

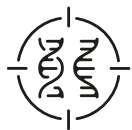


通过废水监测追踪新发传染病

使用MiSeq™ i100系列测序仪广泛检测病原体



全面的工作流程涵盖文库制备、靶向富集、测序和数据分析



准确检测和表征多种RNA和DNA病毒病原体



快速、灵活的测序可在当天提供结果，实现高效的废水监测

简介

当今世界，传染病构成的威胁正在以惊人的速度增长。全球化和国际旅行促进了传染性病原体的跨境快速传播¹。此外，城市化水平的提高和人口密度的增加为传染性病原体的传播创造了理想条件。此外，抗药性细菌和病毒株的出现也给治疗和控制感染带来了巨大挑战²。

废水监测是一种检测、识别、追踪和表征潜在病原体以评估人群健康状况的方法³。该方法提供数据帮助监测疫情，可作为社区层面传染病威胁的早期预警，SARS-CoV-2的基因组监测证明了这一点⁴。通过准确定位威胁所在，社区可以在公共卫生事件应对中更合理地调配资源。基于PCR的方法可以快速且相对低成本地了解预期病原体存在与否，但它们在监测和检测方面的性能取决于对微生物序列变异性和变异决定性突变的既存知识。新一代测序（NGS）工作流程的时间和成本相对更

高，但所检测的突变范围更广，能够发现变异并提供除病原体定性检测之外的详细基因组信息⁵⁻⁷。

准确、全面地检测废水中的病毒病原体，既取决于通过过滤或富集技术对病毒基因组进行前期富集，也取决于NGS文库制备富集方法，以克服研究相对较小的病毒基因组时所固有的分析挑战，其中丰度最高的病毒仅占废水中总基因组材料的一小部分⁸⁻¹⁰。通过增加文库中目标基因组内容的相对丰度，富集方法还解锁了在桌面式仪器上进行测序的可能性。

本应用说明介绍了如何使用NGS工作流程检测和表征真实废水样本中的病毒病原体，该工作流程集成了Illumina Viral Surveillance Panel v2、MiSeq™ i100系列和机载DRAGEN™ 二级分析（图1）。MiSeq™ i100 Plus测序仪可在当天提供有效的废水监测结果，实现快速的公共卫生响应。

图1：用于废水监测的全面NGS工作流程



方法

样本

原废水样本来源于美国的两个站点，分别由威斯康星州卫生实验室（WSLH）从污水处理厂收集（n=12），科罗拉多州立大学（CSU）从学生宿舍收集（n=12）。从2022年11月4日至2022年12月16日，在多个时间点从每个站点采集样本。WSLH使用Nanotrap Microbiome A Particles（Ceres Nanosciences, Inc., 货号44202）捕获并浓缩病毒，制备10-50 mL样本废水。Wizard Enviro Total Nucleic Acid Kit（Promega Corporation, 货号A2991）用于提取核酸。CSU的样本制备过程包括在约2000×g下离心去除固体，再使用CP Select浓缩移液器（InnovaPrep, Inc.）捕获和浓缩病毒。使用QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN, 货号52904）。

文库制备

使用Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set A（96样本）（因美纳，货号20108081），以最大体积为8.5 μL（≥100 ng提取的总核酸（TNA））的起始量制备用于测序的文库。将文库混合为4个池，每个池包含6个文库（6重），测序上样浓度为80 pM。

测序

在MiSeq™ i100 Plus测序仪上使用25M流动槽对制备的文库进行测序，运行配置为2×150 bp。对于更大规模的研究，测序运行可扩展至NextSeq™ 1000、NextSeq™ 2000、NovaSeq™ 6000和NovaSeq™ X。

数据分析

测序完成后，使用FASTQ Toolkit App将数据下采样至每个样本1M和4M簇/片段。利用MiSeq™ i100 Plus测序仪内置的DRAGEN Microbial Enrichment Plus（DME+）应用程序分析下采样和非下采样的数据。该应用程序也可以通过BaseSpace™ Sequence Hub在云端访问。

