

Illumina Microbial Amplicon Prep— Influenza A/B

Optimierte Lösung zur
Bibliotheksvorbereitung für die
Erforschung des Influenzavirus
und die Surveillance im Bereich
der öffentlichen Gesundheit

- Ermöglicht die schnelle, verzerrungsfreie Coverage des Genoms von Influenza-A- und Influenza-B-Virusstämmen
- Geeignet für RNA-Zugaben einer Vielzahl von Probenotypen und Viruslasten
- Vereinfacht die Genomanalyse sowie die Varianteninterpretation



Einleitung

Influenza-A- und Influenza-B-Virusstämme können saisonale, pandemische und zoonotische Ausbrüche von Atemwegserkrankungen verursachen. Sie stellen damit weltweit eine Bedrohung für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. Im Rahmen der COVID-19-Pandemie haben sich die Vorteile einer auf Next-Generation Sequencing (NGS, Sequenzierung der nächsten Generation) basierenden genomischen Surveillance von Pathogenen gezeigt, durch die Forscher aufkommende Varianten verfolgen und entsprechende Maßnahmen im Bereich der öffentlichen Gesundheit koordinieren können. Ähnliche ampliconbasierte Ansätze wurden für die Sequenzierung und Charakterisierung von Influenzaviren angewendet.^{1,2} Das Genom der Influenzaviren weist jedoch eine Variabilität auf, was die präzise Sequenzierung erschwert. Außerdem sind zahlreiche verfügbare Sequenzierungsprotokolle nicht entsprechend optimiert. Dies führt mitunter zu Abweichungen bei den Sequenzierungsergebnissen.

Das Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit basiert auf dem bewährten Illumina COVIDSeq™ Assay und ermöglicht die genaue, schnelle, unverzerrte Sequenzierung und Charakterisierung von Influenzaviren. Die Nutzung gemeinsam mit der anwenderfreundlichen DRAGEN™ Targeted Microbial App vereinfacht die Datenanalyse und ermöglicht Laboren die Bestimmung von Varianten und Virensubtypen, ohne dass hierfür Fachkenntnisse im Bereich Bioinformatik erforderlich sind. Das Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit ermöglicht Forschern im Rahmen eines integrierten, skalierbaren Workflows (Abbildung 1) die Ausweitung der genomischen Surveillance zum Schutz der öffentlichen Gesundheit vor Ort.

Optimierter Workflow

Bei Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B handelt es sich um eine hochmultiplexierte Lösung auf Basis von RT-PCR für die Bibliotheksvorbereitung, die die schnelle, unverzerrte Sequenzierung und Charakterisierung von Influenzaviren (Tabelle 1) ermöglicht. Dieses Kit basiert auf dem zuverlässigen Workflow des COVIDSeq Assay von Illumina und umfasst Schritte zur Isolierung von Genmaterial durch Sequenzierung und Datenanalyse zum Nachweis sowie zur Charakterisierung von Influenzavirusstämmen (Abbildung 1).

Bibliotheksvorbereitung

Das Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit umfasst die für die reverse Transkription von RNA erforderlichen Reagenzien, die PCR-Amplifikation, Bead-Linked-Transposome für die Amplicontagmentation und indizierte Adapter zur Generierung von Sequenzierungsbibliotheken aus Genomampliconen (Abbildung 2). Das Kit ist für RNA geeignet, die mit handelsüblichen Kits extrahiert wurde.

