

Viral Surveillance Panel v2

Optimierte
Genomsequenzierung für
die Surveillance und Forschung
im Bereich Hochrisikoviren

- Erweitertes Panel mit Coverage von ca. 200 Viren, darunter solchen, die für die öffentliche Gesundheit von Bedeutung sind¹⁻⁶
- Hybrid-Capture-Anreicherung von viralen RNA- und DNA-Pathogenen
- Integrierter, für zahlreiche Wirts- und Umgebungsprobentypen geeigneter Workflow⁷

Nachweis von Viren mit wesentlichen Auswirkungen zur Surveillance im Gesundheitswesen

Der viralen genomischen Surveillance kommt eine entscheidende Rolle bei der globalen Gesundheitssicherheit zu, da sie Erkenntnisse von unschätzbarem Wert zur Entwicklung sowie zur Verbreitung und zum Verhalten von Pathogenen liefert.¹ Die Analyse der genetischen Basis von Viren mithilfe von NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ermöglicht Wissenschaftlern die Verfolgung von Mutationen mit möglichen Auswirkungen auf Übertragbarkeit, Virulenz oder Behandlungsresistenz.⁸ Diese Informationen sind von höchster Bedeutung für die Entwicklung wirksamer Diagnostiktests, Therapeutika und Impfstoffe zur Bekämpfung neuer Infektionskrankheiten.

Beim Illumina Viral Surveillance Panel v2 handelt es sich um ein NGS-Panel für den Nachweis von ca. 200 Viren sowie die entsprechende Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing). (Die vollständige Liste finden Sie [hier](#)). Zum Umfang zählen auch Viren, die als wichtige Risiken für die öffentliche Gesundheit gelten¹⁻⁶ (Tabelle 1). Der Hybrid-Capture-Target-Anreicherungsworkflow des Panels ermöglicht die Sequenzierung unterschiedlicher Probenotypen ohne die hohe Read-Tiefe, die für die Shotgun-Metagenomsequenzierung erforderlich ist. Im Vergleich zu anderen Verfahren für die gezielte Resequenzierung (wie beispielsweise die Amplikon-Sequenzierung) zeichnet sich das Hybrid-Capture-Verfahren zudem durch eine einheitlichere virengenomübergreifende Coverage und eine höhere Fähigkeit zur Bestimmung

von Mutationen und divergenten Sequenzen aus. Damit ist das Viral Surveillance Panel v2 bestens für die Surveillance von Ausbrüchen und die Überwachung von Varianten geeignet.

Optimierter NGS-Workflow

Beim Workflow des Viral Surveillance Panel v2 können virale Genome aus einer Reihe von Probenotypen angereichert werden, darunter Abwasser, Serum, Plasma, Hautläsionen und Nasopharyngealabstriche.⁷ Bibliotheken werden anhand von aus Wirts- oder Umgebungsproben extrahierter RNA oder DNA vorbereitet, auf einem Illumina-Tischsequenziersystem sequenziert und mit der DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus App analysiert, die in BaseSpace™ Sequence Hub verfügbar ist. Die Bibliotheksvorbereitungs- und Sequenzierungsschritte können in zwei Tagen mit minimalem manuellen Aufwand durchgeführt werden⁷ (Abbildung 1).

Bibliotheksvorbereitung

Der Workflow zur Bibliotheksvorbereitung des Viral Surveillance Panel v2 umfasst Voranreicherungs- und Anreicherungs-schritte. Bei der Voranreicherung werden Hunderttausende unspezifische Bibliotheken generiert, die im Rahmen eines Hybrid-Capture-Verfahrens mit Viral Surveillance Panel v2-Sonden angereichert werden. Die Anreicherung auf Basis von On-Bead-Tagmentierung ermöglicht einen schnellen, für die Automatisierung geeigneten Workflow, der in etwa zwei Tagen mit minimalem manuellen Aufwand durchgeführt werden kann. Das Protokoll ist für Gesamt-Probenzugabemengen zwischen 10 und 100 ng Nukleinsäure sowie das Multiplexing von bis zu 384 Proben in einem einzigen Lauf geeignet.



