

Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B

Solução eficiente em preparação de bibliotecas para pesquisa sobre o vírus da influenza e vigilância da saúde pública

- Permite cobertura rápida, imparcial e do genoma completo das cepas do vírus da influenza A e B
- Adapta entradas de RNA de uma variedade de tipos de amostras e cargas virais
- Simplifica a análise do genoma completo e a interpretação de variantes

illumina[®]

Introdução

As cepas do vírus da Influenza A e B podem causar surtos sazonais, pandêmicos e zoonóticos de doença respiratória, o que representa uma ameaça global à saúde humana e animal. A pandemia da COVID-19 comprovou a importância da vigilância genômica de patógenos com base no sequenciamento de última geração (NGS), possibilitando que os pesquisadores rastreiem variantes emergentes e direcionem a resposta da saúde pública. Abordagens semelhantes baseadas em amplicon têm sido aplicadas para sequenciar e caracterizar vírus da influenza.^{1,2} No entanto, os vírus da influenza apresentam alta variabilidade genômica, dificultando o sequenciamento preciso. Além disso, muitos protocolos de sequenciamento disponíveis não são eficientes e podem produzir resultados de sequenciamento variáveis.

O kit Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B baseia-se no Illumina COVIDSeq™ Assay qualificado e permite sequenciamento e caracterização precisos, rápidos e imparciais dos vírus da influenza. A integração com o aplicativo de fácil uso DRAGEN™ Targeted Microbial simplifica a análise de dados, fazendo com que a identificação de variantes e a subtipagem viral sejam acessíveis aos laboratórios sem experiência em bioinformática. Como parte de um fluxo de trabalho integrado e dimensionável (Figura 1) o kit Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B permite que os pesquisadores expandam suas atividades em vigilância genômica para proteger a saúde de suas comunidades.

Fluxo de trabalho simplificado

O Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B é uma solução altamente multiplexada para preparação de bibliotecas baseadas em RT-PCR que permite sequenciamento e caracterização rápidos e imparciais do vírus da influenza (Tabela 1). Este kit, baseado no robusto fluxo de trabalho Illumina COVIDSeq Assay, inclui etapas para isolamento de material genético por meio de sequenciamento e análise de dados para detecção e caracterização de cepas do vírus da influenza (Figura 1).

Preparação da biblioteca

O kit Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B inclui os reagentes necessários para transcrição reversa de RNA, amplificação de PCR, transposomas ligados a bead para tagmentação de amplicon e adaptadores indexados para gerar bibliotecas de sequenciamento a partir de amplicons de genoma completo (Figura 2). O kit é compatível com RNA extraído que usa kits disponíveis comercialmente.

Tabela 1: Tempo de resposta total e tempo de trabalho efetivo

N.º de amostras	Tempo de resposta	Tempo de trabalho
8 amostras	8 horas	1,9 horas
48 amostras	9,3 horas	3,2 horas



Figura 1: Fluxo de trabalho Illumina Microbial Amplicon Prep-Influenza A/B — Em um fluxo de trabalho eficiente, as bibliotecas do vírus influenza são preparadas usando o kit Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B, sequenciadas em qualquer sistema de sequenciamento de bancada da Illumina e analisadas no aplicativo DRAGEN Targeted Microbial para detecção, chamada de variante e tipagem de cepas. *O kit fornece todos os reagentes necessários para preparação de biblioteca, inclusive um pool de primers universal do vírus da influenza A/B, reagentes RT-PCR e índices duplos exclusivos. Os reagentes de extração de RNA não estão incluídos.