Tabelle 1: Gesamtbearbeitungszeit und manueller Aufwand

Anzahl der Proben	Bearbeitungszeit	Manueller Aufwand
8 Proben	8 Stunden	1,9 Stunden
48 Proben	9,3 Stunden	3,2 Stunden

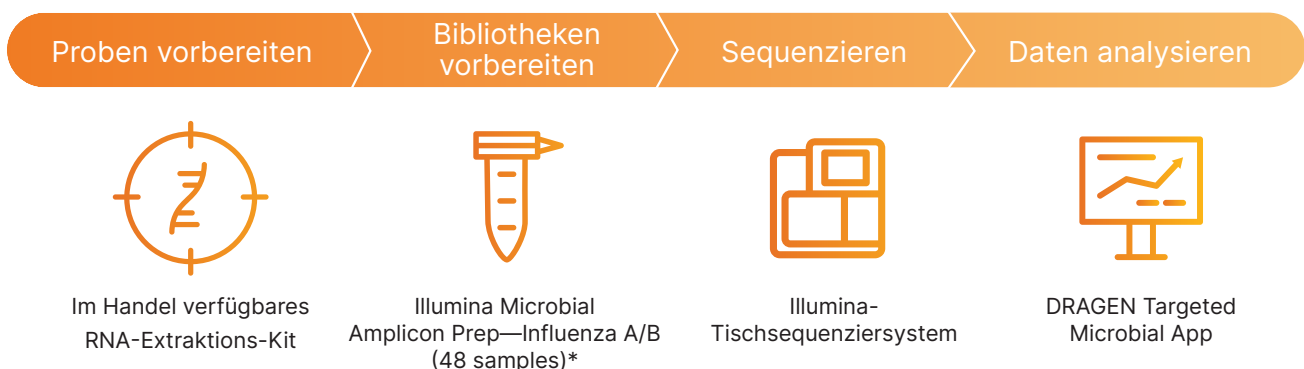


Abbildung 1: Workflow von Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B: In einem optimierten Workflow werden Influenzavirus-Bibliotheken mit dem Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit vorbereitet, mit einem beliebigen Illumina-Tischsequenziersystem sequenziert und für Erkennung, Varianten-Calling und Stammtypisierung in der DRAGEN Targeted Microbial App analysiert. * Das Kit enthält alle für die Bibliotheksvorbereitung erforderlichen Reagenzien, einschließlich eines universellen Primer-Pools für Influenza-A/B-Viren, RT-PCR-Reagenzien und eindeutiger dualer Indizes. Reagenzien für die RNA-Extraktion sind nicht enthalten.