结果

测序指标

在MiSeq™ i100 Plus测序仪上对4个废水池进行了4次运行测序。所有4次运行得到的平均Q30%均大于90%，通过过滤的读段数百分比（PF）约为80%，表明读段质量高且仪器上样浓度一致。获得的双端（PE）读段总数超过流动槽的50M规格。在所有4次运行中，仪器运行时间和机载分析时间总共不到8小时（表1）。这表明MiSeq™ i100 Plus测序仪提供了必要的速度和效率，能够及时提供对公共卫生监测和响应至关重要的结果。

表1: MiSeq™ i100系列测序仪的测序指标

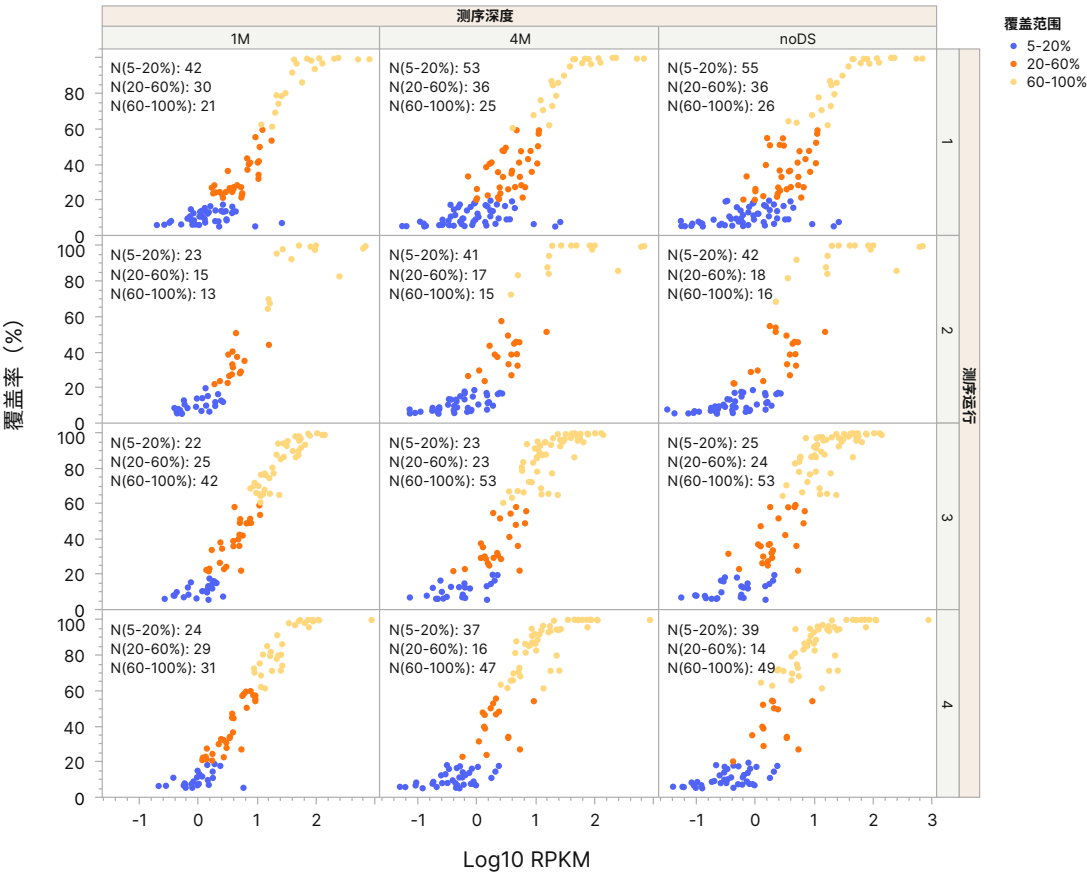
MiSeq™ i100 Plus运行	平均Q30%	PF%	双端读段总数	双端读段PF总数	运行时间	机载分析时间
运行1（CSU）	93.65%	78.49%	79,073,280	62,064,116	7小时11分钟	18分钟
运行2（CSU）	93.35%	78.06%	79,073,280	61,723,176	7小时12分钟	17分钟
运行3（WSLH）	94.57%	81.62%	79,073,280	64,539,830	7小时12分钟	19分钟
运行4（WSLH）	94.38%	81.43%	79,073,280	64,389,944	7小时12分钟	19分钟