Abbildung 1: Workflow des Viral Surveillance Panel v2: In einem optimierten, umfassenden Workflow werden Bibliotheken aus Umwelt- oder Wirtsproben vorbereitet, auf einem beliebigen Illumina-Sequenziersystem sequenziert und in der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App für die Virusbestimmung, die Generierung von Konsensus-Genomsequenzen, das Read-Mapping auf Viren mit der höchsten Übereinstimmung und die Stammpisierung analysiert. Die Dauer der Sequenzierung ist abhängig von der Proben-Read-Tiefe und dem jeweiligen Sequenziersystem.

Tabelle 1: Wichtige im Viral Surveillance Panel v2 enthaltene Hochrisikoviren

Adeno-assoziiertes Virus 2	Human Adenovirus A–G	Mayaro-Virus	Sabia-Virus
Aichivirus 1	Humanes Bocavirus	Masernvirus	Salivirus A
Aigai-Virus	Humanes Coronavirus	Menangle-Virus	Sizilianisches Sandmückenfiebertvirus
Bombali-Virus	Humanes Zytomegalievirus	MERS-Coronavirus	Sapovirus
Bourbon-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus 1/2	Mpox-Virus	SARS-CoV
Cache-Valley-Virus	Humanes Metapneumovirus	Mumpsvirus	SARS-CoV-2
Kalifornisches Enzephalitisvirus	Humanes Papillomavirus	Murray-Valley-Enzephalitis-Virus	Semliki-Forest-Virus
Chapare-Virus	Humanes Parainfluenzavirus 1–4	Nipah-Virus	SFTS-Virus
Chikungunya-Virus	Humanes Parechovirus	Norovirus	Sindbis-Virus
Colorado-Zeckenfieber-Virus	Humanes Parvovirus B19	Omsk-hämorrhagisches-Fieber-Virus	Snowshoe-Hare-Virus
Coxsackie-Virus A/B	Influenza-Virus A–C	O'nyong-'nyong-Virus	Sosuga-Virus
Krim-Kongo-Fieber-Virus	Jamestown Canyon-Virus	Oropouche-Virus	St.-Louis-Enzephalitis-Virus
Dengue-Virus 1–4	Japanische-Enzephalitis-Virus	Poliovirus	TcTV-2
Ebolavirus	Junin-Virus	Polyomavirus	Tahyna-Virus
Echovirus	Kyasanur-Wald-Fieber-Virus	Powassan-Virus	FSME-Virus
Enterovirus A–D	La-Crosse-Virus	Punta-Toro-Virus	Torque-Teno-Virus
Epstein-Barr-Virus	Lassavirus	Rabiesvirus	Toscana-Virus
Pferdeenzephalitis-Virus	Lloviu-Virus	Ravn-Virus	Usutu-Virus
Guanarito-Virus	Lujo-Virus	Respiratorisches Synzytial-Virus A/B	Varizella-Zoster-Virus
Hantavirus	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus	Rhinovirus A–C	Variolavirus
Heartland-Virus	Lyssavirus	Rifttal-Fieber-Virus	West-Nil-Virus
Henipavirus	Machupo-Virus	Ross-River-Virus	Gelbfieber-Virus
Hepatovirus A–E	Mamastrovirus	Rotavirus A/B/C/H	Zika-Virus
Herpes-simplex-Virus 1/2	Marburg-Virus	Rötelnvirus	

