

Viral Surveillance Panel

Sequenziamento dell'intero genoma ottimizzato per virus ad alto impatto utilizzando arricchimento mediante ibridazione-cattura

- Copertura di 66 virus identificati come ad alto rischio per la salute pubblica
- Arricchimento mirato per i patogeni dell'RNA e del DNA virali
- Compatibile con un'ampia gamma di tipi di host e campioni ambientali

illumina[®]

Monitoraggio delle minacce virali per la salute pubblica

L'epidemia di SARS-CoV-2 del 2019 e l'epidemia di virus del vaiolo delle scimmie del 2022 hanno dimostrato che è cruciale disporre di un sistema di allarme e di strumenti rapidi per monitorare e valutare le epidemie. Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) fornisce un approccio efficace per lo screening dei campioni e per il rilevamento dei virus senza disporre di una conoscenza pregressa degli agenti infettivi. La tecnologia NGS fornisce informazioni dettagliate che consentono di eseguire importanti applicazioni di caratterizzazione e monitoraggio, inclusi:

- Sequenziamento reflex di campioni positivi noti durante le epidemie;
- Monitoraggio delle fonti di infezione e delle vie di trasmissione;
- Monitoraggio dell'evoluzione virale e della resistenza antivirale.

Il Viral Surveillance Panel consente alla tecnologia NGS di rilevare 66 genomi virali, inclusi i virus identificati dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) come importanti rischi per la salute pubblica ([Tabella 1](#)).¹ Il pannello utilizza un flusso di lavoro di arricchimento dei target mediante ibridazione-cattura che consente di sequenziare diversi tipi di campioni senza dover utilizzare grandi profondità di lettura del campione come richiesto dal sequenziamento metagenomico Shotgun. Rispetto ad altri metodi di risequenziamento mirato, come il sequenziamento degli ampliconi, il metodo mediante ibridazione-cattura fornisce anche una maggiore copertura uniforme sui genomi, pannelli di sonde sostanzialmente più grandi e una maggiore capacità di identificazione delle mutazioni e delle relative sequenze che rendono il Viral Surveillance Panel ideale per la sorveglianza delle epidemie.

Flusso di lavoro NGS completo e integrato

Il flusso di lavoro di Viral Surveillance Panel arricchisce i genomi virali a partire da una gamma di campioni host e ambientali, incluse le acque reflue.² La procedura di preparazione delle librerie per il sequenziamento può essere completata in due giorni sui sistemi di sequenziamento da banco ([Figura 1](#)).

Tabella 1: Inclusi nel Viral Surveillance Panel.¹

Adenovirus	Virus dell'epatite B	Parechovirus
Aichivirus	Virus dell'epatite C	Parvovirus
Astrovirus	Virus dell'epatite E	Poliovirus
Coronavirus-229E	Virus dell'influenza A	Rhinovirus
Coronavirus-HKU1	Virus dell'influenza B	Virus della febbre della Valle del Rift
Coronavirus-OC43	Virus dell'encefalite giapponese	Rotavirus
Coronavirus-NL63	Virus Junin	Virus della rosolia
Enterovirus	Virus Nipah	Virus dell'encefalite equina venezuelana
Hantavirus	Virus della febbre emorragica di Omsk	Virus dell'encefalite equina occidentale
Henipavirus Hendra	Papillomavirus umano oncologico	Virus della febbre gialla
Virus Chapare	Virus dell'immunodeficienza umana 1	Polyomavirus
Virus Chikungunya	Virus dell'immunodeficienza umana 2	Virus respiratorio sinciziale
Virus Coxsackie	Virus della malattia della foresta Kyasanur	Virus Sabia
Virus della febbre emorragica Crimea-Congo	Virus della febbre di Lassa	Salivirus
Virus dell'encefalite equina orientale	Metapneumovirus	Virus Torque Teno
Virus dell'epatite A	Virus parainfluenzale	Virus Zika
Virus Dengue 1	Virus della febbre emorragica di Lujo	Sapovirus
Virus Dengue 2	Virus Machupo	SARS-COV
Virus Dengue 3	Virus di Marburg	SARS-COV-2
Virus Dengue 4	MERS-CoV	Virus dell'encefalite trasmessa da zecche
Virus Ebola	Virus del vaiolo delle scimmie	Virus Variola
Virus Guanarito	Norovirus	Virus West Nile