病毒基因组检测

为了帮助建立和比较有效病原体检测所需的测序深度，我们在不同深度下模拟了读段数分析。此外，由于检测到的病毒基因组长度差异很大，因此需要数据归一化才能准确定量。因此，绘制了4个废水样本文库池的基因组覆盖率与log10 RPKM（每百万片段中每千碱基读段数）读段数的关系图，并在3种测序深度下模拟：下采样至1M片段、下采样至4M片段和全深度（未下采样或每个样本约5M片段）。RPKM是NGS数据归一化的常用方法，它结合了覆盖深度和目标区域

的长度。这样可以更准确地比较不同病原体，以及同一病原体随时间变化的情况。检测到的病毒覆盖率可分为三个常规范围：检测（5%-20%）、监测（20%-60%）和全基因组覆盖（60%-100%）（图2）。最低范围内的病毒病原体能得到可靠检测，但缺乏足够的覆盖度来追踪病毒进化或准确的变异信息。中等范围的病毒基因组覆盖率足以进行有效的分子表征，并研究病毒浓度随时间的变化。在最高范围内检测到的基因组能够通过变异测定进行表征。读取深度越大，病毒基因组总数越高，但稳定在大约4M簇/片段（8M PE读段数）（图2和表2）。

图2： 废水样本中检测到的病毒病原体的不同基因组覆盖率



在4次MiSeq™ i100 Plus测序运行中，以基因组覆盖率与log10 RPKM作图。数据已下采样至4M和1M读段数，或未进行下采样。基因组覆盖率分为三个范围：检测范围（5%-20%）、监测范围（20%-60%）和全基因组覆盖范围（60%-100%）。N表示在每个范围内检测到的病毒基因组数量。即使在每个文库1M读段的模拟深度下，在4次运行中，每次运行中均有≥22%检出病毒靶标的覆盖率≥60%。