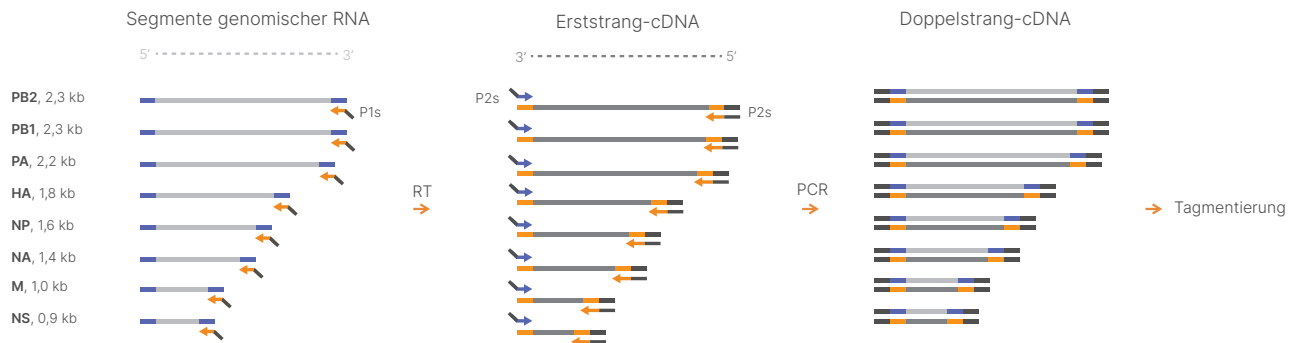


Abbildung 2: Universelles RT-PCR-Verfahren für das Genom von Influenza-A/B-Viren zur Generierung von tagmentierungsfertigen Amplikons: Der Influenza-A/B-Primer-Pool umfasst 16 Primer für die Hybridisierung an die 3'-Enden des ersten und zweiten Strangs komplementärer DNA (cDNA, complementary DNA). Dies ermöglicht sowohl die cDNA-Synthese in voller Länge für sämtliche Segmente genomischer RNA als auch die anschließende PCR-Amplifikation. Dadurch lassen sich vollständige Amplikons generieren, die bereit für die Tagmentierung sowie die Erstellung von Bibliotheken sind. Orangefarbene Linien stellen die konservierten nicht codierenden Regionen des genomischen RNA-Segments dar. Schwarze Linien stellen die zusätzlichen DNA-Sequenzen dar, die von den Universal-Primern hinzugefügt wurden.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken können auf jedem Sequenziersystem von Illumina sequenziert werden. Aufgrund der 48-Proben-Konfiguration von Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B eignet sich das Kit jedoch ideal für Tischplattformen wie die Systeme iSeq™ 100, MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 500, NextSeq 550, NextSeq 1000 und NextSeq 2000.

Datenanalyse

Die Illumina DRAGEN Targeted Microbial App steht in BaseSpace™ Sequence Hub kostenlos zur Verfügung. Die anwenderfreundliche App ermöglicht das Alignment von Reads auf Referenzgenome, das Varianten-Calling sowie die Erstellung einer Konsens-Genomsequenz, die die Verbreitung der Nukleinsäurespezies in der Probe darstellt (Abbildung 3). Wenn verfügbar, werden für eine weiterführende Lineage-Analyse externe kuratierte Datenbanken hinzugezogen.

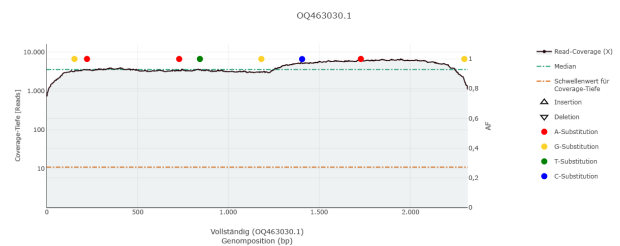


Abbildung 3: Coverage-Diagramm für das Influenza-A-Virus, erstellt in der DRAGEN Targeted Microbial App: Die Ausgabe des Coverage-Diagramms der DRAGEN Targeted Microbial App ist interaktiv. Das Umschalten auf die Log-Skala, das Ein- oder Ausblenden der Medianlinien der Coverage und/oder von Informationen zur Substitution/Deletion sind möglich. Bei segmentierten Viren wie Influenza-A- und Influenza-B-Viren werden die einzelnen Segmente in separaten Coverage-Diagrammen dargestellt. Jeder Kreis steht für einen SNP, der vom Referenzgenom abweicht. Die Farbe gibt an, ob es sich um eine A-, G-, T- oder C-Substitution handelt. Insertionen und Deletionen werden durch Dreiecke gekennzeichnet. Interaktive Diagramme können wie hier dargestellt als PNG-Dateien heruntergeladen werden.

Herausragende Coverage beim Genom von Influenza-A/B-Viren

ILLUMINA Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B bietet eine umfassende Sequenz-Coverage sowohl für das Genom von Influenza-A- als auch für das Genom von Influenza-B-Viren. Dieses Kit enthält einen Pool von 16 umfassend getesteten, etablierten Universal-Primern^{3, 4}, die eine Coverage von mehr als 98 % für Influenza-A- und Influenza-B-Virusstämme bieten, einschließlich der hochvariablen Neuraminidase (NA)- und Hemagglutinin (HA)-Gene (Abbildung 4, Abbildung 5).⁵

Mithilfe von Standardextraktionsprotokollen isolierte RNA-Proben müssen zur Untersuchung mit dem flexiblen Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit nicht modifiziert werden. In der klinischen Forschung verwendete Proben (einschließlich Nasenabstriche) unterscheiden sich in Bezug auf Qualität und Viruslast mitunter deutlich. Das Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit zeichnet sich durch eine hohe Leistung bei Virusisolaten mit Ct-Werten zwischen 21,2 und 31,1 aus (d. h. von hohen bis hin zu niedrigen Virustitern). Für optimale Ergebnisse werden Proben mit Ct-Werten unter 30 empfohlen.



