 (barre gialle) e Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barre arancioni) hanno rilevato correttamente sottotipi di influenza fino a 100 copie.

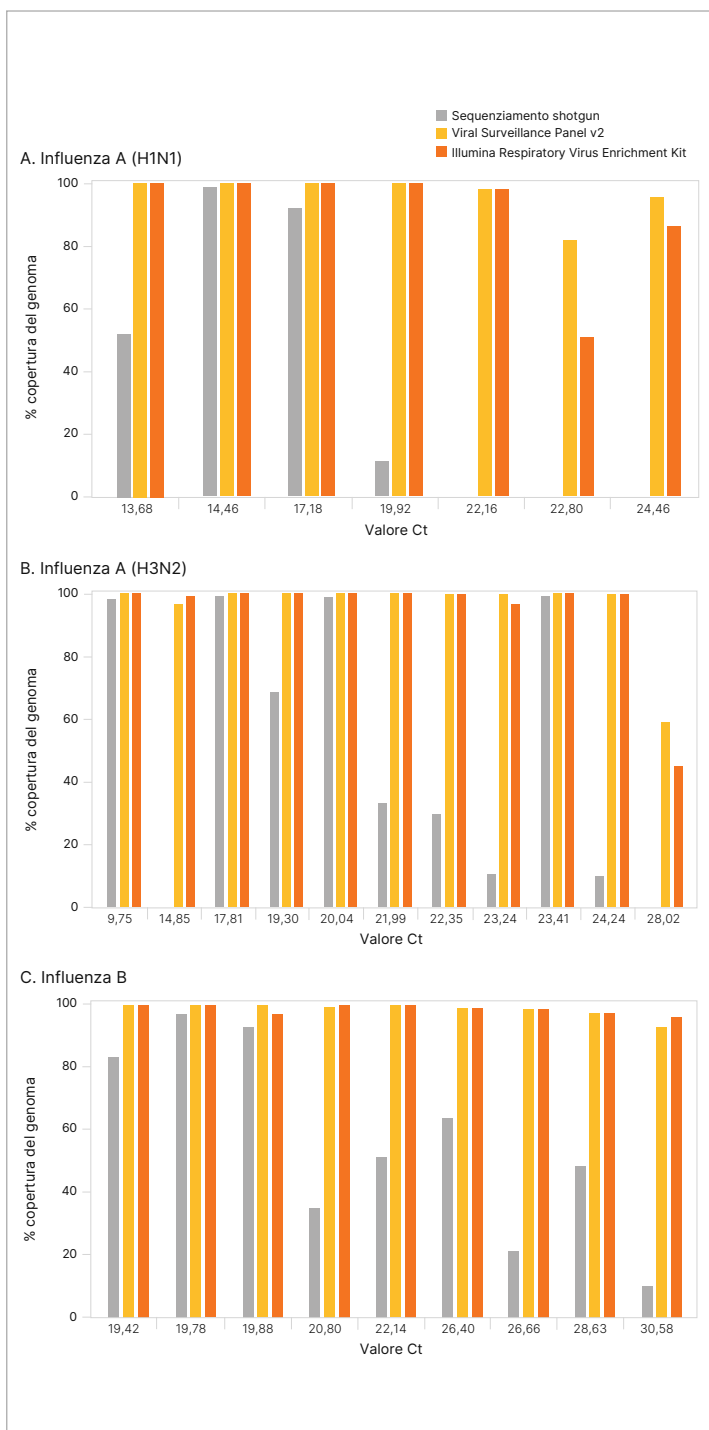


Figura 3: rilevamento dei sottotipi dell'influenza nei campioni di tamponi nasofaringei

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barre gialle) e Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 (barre arancioni) hanno rilevato correttamente (A) l'influenza A H1N1, (B) l'influenza A H3N2 e (C) l'influenza B in campioni clinici su un intervallo di abbondanza virale (indicata dal valore qRT-PCR Ct). La copertura del genoma è stata mantenuta nella maggior parte dei livelli di abbondanza virale con una copertura ridotta per i campioni di abbondanza virale più bassi. I dati sono stati confrontati con il sequenziamento shotgun (barre grigie).

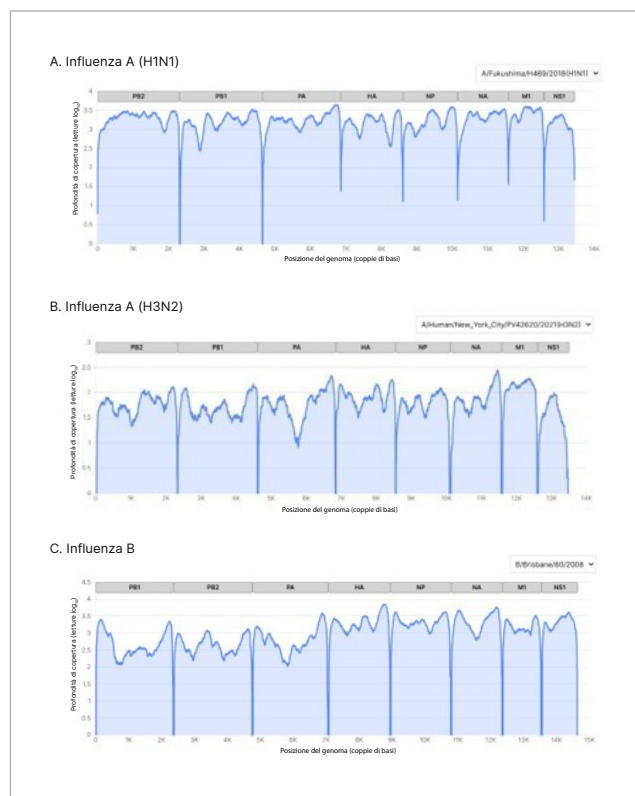


Figura 4: copertura del genoma dei segmenti del sottotipo di influenza nei campioni di tamponi nasofaringei

Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit e Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 hanno entrambi mostrato una copertura completa del genoma per tutti i segmenti, inclusi HA e NA per (A) l'influenza A H1N1, (B) l'influenza A H3N2 e (C) l'influenza B in campioni clinici rappresentativi con valori Ct bassi ed elevata abbondanza virale.

Riepilogo

MiSeq i100 Series, combinato con una preparazione delle librerie di alta qualità utilizzando Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit o Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2, ha dimostrato capacità di sequenziamento mirate per il rilevamento dell'influenza e la caratterizzazione dei sottotipi. Entrambi i metodi basati sull'arricchimento hanno prodotto una copertura completa del genoma dei ceppi dell'influenza con minore suscettibilità alle difficoltà note nell'amplificazione dell'influenza. Questa nota sull'applicazione dimostra che MiSeq i100 Series fa parte di un flusso di lavoro NGS flessibile efficace per la caratterizzazione dell'influenza che fornisce risultati rapidi in base alle esigenze dell'utente.

Maggiori informazioni

[MiSeq i100 Series](#)

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit](#)

Bibliografia

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)). Pubblicato il 28 febbraio 2025. Consultato il 12 agosto 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). Pubblicato il 15 marzo 2019. Consultato il 21 aprile 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.

illumina[®]

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-03572 ITA v1.0