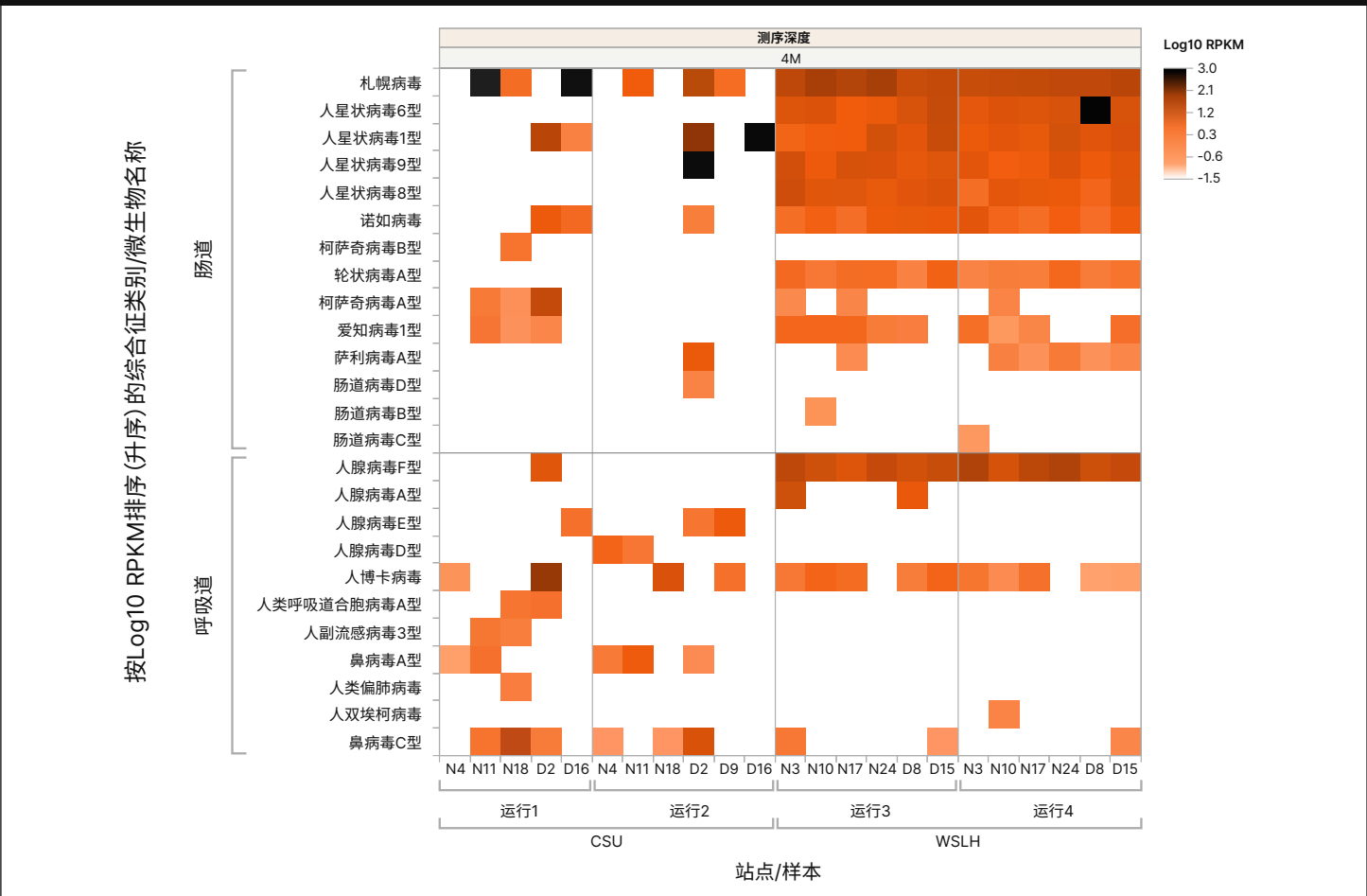
表2： 站点检测到的病毒基因组总数

站点	基因组覆盖度	测序深度		
		1M读段数	4M读段数	全深度
CSU	5-20%	65	94	97
	20-60%	45	53	54
	60-100%	34	40	92
WSLH	5-20%	46	60	64
	20-60%	54	39	38
	60-100%	73	100	102

