

# Sequenciamento de vírus influenza circulantes sazonalmente com o MiSeq™ i100 Series

Detecção precisa de vírus influenza A e B usando sequenciamento direcionado



Detecção precisa e caracterização genômica de cepas de influenza A e B para vigilância viral



Soluções flexíveis de preparação de bibliotecas baseadas em enriquecimento para atender às necessidades do usuário



Resultados rápidos com um fluxo de trabalho de sequenciamento de ponta a ponta no MiSeq i100 Series e DRAGEN™ secondary analysis

## Introdução

Os vírus influenza são uma causa comum de infecções respiratórias agudas que podem resultar em morbidade e mortalidade significativas em todo o mundo.<sup>1</sup> Os vírus influenza A e B possuem genomas compostos por oito segmentos de RNA de fita única de sentido negativo. É importante observar que os segmentos genômicos de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) são importantes para a imunidade e constituem a base para a detecção de subtipos.<sup>2</sup> As mutações nos produtos gênicos de HA e NA são alvos importantes da resposta imune, incluindo a fuga de anticorpos do hospedeiro, o desenvolvimento de resistência a medicamentos e o aumento da virulência.<sup>2</sup> Portanto, o monitoramento contínuo é necessário na forma de uma vigilância viral completa e oportuna para orientar a composição de vacinas, avaliar o potencial pandêmico e direcionar as respostas de saúde pública.<sup>3,4</sup>

Historicamente, a vigilância da influenza dependia muito do isolamento e da amplificação do vírus usando métodos de cultura celular antes da caracterização genética. Embora eficaz, esse método exigiu atrasos significativos no tempo até os resultados e poderia enviar as sequências do genoma viral devido à adaptação durante a cultura.<sup>5</sup> Em contraste, o sequenciamento de última geração (NGS) fornece perfilamento genômico não tendencioso, melhorando a velocidade e a resolução da detecção e caracterização do vírus influenza, permitindo uma abordagem de "sequenciamento em primeiro lugar" diretamente de amostras de pesquisa clínica.<sup>6</sup>

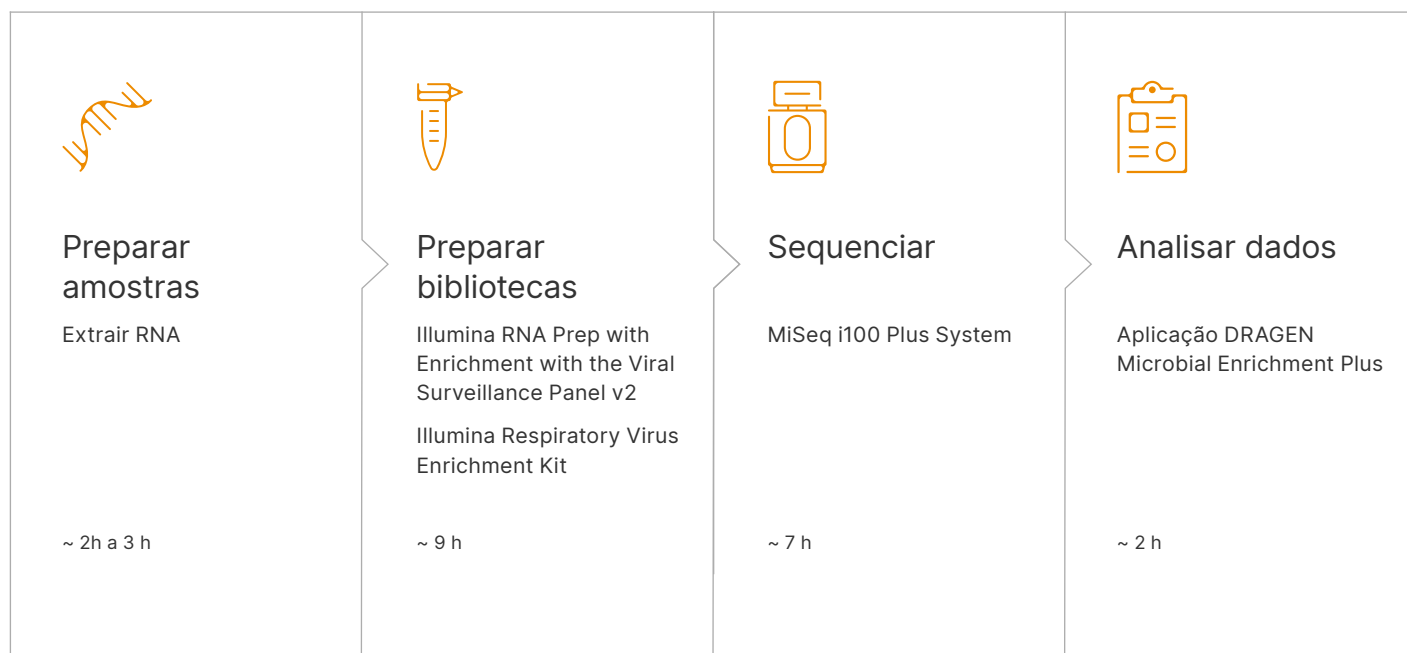
Métodos de NGS direcionados, incluindo sequenciamento baseado em enriquecimento, fornecem informações de variantes altamente precisas, reduzindo significativamente o tempo de resposta, resultando em vigilância genômica em tempo real dos vírus influenza para apoiar respostas de saúde pública precisas e oportunas.