Sequenzierung

Aufgrund der geringeren Anforderungen an die Read-Tiefe bei mit dem Viral Surveillance Panel v2 angereicherten Bibliotheken können zahlreiche Sequenziersysteme verwendet werden, darunter die Tischsysteme MiniSeq™, MiSeq™ sowie NextSeq™ 550, NextSeq 1000 und NextSeq 2000. Die Anzahl der viruspezifischen Reads und die erzielte Sequenz-Coverage sind abhängig vom Virustiter, der Qualität der Nukleinsäureprobe, der Proben-Read-Tiefe sowie der Anzahl der Reads pro Probe. Die allgemeine Empfehlung für die Read-Tiefe bei der Sequenzierung von Proben guter Qualität beträgt mindestens 2 Mio. Gesamt-Reads pro Probe mit einer Read-Länge von 2×150 bp. Die empfohlene Read-Tiefe hängt zudem vom jeweiligen Probentyp ab. Für komplexere Proben (z. B. Abwasser) werden mindestens 8 Mio. Gesamt-Reads pro Probe empfohlen. Wenn andere mikrobielle Nukleinsäuren vorhanden sind, beispielsweise von in komplexen Probentypen enthaltenen Bakterien, sind zahlreiche Off-Target-Reads zu erwarten.

Datenanalyse

Die mit dem Viral Surveillance Panel v2 generierten Daten werden mit der anwenderfreundlichen DRAGEN Microbial Enrichment Plus App in BaseSpace Sequence Hub analysiert. Diese einfach zu verwendende Analysepipeline umfasst eine Kontrolle der Probenqualität, ein referenzgesteuertes Alignment auf eine umfassende, kuratierte Virusgenomdatenbank, das Varianten-Calling, die Generierung einer Virusgenom-Konsensussequenz, die Virenresistenzprognose für Influenza-A/B-Viren, flexible Berichtsoptionen und die Pangolin- und Nextclade-Integration zur weiterführenden phylogenetischen Zuordnung unterstützter Viren.

Performance

Target-Anreicherung

Im Vergleich zur Shotgun-Metagenomsequenzierung, bei der die gesamte RNA bzw. DNA sequenziert wird, minimiert das gezielte Hybrid-Capture-Verfahren des Viral Surveillance Panel v2 die unnötige Sequenzierung von RNA/DNA des Wirts bzw. von Mikroorganismen, die nicht von Interesse sind. Das senkt die Kosten und ermöglicht eine umfassende Sequenzierung von Virusgenomen auf Tischsequenziersystemen.⁷

Zur Beurteilung der Performance des Viral Surveillance Panel v2 wurden Multitarget-Virusproben mit unterschiedlichen Kopienzahlen und einem hohem Anteil von Human-RNA (10 ng) und Human-DNA (10 ng) künstlich erstellt (Tabelle 2).

Die Rekonstruktion viraler Genome unter Anreicherung mit dem Viral Surveillance Panel v2 wurde mit jener der Shotgun-Metagenomsequenzierung ohne Anreicherung verglichen. Das Viral Surveillance Panel v2 zeigte im Vergleich zur Shotgun-Metagenomsequenzierung bei künstlich generierten Multitarget-Proben eine überlegene Virusgenomrekonstruktion (Abbildung 2). Mit der Methode des Viral Surveillance Panel v2 wurden durchschnittlich 99,1 % des Genoms des humanen Adenovirus-E und 99,4 % des Genoms des Influenza-A-Virus (H3N2) über sechs Replikate mit 1.000 Genomkopien pro Reaktion rekonstruiert (Abbildung 2A, 2C). Die Shotgun-Metagenomsequenzierung zeigte eine signifikant geringere Genom-Coverage für denselben Virustiter. Bei Replikaten mit 1.000 Genomkopien pro Reaktion wurden im Durchschnitt nur 1,9 % des Genoms des Humanen Adenovirus E und 0 % des Genoms des Influenza-A-Virus (H3N2) rekonstruiert (Abbildung 2B, 2D).

Tabelle 2: Material der quantitativen Viruskontrollprobe zur Beurteilung der Performance des Viral Surveillance Panel v2

Referenzstamm	Material der Virus-Kontrollprobe	Anbieter	Katalog-Nr.
Humaner Adenovirus-4-Stamm RI-67	Quantitative genomische DNA	ATCC	VR-1572DG
Influenza-A-Virus-Stamm (H3N2) A/Wisconsin/15/2009	Quantitative genomische RNA	ATCC	VR-1882DQ