病毒基因组的表征

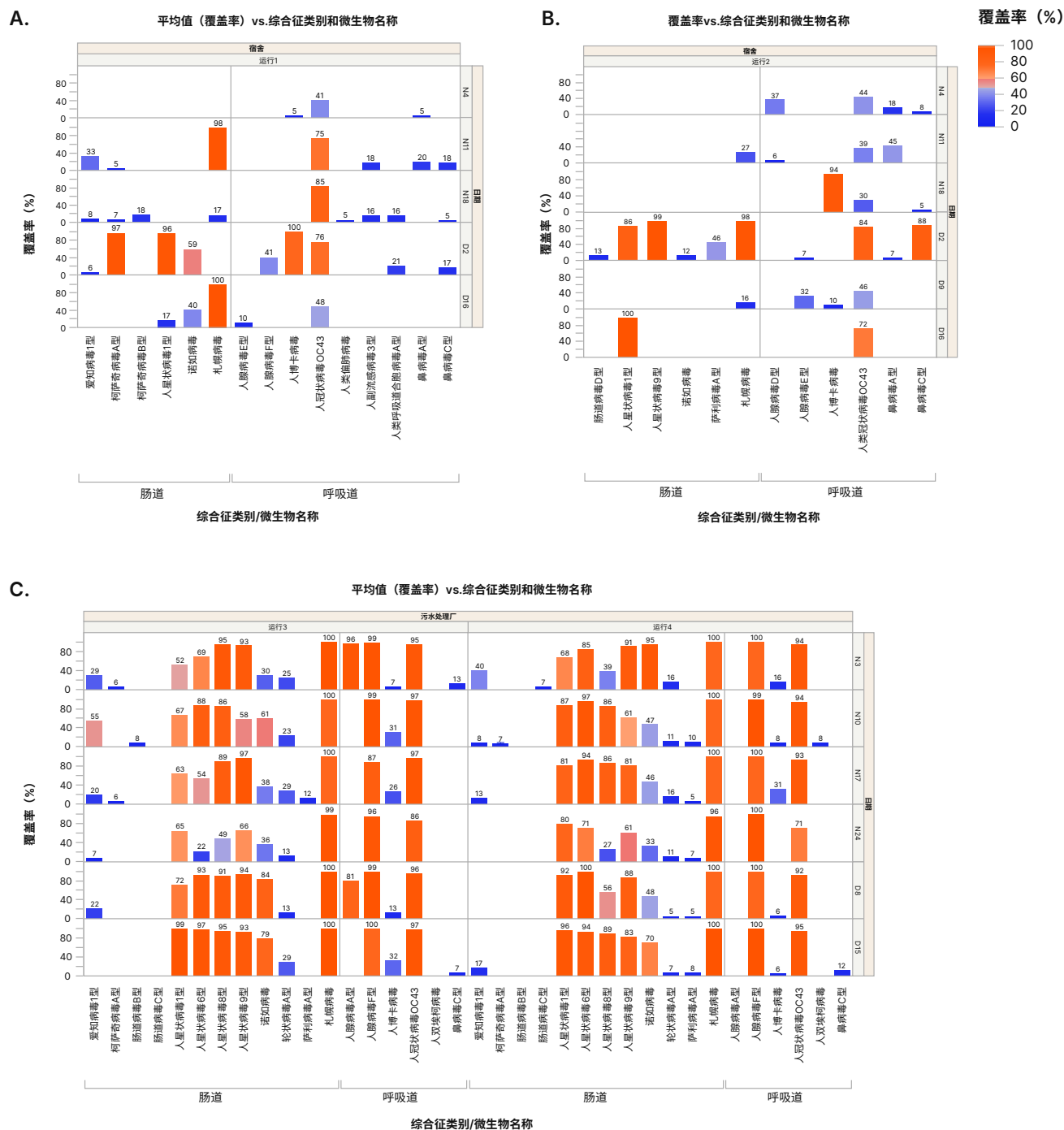
作为纵向研究的一部分，将检测到的病毒基因组绘制成热图，并以log10 RPKM值升序排列，热图以相对丰度（图3）和基因组覆盖率（图4）为衡量指标，显示了不同采集站点和随时间变化的肠道和呼吸道病毒的不同检测水平。绘制基因组覆盖率随时间变化的曲线显示，在12月时间点，肠道病毒的水平升高，包括柯萨奇病毒A/B型、诺如病毒、哺乳动物星状病毒（人类星状病毒）和萨利病毒（图4），与先前的报告一致——检测到人类粪便中存在这些病毒和其他致病性病毒，且丰度较高¹¹。

图3： 废水样本中病毒丰度的热图



从CSU和WSLH样本中检测到的病毒基因组按Log10 RPKM值升序排列。此热图显示了与肠道和呼吸道类别相对应的病毒。WSLH样本（N=145）的病毒基因组检出率高于CSU样本（N=63）。由于宿舍废水样本涉及的人数相对较少，因此与处理厂的样本相比，检测到的病原体较少。每个采集站点上方标明了11月（N）和12月（D）的采集日期。

图4: 检出病毒病原体随时间的变化



作为纵向研究的一部分，对病毒病原体水平的监测显示了从 (A) 两个采样点、(B) CSU 和 (C) WSLH 收集的样本中肠道和呼吸道病毒的变化。根据肠道和综合征类别的病毒绘制基因组覆盖率随时间的变化图（日期见图右侧）。

同样，呼吸道病毒博卡病毒和鼻病毒A/C型在12月采集的样本中显示水平升高（图4）。这些数据与初冬呼吸道病原体传播存在季节性升高的历史观察结果相吻合，而感恩节假期的人员流动可能加剧了这一趋势¹²。