Esta nota de aplicação demonstra a detecção e a caracterização de vírus influenza A e B em amostras elaboradas e em amostras reais de swab nasal usando um fluxo de trabalho flexível de NGS que inclui a preparação de bibliotecas baseada em enriquecimento da Illumina, o MiSeq i100 Series e o DRAGEN secondary analysis integrado, e pode ser concluída em menos de 24 horas (Figura 1).

## Métodos

### Amostras

Um total de 39 amostras foi testado, incluindo 12 amostras elaboradas e 27 amostras remanescentes não identificadas de swab nasofaríngeo positivas para influenza (Tabela 1). Amostras clínicas remanescentes não identificadas e resultados de RT-PCR associados foram fornecidos pela Aegis Labs (Nashville, TN, EUA).



**Figura 1: Fluxo de trabalho abrangente de NGS para sequenciamento do vírus influenza**

Combine o preparo de bibliotecas Illumina usando uma abordagem de enriquecimento direcionado com sequenciamento no MiSeq i100 Series e DRAGEN secondary analysis para detecção precisa e caracterização genômica dos vírus influenza A e B.

As amostras elaboradas foram preparadas fortificando 10 a 10.000 cópias de RNA genômico de influenza A (H1N1, H3N2) ou influenza B em 10 ng de RNA de Referência Humana Universal (UHRR) (Agilent Technologies, N.º do catálogo 740000-41) (Tabela 2 e Tabela 3).

As amostras de swab nasal foram submetidas a testes moleculares de diagnóstico para influenza A (H1N1, H3N2) e influenza B. Os ácidos nucleicos foram extraídos usando o QIAAsymphony SP Instrument (QIAGEN, N.º do catálogo 9001301), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1: Amostras testadas para avaliação de desempenho

Tipo de amostra	Detecção esperada	N.º de amostras
Amostras elaboradas (RNA genômico em UHRR)	Influenza A (H1N1)	4 <sup>a</sup>
	Influenza A (H3N2)	4 <sup>a</sup>
	Influenza B (linhagem Yamagata)	4 <sup>a</sup>
<b>N.º total de amostras elaboradas</b>		<b>12</b>
Amostras clínicas de swab nasofaríngeo positivas para influenza	Influenza A (H1N1)	7
	Influenza A (H3N2)	11
	Influenza B (linhagem Victoria)	9
<b>N.º total de amostras de swab</b>		<b>27</b>
<b>N.º total de amostras</b>		<b>39</b>
a. Cada amostra elaborada é uma titulação de 10, 100, 1.000 e 10.000 cópias virais fortificadas em UHRR para um estudo de limite de detecção; cada titulação tem uma única réplica para um total de quatro amostras por tipo de influenza.		