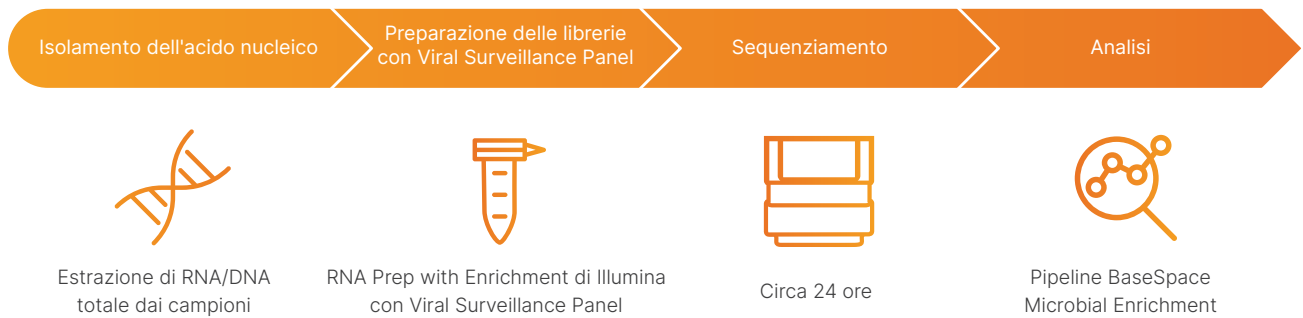


Figura 1: Flusso di lavoro di Viral Surveillance Panel: grazie a un flusso di lavoro completo e ottimizzato, le librerie vengono preparate a partire da campioni host o ambientali, sequenziate su un qualsiasi sistema di sequenziamento Illumina e analizzate nella pipeline BaseSpace Microbial Enrichment per il rilevamento virale, la generazione di letture consenso sull'intero genoma, la mappatura delle letture sulle migliori identificazioni virali e la tipizzazione dei ceppi. La durata del sequenziamento varia in base alla profondità di lettura del campione e dal sistema di sequenziamento utilizzato.

Preparazione delle librerie

Il Viral Surveillance Panel si attiene allo stesso protocollo di preparazione delle librerie del [Respiratory Virus Oligo Panel](#) di Illumina.³ L'RNA Prep with Enrichment di Illumina utilizza la tagmentazione su microsferi seguita da una singola fase di ibridazione per fornire un rapido flusso di lavoro e generare librerie arricchite. L'RNA Prep with Enrichment di Illumina fornisce:

- Un rapido flusso di lavoro compatibile con l'automazione che può essere completato in circa due giorni con interventi manuali minimi;
- Input flessibile di campione da 10 ng a 100 ng di acido nucleico totale;
- Processività scalabile che supporta il multiplex fino a 384 campioni in una singola corsa.

Sequenziamento

Le librerie VSP arricchite richiedono una profondità di lettura inferiore e possono essere sequenziate su più sistemi, inclusi i sistemi da banco MiniSeq™, MiSeq™ e NextSeq™ 550, NextSeq 1000 e NextSeq 2000. La titolazione virale, la qualità del campione di acido nucleico, la profondità di lettura del campione e il numero di letture per campione influiscono sul numero di letture specifico per il virus e sulla copertura della sequenza ottenuta. Per ottenere una buona qualità dei campioni si raccomanda una profondità di lettura complessiva del sequenziamento di un minimo di 2 milioni di letture paired-end per campione con una lunghezza di lettura di 149 bp. Anche la profondità di lettura del campione raccomandata varia in base al tipo di campione. Per campioni più complessi, come le acque reflue, si raccomanda un minimo di 4 milioni di letture paired-end per campione.

Analisi dei dati

Il Viral Surveillance Panel è compatibile con la pipeline di analisi secondaria Microbial Enrichment disponibile su [BaseSpace™ Sequence Hub](#). La pipeline Microbial Enrichment fornisce assemblaggio di contig, sequenze consenso e copertura del genoma per i genomi virali disponibili sul pannello.

Prestazioni

Arricchimento dei target

L'arricchimento dei target mediante ibridazione-cattura per il Viral Surveillance Panel viene eseguito con l'RNA Prep with Enrichment Kit di Illumina. Rispetto al sequenziamento metagenomico Shotgun, in cui viene sequenziato tutto l'RNA/DNA, l'ibridazione-cattura dei target riduce l'inutile sequenziamento di microrganismi host e non target, riduce i costi e consente l'ampio sequenziamento dei genomi virali sui sistemi di sequenziamento da banco ([Figura 2](#)).

Il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) analizza più virus contemporaneamente e consente la sorveglianza virale e l'analisi dell'evoluzione virale. Le sonde di arricchimento dei target di Viral Surveillance Panel fornisce la copertura uniforme di interi genomi virali ([Figura 3](#)). Inoltre, le sonde oligonucleotidiche utilizzate per i protocolli di ibridazione-cattura sono efficaci anche nelle regioni mutate e consentono la cattura di virus dalla rapida evoluzione, come i virus a RNA.