Klinische Restproben

Der flexible Workflow des Viral Surveillance Panel v2 eignet sich für aus unterschiedlichen klinischen Probentypen wie Plasma, Serum, Hautläsionen und Nasopharyngealabstrichen extrahierte RNA, DNA und Gesamtnukleinsäure. Durch die Verringerung des Anteils sequenzierter und angereicherter Wirts-Reads für gezielte Virus-Reads zeigt das Viral Surveillance Panel v2 eine höhere Virusgenom-Coverage sowie eine ebenfalls höhere mediane Coverage-Tiefe. Die Performance des Viral Surveillance Panel v2 wurde anhand von klinischen Restproben mit vorab bestimmten Viren bewertet (Tabelle 3). Alle mit dem Viral Surveillance Panel v2 angereicherten klinischen Restproben zeigten im Vergleich zur Shotgun-Metagenomsequenzierung eine erhöhte Empfindlichkeit bei der Detektion unterschiedlicher Viren (mit Ausnahme des humanen Immundefizienz-Virus 1) und Probentypen (Abbildung 3).

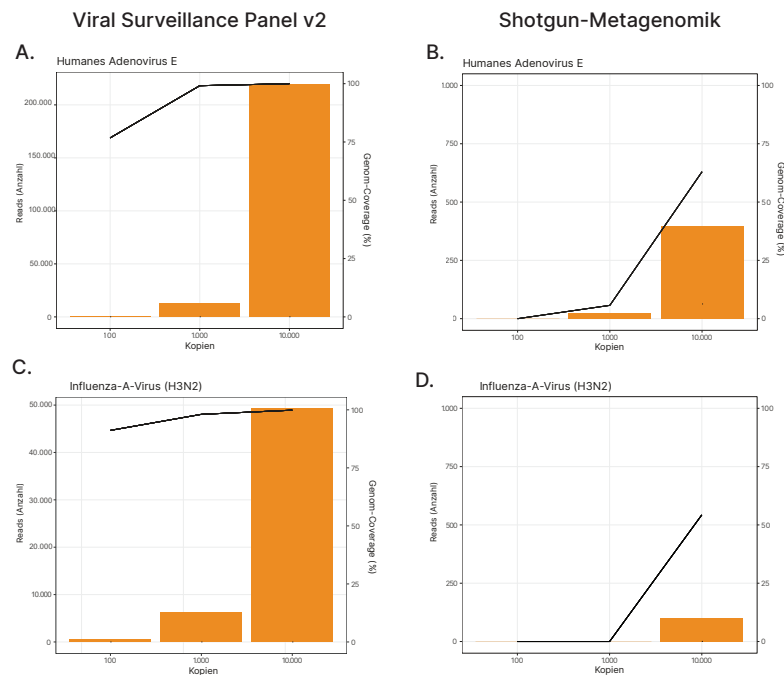


Abbildung 2: Höhere Read-Zahlen und Virusgenom-Coverage mit dem Viral Surveillance Panel v2: Die Performance des Viral Surveillance Panel v2 und der Shotgun-Sequenzierung ohne Anreicherung wurden unter Verwendung künstlicher quantitativer Multitarget-Proben verglichen. (A) Humanes Adenovirus 4 (Stamm RI-67), angereichert mit dem Viral Surveillance Panel v2, (B) Humanes Adenovirus 4 (Stamm RI-67), Shotgun-Metagenomsequenzierung ohne Anreicherung, (C) Influenza-A-Virus (H3N2), angereichert mit dem Viral Surveillance Panel v2, (D) Influenza-A-Virus (H3N2), Shotgun-Metagenomsequenzierung ohne Anreicherung. Sechs Replikate mit 1.000 Kopien/Reaktionsniveau jeder künstlich generierten Probe wurden auf dem NextSeq 550 System mit High-output-Fließzellen sequenziert. Die Sequenzierungsdaten wurden auf insgesamt 2 Mio. Reads normalisiert.