总结

MiSeq™ i100系列作为快速、全面的NGS工作流程的组成部分，能够通过广泛的病毒病原体检测实现有效的废水监测，从而支持公共卫生防控工作。

了解更多 →

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[MiSeq™ i100系列测序仪](#)

[DRAGEN二级分析](#)

参考文献

1. CDC. Disease Patterns in Travelers. [cdc.gov/travel/yellowbook/2024/introduction/disease-patterns-in-travelers](https://www.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/introduction/disease-patterns-in-travelers). Updated May 1, 2023. Accessed February 5, 2025.
2. Reyes R, Ahn R, Thurber K, Burke TF. [Urbanization and Infectious Diseases: General Principles, Historical Perspectives, and Contemporary Challenges](#). *Challenges in Infectious Diseases*. 2012;123-146. Published 2012 May 19. doi:10.1007/978-1-4614-4496-1_4.
3. CDC. Wastewater Monitoring—How Does It Work? [cdc.gov/nwss/pdf/Wastewater-COVID-infographic-h.pdf](https://www.cdc.gov/nwss/pdf/Wastewater-COVID-infographic-h.pdf). Accessed January 24, 2025.
4. Gupta P, Liao S, Ezekiel M, et al. [Wastewater Genomic Surveillance Captures Early Detection of Omicron in Utah](#). *Microbiol Spectr*. 2023;11(3):e0039123. doi:10.1128/spectrum.00391-23.
5. US GAO. Science & Tech Spotlight: Wastewater Surveillance. [gao.gov/products/gao-22-105841](https://www.gao.gov/products/gao-22-105841). Published April 11, 2022. Accessed January 24, 2025.
6. 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
7. Crits-Christoph A, Kantor RS, Olm MR, et al. [Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants](#). *mBio*. 2021;12(1):e02703-20. Published 2021 Jan 19. doi:10.1128/mBio.02703-20.
8. Dueholm MKD, Nierychlo M, Andersen KS, et al. [MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants](#). *Nat Commun*. 2022;13(1):1908. Published 2022 Apr 7. doi:10.1038/s41467-022-29438-7.
9. Kantor RS, Jiang M. [Considerations and Opportunities for Probe Capture Enrichment Sequencing of Emerging Viruses from Wastewater](#). *Environ Sci Technol*. 2024;58(19):8161-8168. doi:10.1021/acs.est.4c02638.
10. Cancela F, Lizasoain A, Panzera Y, et al. [Targeted Enrichment Sequencing Utilizing a Respiratory Pathogen Panel for Genomic Wastewater-Based Viral Epidemiology in Uruguay](#). *Food Environ Virol*. 2025;17(1):14. Published 2025 Jan 9. doi:10.1007/s12560-024-09629-9.
11. Tisza M, Javornik Cregreen S, Avadhanula V, et al. [Wastewater sequencing reveals community and variant dynamics of the collective human virome](#). *Nat Commun*. 2023;14(1):6878. Published 2023 Oct 28. doi:10.1038/s41467-023-42064-1.
12. CDC. Respiratory Illnesses Data Channel. [cdc.gov/respiratory-viruses/data/index.html#cdc_data_surveillance_section_2-weekly-national-summary](https://www.cdc.gov/respiratory-viruses/data/index.html#cdc_data_surveillance_section_2-weekly-national-summary). Updated February 21, 2025. Accessed February 25, 2025.

illumina中国

上海办公室 • 电话 (021) 6032-1066 • 传真 (021) 6090-6279
 北京办公室 • 电话 (010) 8441-6900 • 传真 (010) 8455-4855
 技术支持热线 400-066-5835 • chinasupport@illumina.com
 市场销售热线 400-066-5875 • china_info@illumina.com • www.illumina.com.cn

© 2026 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为因美纳公司或其各自所有者的财产。
 关于具体的商标信息，请访问www.illumina.com.cn/company/legal.html。
 M-GL-02915 v1.0



因美纳企业动态



因美纳市场助手



因美纳中国官方商城

illumina®