Tabela 2: Números de cópias virais para amostras elaboradas

Cópias/reação	Cópias/µl
10	1,2
100	12
1.000	118
10.000	1.175

Tabela 3: Cepas de influenza usadas para amostras elaboradas

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

## Preparação da biblioteca

As bibliotecas prontas para sequenciamento foram preparadas a partir de amostras usando o Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (Illumina, N.º do catálogo 20100469) ou o Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation (Illumina, N.º do catálogo 20040536) e o Viral Surveillance Panel v2 Kit (Illumina, N.º do catálogo 20108081). As bibliotecas preparadas com Illumina RNA Prep with Enrichment foram sequenciadas antes do enriquecimento (denominadas “bibliotecas shotgun”) para comparação.

## Sequenciamento

As bibliotecas enriquecidas foram sequenciadas no MiSeq i100 Plus System (Illumina, N.º do catálogo 20115695) usando uma lâmina de fluxo de 25M com uma configuração de corrida de 2 × 151 bp. As bibliotecas shotgun foram sequenciadas no NextSeq™ 550 System (Illumina, N.º do catálogo SY-415-1002) com uma configuração de corrida de 2 × 151 bp para comparação.

## Análise de dados

Os conjuntos de dados FASTQ tiveram a amostra reduzida para 500.000 clusters ou 2 M de leituras tipo paired-end (PE). Os arquivos FASTQ foram analisados usando a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus no MiSeq i100 Plus System ou no BaseSpace™ Sequence Hub com referências do Viral Surveillance Panel v2 ou do Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit. As bibliotecas Shotgun foram analisadas com a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus e referências do Viral Surveillance Panel v2. Análises estatísticas e visualização de dados foram realizadas usando o [GraphPad Prism 10](#) e o [JMP 18](#).

## Resultados

### Métricas de sequenciamento

As bibliotecas enriquecidas foram sequenciadas em duas corridas no MiSeq i100 Plus System. Todas as corridas geraram dados de alta qualidade com > 94 % das leituras no filtro de passagem (PF). O número total de leituras de PE de PF excedeu 64 M de leituras por corrida, sustentando a análise posterior com alta confiança. Para ambas as corridas, o tempo de corrida e análise combinado do instrumento foi inferior a 10 horas (Tabela 4). Isso demonstra que o MiSeq i100 Plus System oferece a velocidade e a eficiência para fornecer resultados oportunos importantes para o monitoramento e a resposta da saúde pública.

### Cobertura do genoma em diferentes concentrações de genoma viral

A avaliação da cobertura do genoma, da profundidade média de sequenciamento e dos valores de leituras por quilobase por milhão de leituras mapeadas (RPKM) demonstra o desempenho excepcional tanto do Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit quanto do Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 na detecção de subtipos de influenza até 100 cópias virais (Figura 2).