Tabelle 3: Zur Beurteilung der Performance des Viral Surveillance Panel v2 verwendete klinische Restproben

Vorab bestimmtes Virus	Probentyp	Extraktions-Kit	Probenzugabe
Herpes-simplex-Virus 1	Hautläsion	ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep	Gesamtnukleinsäure
Herpes-simplex-Virus 2	Hautläsion	ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep	Gesamtnukleinsäure
Humanes Immundefizienz-Virus 1	Plasma/Serum	MagMAX Microbiome UltraNucleic Acid Isolation Kit	DNA, RNA
Dengue-Virus	Serum	QIAmp Viral RNA Kit	RNA
Humanes respiratorisches Synzytial-Virus A	Nasopharyngeal-abstrich	QIAmp Viral RNA Kit	RNA
Influenza-A-Virus (H3N2)	Nasopharyngeal-abstrich	QIAmp Viral RNA Kit	RNA

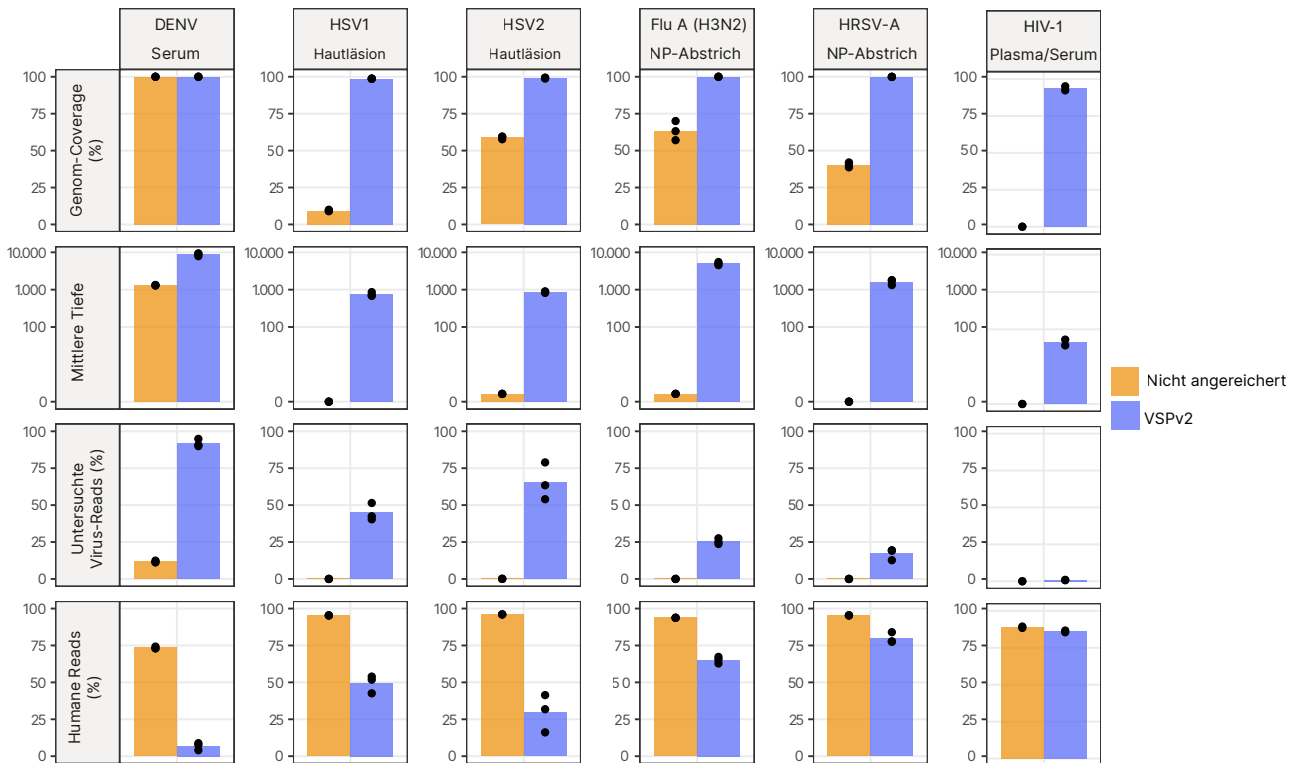


Abbildung 3: Performance des Viral Surveillance Panel v2 bei klinischen Restproben: Dargestellt werden die mit dem Viral Surveillance Panel v2 oder der Shotgun-Metagenomsequenzierung erzielte Genom-Coverage sowie die gezielten viralen Reads, die mediane Tiefe und der prozentuale Anteil an humanen Reads. Zwei oder drei Replikate aus sechs klinischen Proben wurden auf dem NextSeq 550 System mit High-output-Fließzellen sequenziert. Die Sequenzierungsdaten wurden auf insgesamt 1 Mio. Reads normalisiert. DENV, Dengue-Virus; HSV1, Herpes-simplex-Virus 1; HSV2, Herpes-simplex-Virus 2; Flu A, Influenza A; HRSV-A, Humanes respiratorisches Synzytial-Virus A; HIV-1, Humanes Immundefizienz-Virus 1; NP, Nasopharyngeal; VSPv2, Viral Surveillance Panel v2.

Abwasser-Surveillance

Die Abwasser-Surveillance in Bezug auf Virensequenzen bietet einen regionalen Indikator für die kommunale Ausbreitung viraler Pathogene und liefert Fachkräften des öffentlichen Gesundheitswesens wertvolle Informationen für die Planung entsprechender Maßnahmen.⁹ Das Viral Surveillance Panel ermöglicht bei Anwendung für diese Proben den frühzeitigen Nachweis sowie die entsprechende Bestimmung viraler Genome im Abwasser bei niedrigeren Konzentrationen als bei der Shotgun-Sequenzierung (Tabelle 4).