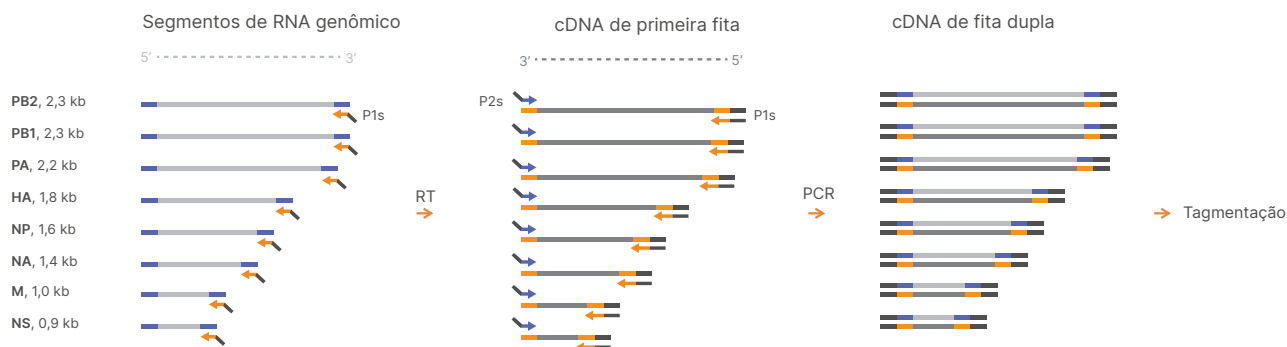


Figura 2: Abordagem universal de RT-PCR de genoma completo do vírus da influenza A/B para gerar amplicons preparados para tagmentação — O pool de primers de influenza A/B contém 16 primers projetados para hibridizar às extremidades de 3' da primeira e segunda fitas de DNA complementares (cDNA), permitindo síntese completa de cDNA de cada segmento de RNA genômico e subsequente amplificação de PCR para produzir amplicons completos prontos para tagmentação e conclusão da biblioteca. As linhas azul e laranja representam as regiões não codificadas conservadas do segmento de RNA genômico. As linhas pretas representam as sequências de DNA adicionais adicionadas pelos primers universais. As linhas cinza-claro correspondem aos RNAs genômicos ou cDNA de segunda fita e as linhas cinza-escuro correspondem ao cDNA de primeira fita.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas podem ser sequenciadas em qualquer sistema de sequenciamento da Illumina. Entretanto, a configuração de 48 amostras do Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B torna-o ideal para plataformas de bancada, inclusive os sistemas iSeq™ 100, MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ 500, NextSeq 550, NextSeq 1000 e NextSeq 2000.

Análise de dados

O aplicativo Illumina DRAGEN Targeted Microbial está disponível gratuitamente no BaseSpace™ Sequence Hub. O aplicativo de fácil uso alinha leituras a genomas de referência, variantes de identificações e gera uma sequência do genoma em consenso que representa a população de espécies de ácido nucleico na amostra (Figura 3). Quando disponíveis, bancos de dados externos selecionados são acessados para análise de linhagem adicional.

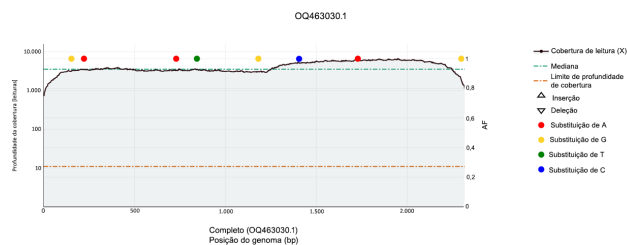


Figura 3: Gráfico de cobertura do vírus da influenza A gerado usando o aplicativo DRAGEN Targeted Microbial — Os resultados do gráfico de cobertura do aplicativo DRAGEN Targeted Microbial são interativos, com a funcionalidade de alternar entre log-escala, incluir ou excluir linhas de cobertura medianas e/ou substituir/excluir informações. Para vírus segmentados, como os vírus da influenza A e B, cada segmento é exibido em um gráfico de cobertura separado. Cada círculo representa um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, Single nucleotide polymorphism) que varia do genoma de referência. Cada cor indica se é uma substituição de A, G, T ou C. Inserções e exclusões também são indicadas por triângulos. Os gráficos interativos podem ser baixados como arquivos de extensão PNG, como exibido aqui.

Cobertura excelente nos genomas do vírus de influenza A/B

O Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B é projetado para fornecer extensa cobertura de sequência nos genomas de ambos os vírus de influenza A e B. Esse kit inclui um pool de 16 primers universais bem testados e estabelecidos^{3,4} que fornece cobertura de mais de 98% para cepas de vírus de influenza A e B, inclusive os genes altamente variáveis Neuraminidase (NA) e Hemaglutinina (HA) (Figura 4, Figura 5).⁵

O kit flexível Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B é compatível com amostras de RNA isoladas usando protocolos de extração padrão sem a necessidade de modificações. Amostras de pesquisa clínica, inclusive swabs nasais, podem variar em qualidade e carga viral. O kit Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B mantém excelente desempenho em isolados de vírus com valores de Ct que variam de 21,2, a 31,1 (ou seja, de titulações de vírus altas a baixas). Para resultados ideais, são recomendadas amostras com valores de Ct inferiores a 30.