Abbildung 4: Diagramme zur genomischen Coverage bei Influenza-A-Virusproben: Beispieldiagramme für die Coverage bei einer als Nasopharyngealabstrich entnommener H1N1-Virusprobe (Ct-Wert = 21,2, ca. 482 Kopien viraler RNA), die eine genomweite Coverage über alle acht Segmente des Influenza-A-Virus hinweg zeigen. Die einzelnen Diagramme stellen die Coverage bei den einzelnen Segmenten des Influenza-A-Virusgenoms dar. In allen Diagrammen werden die Referenzgenomaufnahme-IDs angegeben. Gepunktete Linien stellen die mittlere Coverage-Tiefe dar. Für die Datenanalyse wurden eine Mio. Paired-End-Reads (2×149 bp) verwendet. Die Daten wurden mit der DRAGEN Targeted Microbial App analysiert.



Abbildung 5: Diagramme zur genomischen Coverage bei Influenza-B-Virusproben: Beispieldiagramme für die Coverage bei einer Influenza-B-Virusprobe (ATCC VR-1735, Ct-Wert = 22,1, ca. 85.000 Kopien viraler RNA), die eine genomweite Coverage über alle acht Segmente des Influenza-B-Virusgenoms dar. In allen Diagrammen werden die Referenzgenomaufnahme-IDs angegeben. Gepunktete Linien stellen die mittlere Coverage-Tiefe dar. Für die Datenanalyse wurden eine Mio. Paired-End-Reads (2×149 bp) verwendet. Die Daten wurden mit der DRAGEN Targeted Microbial App analysiert.

Zusammenfassung

Das Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B Kit bietet im Bereich der öffentlichen Gesundheit tätigen Forschern eine optimierte Lösung für die Charakterisierung und Surveillance von Influenzaviren zum Schutz der öffentlichen Gesundheit. Dieser flexible Assay eignet sich für RNA-Zugaben, die aus Kulturen oder Nasenabstrichen bzw. -spülungen extrahiert wurden. Dank der Integration in innovative NGS-Plattformen sind eine außergewöhnliche Datenqualität, Flexibilität und Skalierbarkeit gewährleistet, was eine äußerst effektive Surveillance im Bereich der öffentlichen Gesundheit sowie die entsprechende Erforschung von Influenzaviren ermöglicht.

Weitere Informationen

[Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B](#)

[Mikrobielle Genomik](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B (48 samples)	20106305

Quellen

1. Lee HK, Lee CK, Tang JWT, Loh TP, Koay ESC. [Contamination-controlled high-throughput whole genome sequencing for influenza A viruses using the MiSeq sequencer.](#) *Sci Rep.* 2016;6:33318. doi:10.1038/srep33318
2. Imai K, Tamura K, Tanigaki T, et al. [Whole Genome Sequencing of Influenza A and B Viruses With the MinION Sequencer in the Clinical Setting: A Pilot Study.](#) *Front Microbiol.* 2018;9:2748. doi:10.3389/fmicb.2018.02748
3. Zhou B, Wentworth DE. [Influenza A virus molecular virology techniques.](#) *Methods Mol Biol.* 2012;865:175-192. doi:10.1007/978-1-61779-621-0_11
4. Zhou B, Lin X, Wang W, et al. [Universal influenza B virus genomic amplification facilitates sequencing, diagnostics, and reverse genetics.](#) *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1330-1337. doi:10.1128/JCM.03265-13
5. Protocols.io. A sequencing and subtyping protocol for influenza A and B viruses using Illumina COVIDSeq Assay Kit. www.protocols.io/view/a-sequencing-and-subtyping-protocol-for-influenza-n2bvj8mrxgk5. Veröffentlicht am 28. März 2023. Abgerufen am 21. Juni 2023.



+1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) | +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA)
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 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-01898 DEU v1.0