Bei diesem Vergleich wurde eine Sequenzierungstiefe von insgesamt 8 Mio. Reads verwendet, da die Komplexität von Abwasserproben stark variiert und die Proben Dutzende Viren mit geringer Häufigkeit enthalten können. Das Viral Surveillance Panel v2 zeigte im Vergleich zur Shotgun-Metagenomsequenzierung eine höhere Sensitivität bei der Virusdetektion in komplexen Umgebungsproben mit geringer Gesamtvirolast, selbst wenn die Gesamt-Reads für die Shotgun-Metagenomsequenzierung um das ca. 6-Fache erhöht wurden (Tabelle 4).

Abwasserproben wurden an zwei Standorten entnommen und in Zusammenarbeit mit dem Wisconsin State Lab of Hygiene (WSLH) und der Colorado State University (CSU) extrahiert. Es wurden drei Proben von jedem Entnahmeort untersucht. Aus diesen sechs Abwasserproben vorbereitete Bibliotheken wurden sequenziert und auf 8 Mio. Gesamt-Reads für die Anreicherung mit dem Viral Surveillance Panel v2 bzw. 8 Mio. und 25 Mio. Gesamt-Reads für die Shotgun-Metagenomsequenzierung normalisiert.

Tabelle 4: Wichtigste mit Viral Surveillance Panel oder Shotgun-Metagenomsequenzierung in Abwasser nachgewiesene Viren

Virus (Stamm)	8 Mio. Reads insgesamt				25 Mio. Reads insgesamt	
	Viral Surveillance Panel v2		Shotgun-Metagenomik		Shotgun-Metagenomik	
	Genom-Coverage (%)	Read-Anzahl	Genom-Coverage (%)	Read-Anzahl	Genom-Coverage (%)	Read-Anzahl
Sapovirus (GI.1)	99,7	219.539	50,0	57	84,2	360
Humanes Adenovirus F (humanes Adenovirus 41)	100	104.693	6,4	18	23,6	72
Humanes Coronavirus OC43 (HCoV_OC43)	98,1	23.857	0	0	10,0	26
Sapovirus (GV)	99,6	10.750	0	0	25,3	19
Humanes Adenovirus E	88,4	6.733	0	0	0	0
JC-Virus (JCPyV)	99,3	5.834	0	0	0	0
Mamastrovirus 9 (MAstV9)	99,2	4.959	0	0	0	0
Mamastrovirus 1 (MAstV1)	98,6	3.972	7,5	5	22,0	13
Humanes Adenovirus A (humanes Adenovirus 31)	81,1	3.449	0	0	0	0
Mamastrovirus 6 (MAstV6) [MLB1]	97,2	3.181	0	0	17,3	9
Norovirus (G1)	96,9	1.972	0	0	0	0
BK-Polyomavirus (BKPyV)	100	1.522	0	0	11,1	4
Mamastrovirus 8 (MAstV8) [VA2]	92,1	1.208	0	0	6,1	4
Humanes Papillomvirus 59 (HPV59; hohes Risiko)	69,3	1.015	0	0	0	0
Enterovirus A (nicht Coxsackie-Virus) [Enterovirus A71]	70,0	295	5,1	4	9,0	6

