

illumina Microbial Amplicon Prep— Influenza A/B

Solución optimizada de
preparación de librerías para la
investigación del virus de la gripe
y la vigilancia de la salud pública

- Permite una cobertura rápida, sin sesgos y del genoma completo de las cepas del virus de la gripe A y B
- Admite aportes de ARN de una serie de tipos de muestras y concentraciones víricas
- Simplifica el análisis del genoma completo y la interpretación de las variantes



Introducción

Las cepas del virus de la gripe A y B pueden provocar brotes estacionales de enfermedades respiratorias, pandémicas y zoonóticas, lo que supone una amenaza mundial para la salud humana y animal. La pandemia de la COVID-19 demostró la utilidad de la vigilancia genómica de patógenos basada en la secuenciación de nueva generación (NGS, Next-Generation Sequencing), lo que permitió a los investigadores realizar un seguimiento de las variantes emergentes y guiar la respuesta de salud pública. Se han aplicado enfoques similares basados en amplicones para secuenciar y caracterizar los virus de la gripe.^{1,2} Sin embargo, los virus de la gripe presentan una alta variabilidad genómica, lo que hace que sea difícil secuenciarlos con precisión. Además, muchos protocolos de secuenciación disponibles no están optimizados y pueden producir resultados de secuenciación variables.

El kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B se basa en el ensayo demostrado Illumina COVIDSeq™ Assay y permite una secuenciación y caracterización precisa, rápida y sin sesgos de los virus de la gripe. La integración de la aplicación DRAGEN™ Targeted Microbial fácil de usar simplifica el análisis de datos, lo que hace que la identificación de variantes y el subtipado de virus sea accesible para laboratorios sin experiencia bioinformática. Como parte de un flujo de trabajo integrado y flexible (Figura 1), el kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B permite a los investigadores ampliar sus esfuerzos de vigilancia genómica para proteger la salud de sus comunidades.

Flujo de trabajo optimizado

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B es una solución de preparación de librerías basada en RT-PCR altamente multiplexada para la secuenciación y caracterización rápidas y sin sesgos de virus de la gripe (Tabla 1). Este kit, basado en el sólido flujo de trabajo de Illumina COVIDSeq Assay, incluye pasos para el aislamiento del material genético mediante secuenciación y análisis de datos para la detección y caracterización de cepas de virus de la gripe (Figura 1).

Preparación de librerías

El kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B incluye los reactivos necesarios para la retrotranscripción del ARN, la amplificación PCR, los transposomas unidos a bolas para la tagmentación de amplicones y los adaptadores indexados para generar librerías de secuenciación a partir de amplicones del genoma completo (Figura 2). El kit es compatible con el ARN extraído utilizando kits comerciales.

Tabla 1: Tiempo de procesamiento y tiempo de participación activa totales

N.º de muestras	Tiempo de procesamiento	Tiempo de participación activa
8 muestras	8 horas	1,9 horas
48 muestras	9,3 horas	3,2 horas



Figura 1: Flujo de trabajo de Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B: en un flujo de trabajo optimizado, las librerías del virus de la gripe se preparan con el kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B, se secuencian en cualquier sistema de secuenciación de sobremesa de Illumina y se analizan en la aplicación DRAGEN Targeted Microbial para la detección, la llamada de variantes y el tipado de estirpes. *El kit proporciona todos los reactivos necesarios para la preparación de librerías, incluida la mezcla de cebadores universales para el virus de la gripe A/B, reactivos para la RT-PCR e índices dobles únicos. No se incluyen los reactivos de extracción de ARN.