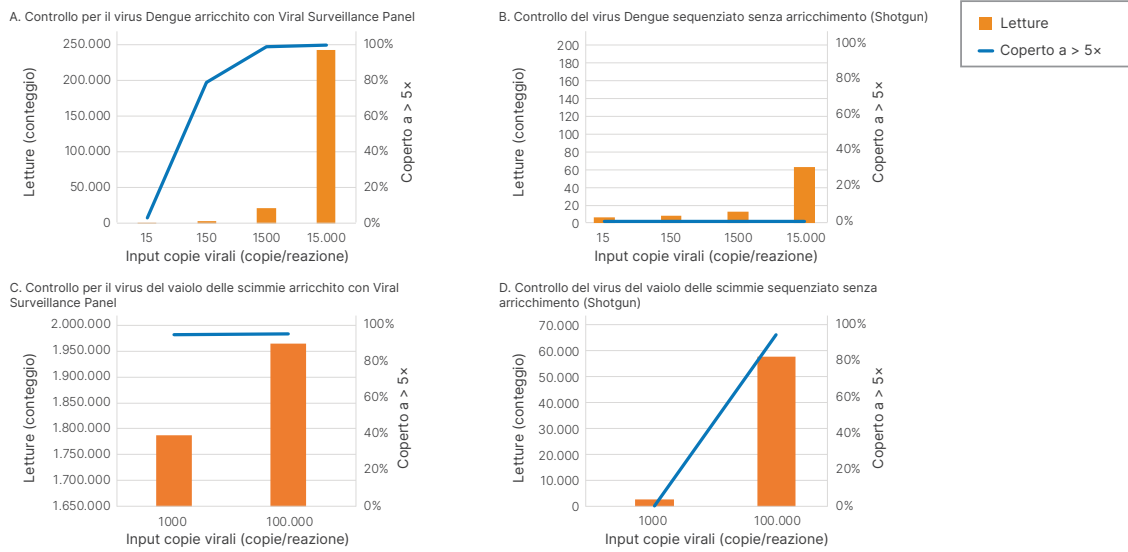


Figura 2: Conteggi delle letture e copertura genomica virale ottenuti con il Viral Surveillance Panel: prestazioni del Viral Surveillance Panel e del sequenziamento senza arricchimento rispetto ai controlli virali disponibili in commercio. (A) Controllo del virus Dengue mescolato in 10 ng di RNA di origine umana e arricchito con il Viral Surveillance Panel; (B) controllo del virus Dengue mescolato in 10 ng di RNA di origine umana e sequenziato senza arricchimento; (C) controllo del virus del vaiolo delle scimmie mescolato in 10 ng di RNA di origine umana e 10 ng di DNA di origine umana e arricchiti con il Viral Surveillance Panel; (D) controllo del vaiolo delle scimmie sequenziato senza arricchimento e mescolato in 10 ng di RNA di origine umana e 10 ng di DNA di origine umana e sequenziato senza arricchimento. I campioni sono stati sequenziati e i dati sono stati normalizzati su 2 milioni di letture paired-end a 2 × 149 bp.

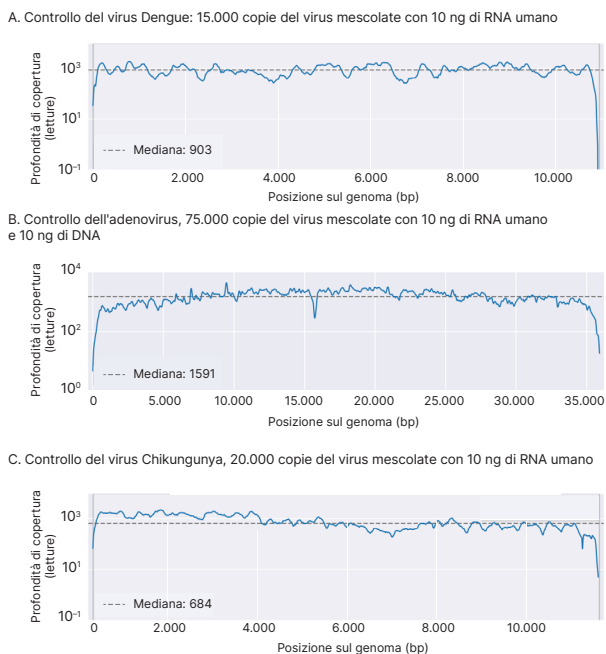


Figura 3: Genoma virale uniforme a seguito dell'arricchimento con il Viral Surveillance Panel: i controlli dei virus sono stati preparati mescolando i controlli dei virus a numero di copie noto con una miscela di 10 ng di RNA/DNA umano. Le librerie sono state preparate e sequenziate dopo il flusso di lavoro Viral Surveillance Panel.