Zusammenfassung

Das Viral Surveillance Panel v2 gehört zu einem optimierten, umfassenden Workflow zur Erkennung von Virusausbrüchen, für die zoonotische Surveillance und die Verfolgung von Mutationen. Das Kit enthält Hybrid-Capture-Sonden zum Nachweis des Genoms von ca. 200 RNA- und DNA-Viren, die als hohe Risiken für die öffentliche Gesundheit eingestuft wurden. Die Hybrid-Capture-Target-Anreicherung minimiert durch die Konzentration auf die Target-Sequenzen die Notwendigkeit einer hohen Proben-Read-Tiefe, wodurch sich eine Kostensenkung bei gleichzeitiger Steigerung des Durchsatzes ergeben. Der rationalisierte Workflow ist für eine Reihe von Probentypen und Anwendungen geeignet, einschließlich der regionsspezifischen Bestimmung des Vorhandenseins von Viren durch Surveillance von klinischen Proben und Abwasser. Die mit dem Viral Surveillance Panel v2 generierten Daten lassen sich mit der anwenderfreundlichen DRAGEN Microbial Enrichment Plus App in BaseSpace Sequence Hub analysieren. Dieser robuste NGS-Workflow zeichnet sich durch eine hervorragende Performance beim Virennachweis durch die Bestimmung von DNA und RNA in komplexen Proben aus und stellt für Organisationen des öffentlichen Gesundheitswesens sowie für die Forschung eine fortschrittliche Alternative zur Shotgun-Sequenzierung dar.

Weitere Informationen

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[DRAGEN Microbial Enrichment Analysis Plus App](#)

[Sequenziersysteme von Illumina](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set A (96 samples)	20108081
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set B (96 samples)	20108082
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set C (96 samples)	20108083
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set D (96 samples)	20108084
Illumina Viral Surveillance Panel v2, Panel Only (96 samples)	20123403

Quellen

- Ling-Hu T, Rios-Guzman E, Lorenzo-Redondo R, Ozer EA, Hultquist JF. [Challenges and Opportunities for Global Genomic Surveillance Strategies in the COVID-19 Era](#). *Viruses*. 2022;14(11):2532. doi:10.3390/v14112532.
- World Health Organization. Pathogens prioritization: a scientific framework for epidemic and pandemic research preparedness. [who.int/publications/m/item/pathogens-prioritization-a-scientific-framework-for-epidemic-and-pandemic-research-preparedness](#). Veröffentlicht am 30. Juli 2024. Aufgerufen am 9. August 2024.
- World Health Organization. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. [who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts](#). Aufgerufen am 9. August 2024.
- Bloom DE, Cadarette D. [Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response](#). *Front Immunol*. 2019;10:549. doi:10.3389/fimmu.2019.00549.
- World Health Organization. Disease Outbreak News. [who.int/emergencies/disease-outbreak-news](#). Aktualisiert am 31. Juli 2024. Aufgerufen am 9. August 2024.

6. Africa Centers for Disease Control and Prevention. Diseases information. africacdc.org/disease/. Aufgerufen am 9. August 2024.
7. Archivdaten. Illumina, Inc. 2024.
8. Thakur S, Sasi S, Pillai SG, et al. [SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines](#). *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:815389. doi:10.3389/fmed.2022.815389
9. Diamond MB, Keshaviah A, Bento AI, et al. [Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses](#). *Nat Med*. 2022;28(10):1992-1995. doi:10.1038/s41591-022-01940-x.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2024 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-02882 DEU v1.0