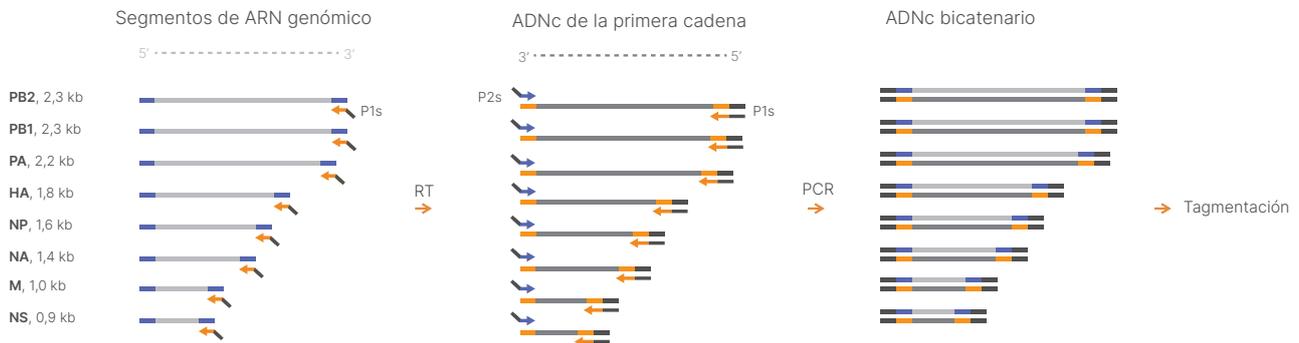


Figura 2: Enfoque de RT-PCR del genoma completo universal del virus de la gripe A/B para generar amplicones listos para la secuenciación: la mezcla de cebadores para la gripe A/B contiene 16 cebadores diseñados para hibridarse a los extremos 3' de la primera y la segunda cadena de ADN complementario (ADNc), lo que permite tanto la síntesis de ADNc de longitud completa de cada segmento de ARN genómico como la posterior amplificación PCR para producir amplicones completos listos para la tagmentación y la preparación de las librerías. Las líneas de color naranja representan las regiones no codificantes conservadas del segmento de ARN genómico. Las líneas negras representan las secuencias de ADN adicionales añadidas por los cebadores universales.

Secuenciación

Las librerías preparadas se pueden secuenciar en cualquier sistema de secuenciación de Illumina. Sin embargo, la configuración de 48 muestras de Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B hace que sea ideal para plataformas de sobremesa, como iSeq™ 100 System, MiniSeq™ System, MiSeq™ System, NextSeq™ 500 System, NextSeq 550 System, NextSeq 1000 System y NextSeq 2000 System.

Análisis de datos

La aplicación DRAGEN Targeted Microbial de Illumina está disponible de forma gratuita en BaseSpace™ Sequence Hub. La aplicación fácil de usar alinea las lecturas con los genomas de referencia, realiza la llamada de variantes y genera una secuencia de genoma consenso que representa la población de especies de ácido nucleico en la muestra (Figura 3). Cuando están disponibles, se accede a bases de datos seleccionadas externas para realizar análisis de linaje adicionales.

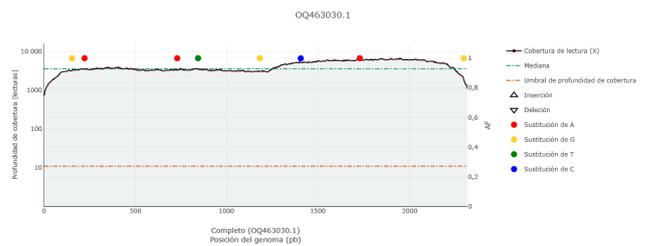


Figura 3: Gráfico de cobertura del virus de la gripe A generado con la aplicación DRAGEN Targeted Microbial: los resultados del gráfico de cobertura de la aplicación DRAGEN Targeted Microbial son interactivos, con la capacidad de alternar entre escala logarítmica, incluir o excluir las líneas de la mediana de cobertura o la información de sustitución/delección. En el caso de los virus segmentados, como los virus de la gripe A y B, cada segmento se muestra en un gráfico de cobertura independiente. Cada círculo representa un SNP que varía con respecto al genoma de referencia. Cada color indica si se trata de una sustitución de A, G, T o C. También se indican las inserciones y delecciones mediante triángulos. Los gráficos interactivos se pueden descargar como archivos PNG, como aquí se muestra.

Excelente cobertura en los genomas del virus de la gripe A/B

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B está diseñado para proporcionar una amplia cobertura de secuencias en los genomas del virus de la gripe A y B. Este kit incluye una mezcla de 16 cebadores universales establecidos y ampliamente probados^{3,4} que proporcionan una cobertura superior al 98 % para las cepas del virus de la gripe A y B, incluidos los genes altamente variables de neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) (Figura 4, Figura 5).⁵

El kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B flexible es compatible con muestras de ARN aisladas utilizando protocolos de extracción estándar sin necesidad de realizar modificaciones. Las muestras de investigación clínica, incluidos los hisopos nasales, pueden variar en cuanto a su calidad y concentración vírica. El kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B mantiene un rendimiento excelente en todos los aislados de virus con valores de Ct que oscilan entre 21,2 y 31,1 (es decir, títulos de virus de altos a bajos). Para obtener resultados óptimos, se recomiendan muestras con valores de Ct inferiores a 30.