### Detecção de influenza A e B em amostras de swab nasofaríngeo

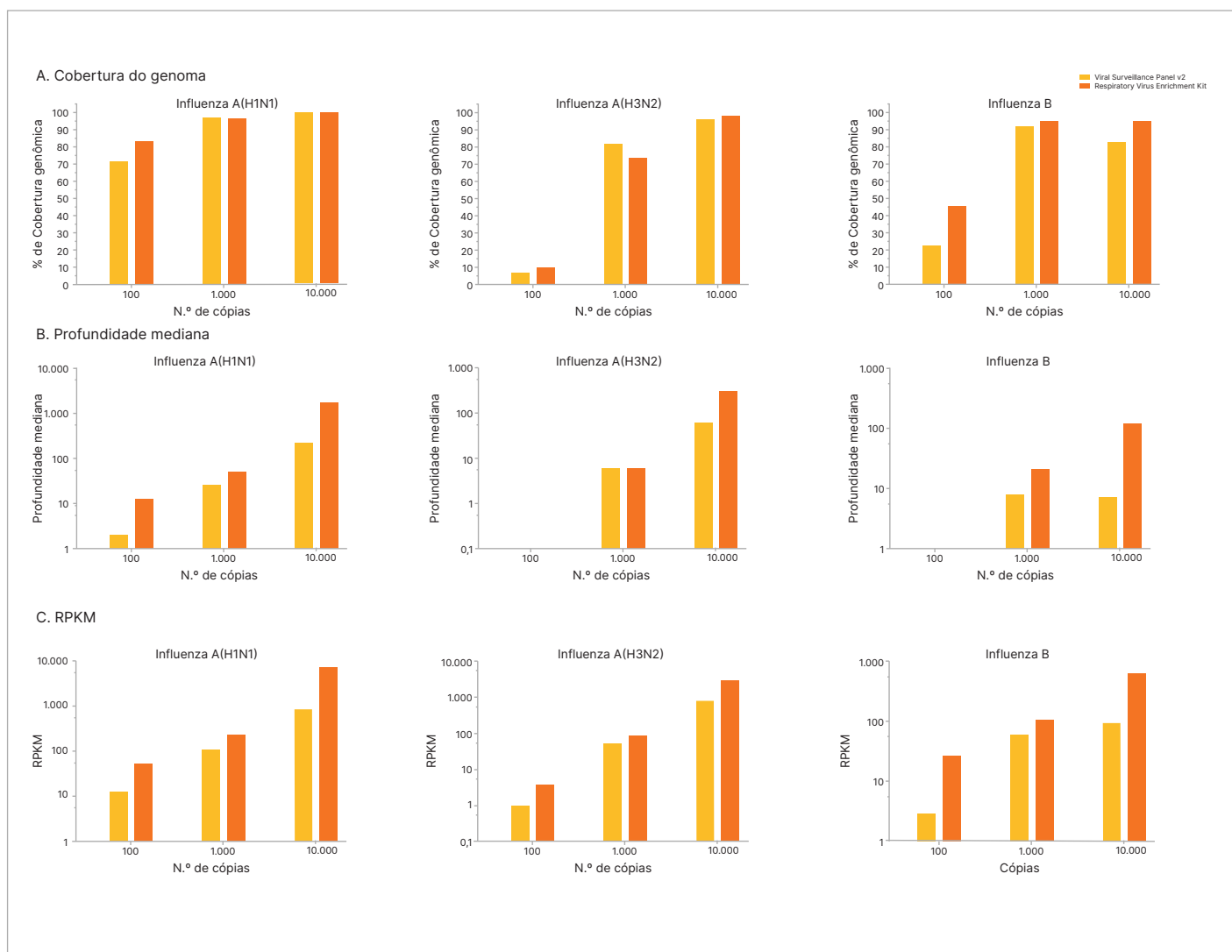
Para avaliar o desempenho em amostras reais, foram processadas amostras de swab nasofaríngeo positivas para influenza usando abordagens de sequenciamento de enriquecimento e shotgun. As bibliotecas shotgun sequenciadas no NextSeq 550 System demonstraram menor cobertura do genoma, particularmente em amostras com menor abundância viral (conforme indicado por valores mais altos de Ct de qRT-PCR), em relação aos fluxos de trabalho de enriquecimento no MiSeq i100 Plus System (Figura 3).

O Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit e o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 detectaram com sucesso influenza A (H1N1), com 71 % das amostras de swab nasal alcançando > 95 % de bases identificáveis e mantendo forte cobertura em amostras com cargas virais mais baixas (Figura 3A). Foi observado desempenho semelhante para influenza A H3N2, com 82 % das amostras alcançando > 95 % de bases identificáveis (Figura 3B) e para influenza B, com 77 % das amostras alcançando > 95 % de bases chamáveis (Figura 3C). Amostras representativas de swab nasal com baixos valores de Ct e alta abundância viral demonstraram cobertura abrangente do genoma com ambos os kits de preparação da biblioteca (Figura 4).