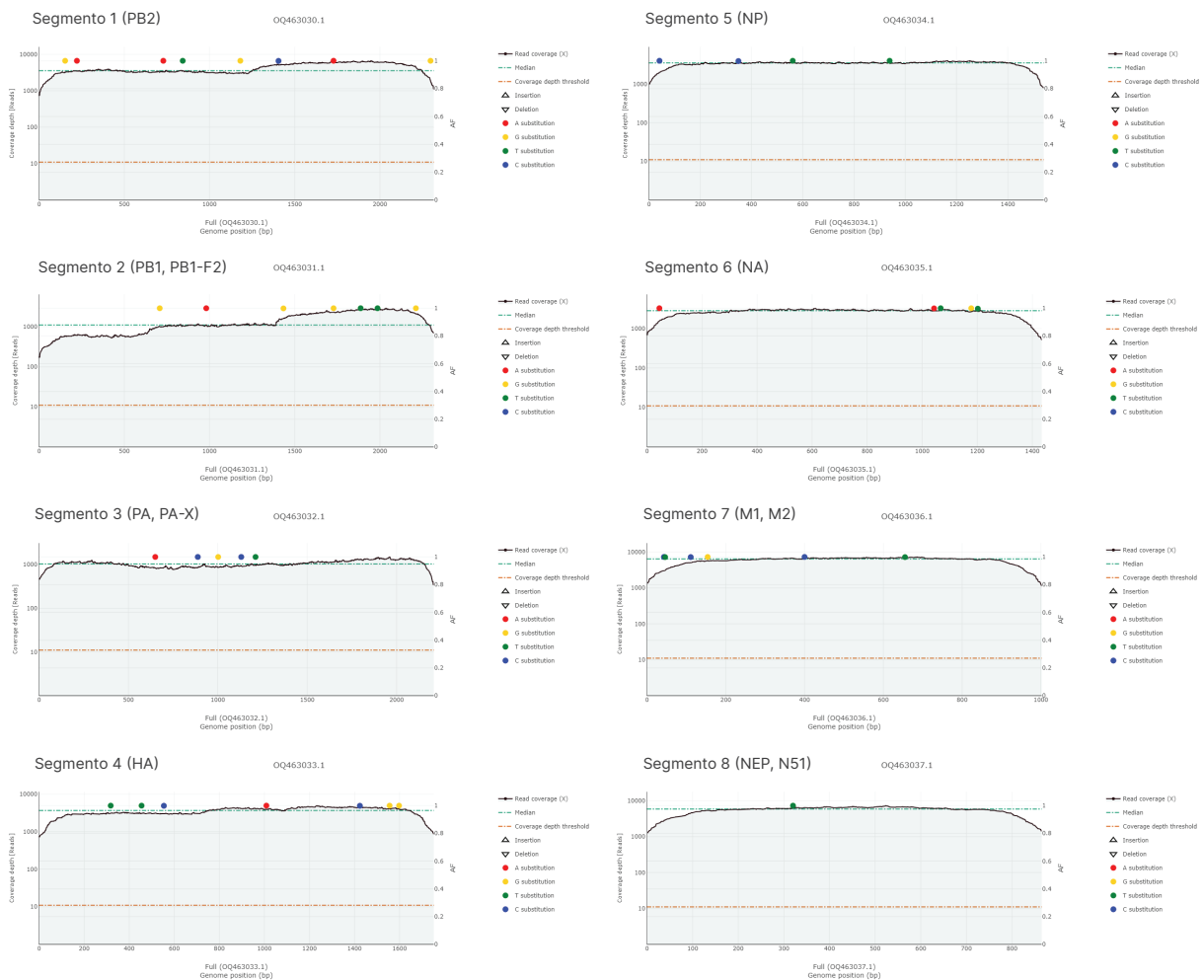


Figura 3: Gráficos de cobertura genômica para amostras de vírus de influenza A — Gráficos representativos de cobertura de uma amostra de vírus H1N1 (valor de Ct = 21,2, ~482 cópias de RNA viral) de swabs nasofaríngeos que exibem cobertura genômica ampla em todos os oito segmentos do vírus da influenza A. Cada gráfico representa a cobertura de cada segmento do genoma do vírus de influenza A. IDs de acesso ao genoma de referência são fornecidos em cada gráfico. As linhas pontilhadas representam profundidade de cobertura mediana. 1 milhão de leituras tipo paired-end (2 × 149 bp) foram usadas para análise de dados. Os dados foram analisados usando o aplicativo DRAGEN Targeted Microbial.



Figura 4: Gráficos de cobertura genômica para amostras de vírus de influenza B — Gráficos representativos de cobertura de uma amostra de vírus de influenza B (ATCC VR-1735, valor de Ct = 22,1, ~85 mil cópias de RNA viral) exibindo cobertura genômica ampla em todos os oito segmentos do vírus da influenza B. Cada gráfico representa a cobertura de cada segmento do genoma do vírus de influenza B. IDs de acesso ao genoma de referência são fornecidos em cada gráfico. As linhas pontilhadas representam profundidade de cobertura mediana. 1 milhão de leituras tipo paired-end (2×149 bp) foram usadas para análise de dados. Os dados foram analisados usando o aplicativo DRAGEN Targeted Microbial.

Resumo

O kit Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B permite que os pesquisadores de saúde pública protejam a saúde de suas comunidades ao fornecer uma solução simples para caracterização e vigilância do vírus da influenza. O ensaio flexível é compatível com entradas de RNA extraídas de culturas ou swabs nasais e limpezas com cargas virais variáveis. A integração com inovadoras plataformas de NGS propicia qualidade dos dados excepcional, flexibilidade e escalabilidade para uma vigilância de saúde pública altamente efetiva e pesquisa do vírus da influenza de alto impacto.

Saiba mais

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

[Genômica microbiana](#)

Informações para pedido

Produto	N.º do catálogo
Illumina Microbial Amplicon Prep — Influenza A/B (48 amostras)	20106305

Referências

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-n2bvj8mrngxk5. Publicado em 28 de março, 2023. Acessado em 21 de junho, 2023.



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

© 2023 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.
M-GL-01898 PTB v1.0