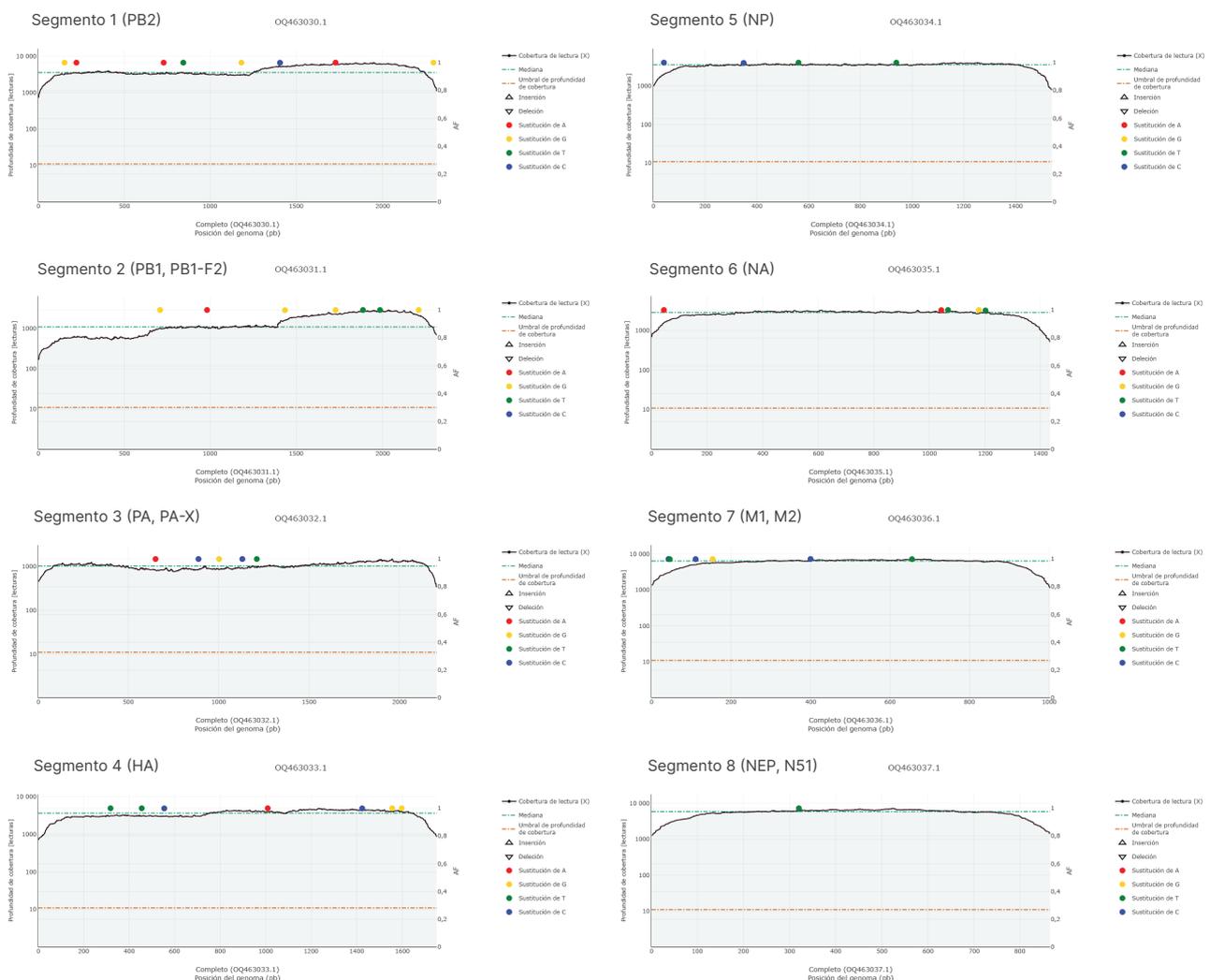


Figura 4: Gráficos de cobertura genómica para muestras del virus de la gripe A: gráficos de cobertura representativa de una muestra del virus H1N1 (valor de Ct = 21,2, aproximadamente 482 copias de ARN vírico) de hisopos nasofaríngeos que muestran la cobertura del genoma completo en los ocho segmentos del virus de la gripe A. Cada gráfico representa la cobertura de cada segmento del genoma del virus de la gripe A. En cada gráfico, se proporcionan los ID de acceso del genoma de referencia. Las líneas de puntos representan la mediana de profundidad de cobertura. Para el análisis de los datos se utilizó 1 millón de lecturas «paired-end» (2 × 149 pb). Los datos se analizaron con la aplicación DRAGEN Targeted Microbial.