Tabela 4: Métricas de sequenciamento para MiSeq i100 Series<sup>a</sup>

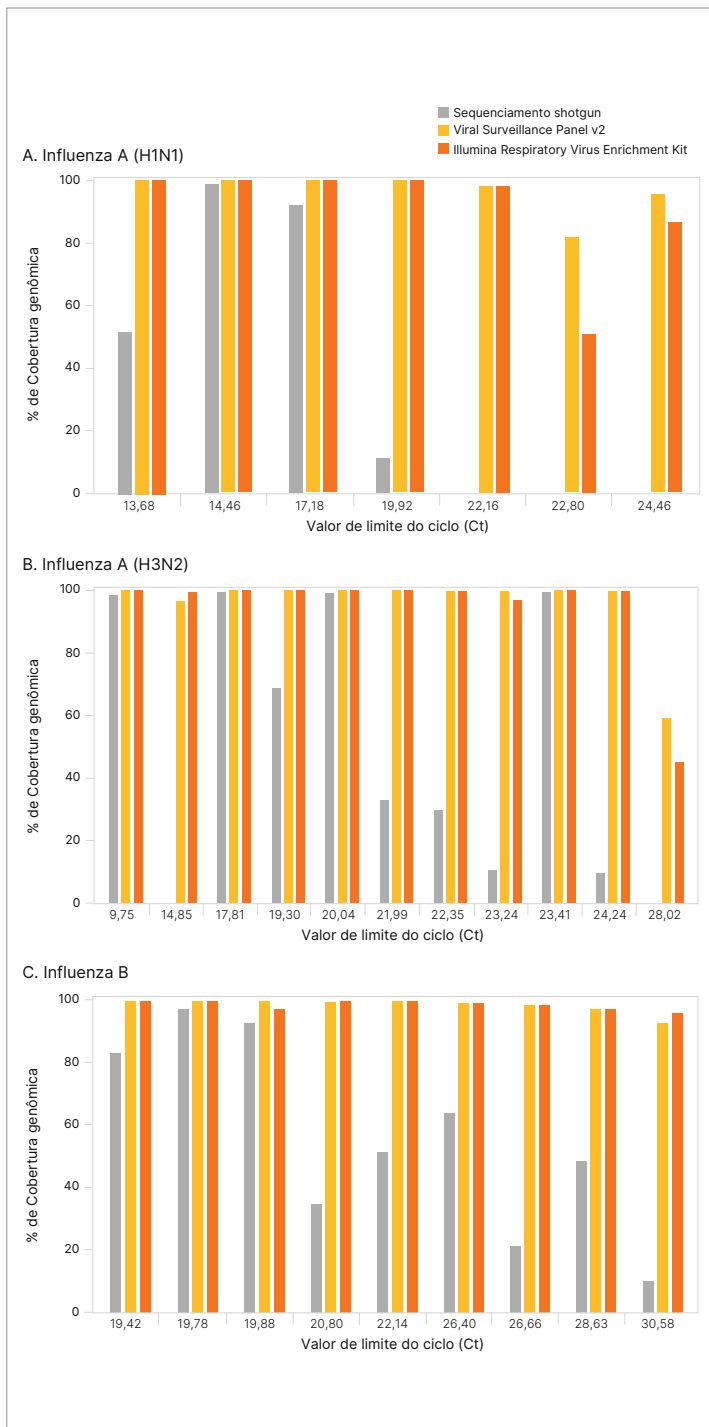
Corrida	Tipo de biblioteca	N.º de amostras	Tempo da corrida de sequenciamento	Tempo de análise com o DRAGEN Microbial Enrichment Plus <sup>b</sup>	N.º total de leituras de PE de PF	% PF
1	Viral Surveillance Panel v2	30	7 h 11 min	1 h 41 min	67.382.396	95,25 %
2	Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit	30	7 h 12 min	2 h 18 min	67.083.162	94,36 %

a. Métricas para bibliotecas shotgun não estão incluídas nesta tabela.  
b. A análise foi realizada no MiSeq i100 Plus System.  
c. A análise foi realizada no BaseSpace Sequence Hub.