Sorveglianza delle acque reflue

La sorveglianza delle sequenze virali nelle acque reflue fornisce un indicatore regionale della diffusione dei patogeni virali sul territorio e offre ai professionisti nel campo della salute pubblica informazioni preziose nella pianificazione degli interventi da eseguire. Il Viral Surveillance Panel può essere utilizzato con questi campioni per consentire il rilevamento precoce e l'identificazione dei genomi virali nelle acque reflue a basse concentrazioni rispetto al sequenziamento Shotgun (Tabella 2).

Riepilogo

Il Viral Surveillance Panel fornisce un flusso di lavoro completo e ottimizzato per il rilevamento e il monitoraggio delle epidemie virali. Include sonde di ibridazione-cattura per 66 genomi virali a RNA e DNA intero identificati come a rischio elevato per la salute pubblica.¹ L'arricchimento dei target mediante ibridazione-cattura riduce la necessità di utilizzare una più alta profondità di lettura del campione e consente di concentrarsi sulle sequenze target. Questo riduce i costi e aumenta la processività. Il flusso di lavoro è inoltre compatibile con un'ampia gamma di tipi di

Tabella 2: Virus rilevati nelle acque reflue utilizzando il Viral Surveillance Panel o il sequenziamento Shotgun.^a

	Viral Surveillance Panel	Sequenziamento Shotgun	Viral Surveillance Panel	Sequenziamento Shotgun
Virus identificati	Genoma coperto a $\geq 5\times$ (%)		Lecture (conteggio)	
Astrovirus	98,9	0	122.525	7
Polyomavirus JC	98,9	0	29.749	0
Polyomavirus BK	97,8	0	29.318	5
hCoV-OC43	87,3	0	23.352	8
Aichivirus A	95,1	0	16.919	4
Norovirus GII	90,0	0	7.873	0
Virus Coxsackie A19	65,2	0	7.195	0
Norovirus GII.P7_GII.6	69,7	0	2.572	0
Virus di Norwalk	57,3	0	1.191	0
Ceppo Norovirus GI	51,2	0	859	0

a. I ricercatori hanno raccolto i campioni presso la Colorado State University e gli acidi nucleici totali purificati sono stati inviati ad Illumina per l'analisi. Le librerie sono state preparate e sequenziate utilizzando 100 ng di acidi nucleici totali.

campioni e applicazioni, inclusa la sorveglianza delle acque reflue per individuare la presenza di virus sul territorio. Infine, il Viral Surveillance Panel è compatibile con la pipeline di analisi Microbial Enrichment gratuita e disponibile su BaseSpace Sequence Hub. Questo flusso di lavoro NGS fornisce alle organizzazioni che si occupano di salute pubblica e ai ricercatori un'alternativa avanzata rispetto al costoso e complicato sequenziamento Shotgun.

Maggiori informazioni

Viral Surveillance Panel, illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/viral-surveillance-panel.html.

RNA Prep with Enrichment di Illumina, illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html.

Applicazioni di BaseSpace, illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps.html.

Piattaforme di sequenziamento Illumina, illumina.com/systems/sequencing-platforms.html.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Viral Surveillance Panel (96 samples)	20088154
Viral Surveillance Panel with Illumina RNA Prep with Enrichment Indexes Set A (96 samples)	20087932
Viral Surveillance Panel with Illumina RNA Prep with Enrichment Indexes Set B (96 samples)	20087929

Bibliografia

1. Bloom DE, Cadarette D. [Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response](#). *Front Immunol*. 2019;10:549. Pubblicato il 28 marzo 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.00549
2. McClary-Gutierrez JS, Aanderud ZT, Al-Faliti M, et al. [Standardizing data reporting in the research community to enhance the utility of open data for SARS-CoV-2 wastewater surveillance](#). *Environ Sci (Camb)*. 2021;9:10.1039/d1ew00235j. doi:10.1039/d1ew00235j
3. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation: Reference guide. support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/RNA/illumina-rna-prep-reference-guide-1000000124435-03.pdf. Pubblicato nel 2021. Consultato il 13 settembre 2022.

illumina[®]

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitate la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01240 ITA v1.0