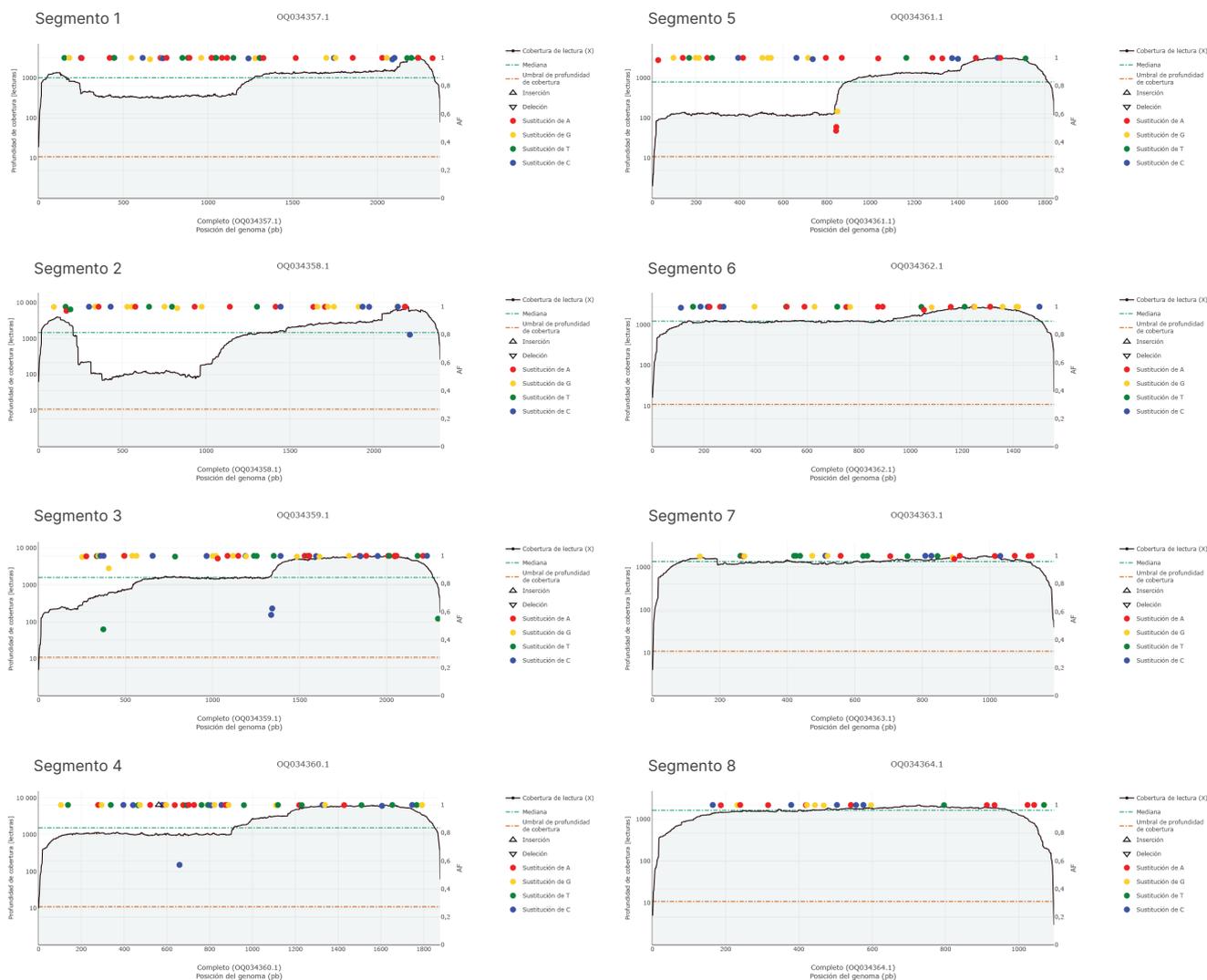


Figura 5: Gráficos de cobertura genómica para muestras del virus de la gripe B: gráficos de cobertura representativa de una muestra del virus de la gripe B (ATCC VR-1735, valor de Ct = 22,1, aproximadamente 85 000 copias de ARN vírico) que muestran la cobertura del genoma completo en los ocho segmentos del virus de la gripe B. Cada gráfico representa la cobertura de cada segmento del genoma del virus de la gripe B. En cada gráfico, se proporcionan los ID de acceso del genoma de referencia. Las líneas de puntos representan la mediana de profundidad de cobertura. Para el análisis de los datos se utilizó 1 millón de lecturas «paired-end» (2 × 149 pb). Los datos se analizaron con la aplicación DRAGEN Targeted Microbial.

Resumen

El kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B permite a los investigadores de la salud pública proteger la salud de sus comunidades, proporcionando una solución optimizada para la caracterización y vigilancia del virus de la gripe. Este ensayo flexible es compatible con aportes de ARN extraídos de cultivos o hisopos y lavados nasales con concentraciones víricas variables. La integración con plataformas de NGS innovadoras ofrece una calidad de datos, flexibilidad y escalabilidad excepcionales para una vigilancia de la salud pública altamente eficaz y una investigación del virus de la gripe de alto impacto.

Información adicional

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

[Genómica microbiana](#)

Datos para realizar pedidos

Producto	N.º de catálogo
Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B (48 samples)	20106305

Bibliografía

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. Fecha de publicación: 28 de marzo de 2023. Fecha de consulta: 21 de junio de 2023.



1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | Tel.: +1 858 202 4566
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-01898 ESP v1.0