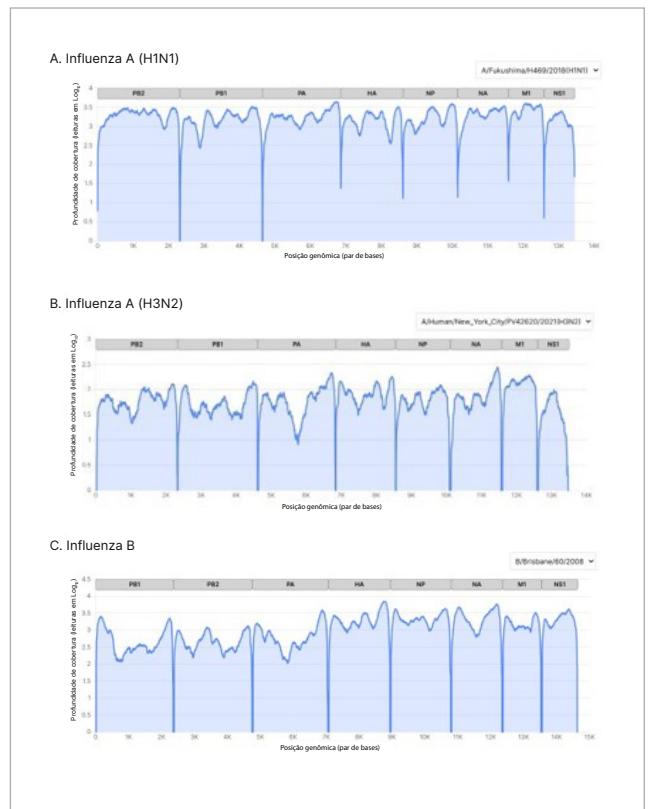
**Figura 2: Os painéis de enriquecimento da Illumina demonstram detecção excepcional de genomas virais**

(A) Cobertura do genoma, (B) profundidade média e (C) leituras por quilobase por milhão de leituras mapeadas (RPKM) foram avaliadas para influenza A (H1N1), influenza A (H3N2) e influenza B para 100 cópias virais, 1.000 cópias virais e 10.000 cópias virais. Com o Viral Surveillance Panel v2 (barras amarelas) e o Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barras laranjas) foram detectados com sucesso subtipos de influenza de até 100 cópias.



**Figura 3: Detecção de subtipos de influenza em amostras de swab nasofaríngeo**

O Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit (barras amarelas) e o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 (barras laranja) detectaram com sucesso (A) influenza A H1N1, (B) influenza A H3N2 e (C) influenza B em amostras clínicas em uma faixa de abundância viral (indicada pelo valor de Ct de qRT-PCR). A cobertura do genoma foi mantida na maioria dos níveis de abundância viral com cobertura reduzida para as amostras de abundância viral mais baixas. Os dados foram comparados ao sequenciamento shotgun (barras cinza).



**Figura 4: Cobertura genômica de segmentos de subtipos de influenza em amostras de swab nasofaríngeo**

O Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit e o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 mostraram cobertura abrangente do genoma para todos os segmentos, incluindo HA e NA para (A) influenza A H1N1, (B) influenza A H3N2 e (C) influenza B em amostras clínicas representativas com baixos valores de Ct e alta abundância viral.

## Resumo

O MiSeq i100 Series combinado com preparação de bibliotecas de alta qualidade usando o Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit ou o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 demonstrou recursos de sequenciamento direcionados para detecção e caracterização de subtipos de influenza. Ambos os métodos baseados em enriquecimento produziram cobertura completa do genoma de cepas de influenza, com menor suscetibilidade a desafios conhecidos na amplificação de influenza. Esta nota de aplicação demonstra que o MiSeq i100 Series faz parte de um fluxo de trabalho de NGS flexível e eficiente para caracterização de influenza que fornece resultados rápidos para atender às necessidades do usuário.

## Saiba mais

[MiSeq i100 Series](#)

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[Illumina Respiratory Virus Enrichment Kit](#)

## Referências

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)). Publicado em 28 de fevereiro de 2025. Acessado em 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. World Health Organization. Global Influenza Strategy 2019–2030. [who.int/publications/i/item/9789241515320](https://www.who.int/publications/i/item/9789241515320). Publicado em 15 de março de 2019. Acessado em 21 de abril de 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/NEJMs1813907



+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](https://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-03572 PTB v1.0