

Viral Surveillance Panel v2

Sequenziamento ottimizzato dell'intero genoma per la sorveglianza e la ricerca virale ad alto rischio

- Pannello ampliato che fornisce una copertura di circa 200 virus, inclusi quelli che riguardano la salute pubblica¹⁻⁶
- Arricchimento mediante ibridazione-cattura compatibile con i patogeni virali a RNA e DNA
- Flusso di lavoro integrato che supporta vari tipi di campioni host e ambientali⁷

Identificazione di virus ad alto impatto per la sorveglianza della salute pubblica

La sorveglianza genomica virale svolge un ruolo fondamentale nella sicurezza sanitaria globale, poiché fornisce informazioni preziose sull'evoluzione, la diffusione e il comportamento dei patogeni.¹ L'analisi del corredo genetico dei virus mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS, next-generation sequencing) consente agli scienziati di monitorare le mutazioni che possono influire sulla trasmissibilità, sulla virulenza o sulla resistenza al trattamento.⁸ Queste informazioni sono fondamentali per progettare test diagnostici, terapie e vaccini efficaci in grado di combattere le malattie infettive emergenti.

Illumina Viral Surveillance Panel v2 è un pannello NGS che consente il rilevamento e il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, whole-genome sequencing) di circa 200 virus (elenco completo disponibile [qui](#)), inclusi i virus identificati come rischi importanti per la salute pubblica¹⁻⁶ (Tabella 1). Il pannello utilizza un flusso di lavoro di arricchimento dei target mediante ibridazione-cattura, che consente il sequenziamento di diversi tipi di campione senza l'elevata profondità di lettura richiesta dal sequenziamento metagenomico shotgun. Rispetto ad altri metodi di rifequenziamento mirato, come il sequenziamento degli ampliconi, il metodo mediante ibridazione-cattura fornisce una maggiore copertura uniforme sui genomi virali e una maggiore capacità di identificazione delle mutazioni e delle sequenze diverse, rendono il Viral Surveillance Panel v2 la soluzione ideale per la sorveglianza delle epidemie e il monitoraggio delle varianti.

Flusso di lavoro NGS ottimizzato

Il flusso di lavoro di Viral Surveillance Panel v2 si arricchisce di genomi virali provenienti da una gamma di tipi di campioni, tra cui acque reflue, siero, plasma, lesioni cutanee e tamponi nasofaringei.⁷ Le librerie vengono preparate da RNA o DNA estratto da campioni host o ambientali, sequenziate su un sistema di sequenziamento da banco Illumina e analizzate mediante DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus App disponibile su BaseSpace™ Sequence Hub. Le fasi di preparazione e sequenziamento delle librerie possono essere completate in due giorni con interventi manuali minimi⁷ (Figura 1).

Preparazione delle librerie

Il flusso di lavoro per la preparazione delle librerie di Viral Surveillance Panel v2 comprende fasi di pre-arricchimento e arricchimento. Il pre-arricchimento genera centinaia di migliaia di librerie non mirate arricchite con sonde Viral Surveillance Panel v2 utilizzando un approccio mediante ibridazione-cattura. L'arricchimento con tagmentazione su microsferi fornisce un rapido flusso di lavoro compatibile con l'automazione e che può essere completato in circa due giorni con interventi manuali minimi. Il protocollo supporta quantità di input di campioni che vanno da 10 ng a 100 ng di acido nucleico totale e supporta il multiplex di un massimo di 384 campioni in una singola esecuzione.



Figura 1: flusso di lavoro di Viral Surveillance Panel v2. Grazie a un flusso di lavoro completo e ottimizzato, le librerie vengono preparate a partire da campioni host o ambientali, sequenziate su un sistema di sequenziamento Illumina e analizzate con DRAGEN Microbial Enrichment Plus App 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 al sistema di sequenziamento utilizzato.

Tabella 1: principali virus ad alto rischio inclusi in Viral Surveillance Panel v2

Virus adeno-associato 2	Adenovirus umano A-G	Virus Mayaro	Virus Sabia
Virus Aichi 1	Bocavirus umano	Virus del morbillo	Salivirus A
Virus Aigai	Coronavirus umano	Virus della meningite	Phlebovirus siciliano
Bombali Virus	Citomegalovirus umano	Coronavirus correlato alla sindrome respiratoria mediorientale	Sapovirus
Bourbon Virus	Virus dell'immunodeficienza umana 1/2	Virus Mpox	Coronavirus correlato alla sindrome respiratoria acuta grave
Virus Cache Valley	Metapneumovirus umano	Virus della parotite	Coronavirus correlato alla sindrome respiratoria acuta grave 2
Virus dell'encefalite della California	Papillomavirus umano	Virus dell'encefalite Murray Valley	Semliki Forest virus
Virus Chapare	Virus parainfluenzale umano 1-4	Virus Nipah	Virus della febbre grave con sindrome da trombocitopenia
Virus chikungunya	Parechovirus umano	Norovirus	Sindbis virus
Virus della febbre da zecca del Colorado	Parvovirus umano B19	Virus della febbre emorragica di Omsk	Snowshoe hare virus
Virus Coxsackie A/B	Virus dell'influenza A-C	Onyong-nyong virus	Sosuga virus
Virus della febbre emorragica Crimea-Congo	Virus Jamestown Canyon	Virus Oropouche	Virus dell'encefalite di St. Louis
Virus dengue 1-4	Virus dell'encefalite giapponese	Poliovirus	Virus della zecca Tacheng 2
Virus Ebola	Virus Junin	Polyomavirus	Virus Tahyna
Echovirus	Virus della malattia della foresta Kyasanur	Virus Powassan	Virus dell'encefalite trasmessa da zecche
Enterovirus A-D	Virus di La Crosse	Virus Punta Toro	Virus Torque teno
Virus di Epstein-Barr	Virus di Lassa	Virus della rabbia	Virus Toscana
Virus dell'encefalite equina	Lloviu virus	Ravn virus	Virus Usutu
Virus Guanarito	Virus Lujo	Virus respiratorio sinciziale A/B	Virus della varicella-zoster
Hantavirus	Virus della coriomeningite linfocitaria	Rhinovirus A-C	Virus Variola
Heartland virus	Lyssavirus	Virus della febbre della Valle del Rift	Virus West Nile
Henipavirus	Virus Machupo	Virus Ross-River	Virus della febbre gialla
Epatovirus A-E	Mamastrovirus	Rotavirus A/B/C/H	Virus zika
Herpes simplex virus 1/2	Virus di Marburg	Virus della rosolia	

Sequenziamento

Le librerie arricchite con Viral Surveillance Panel v2 richiedono una profondità di lettura inferiore e possono essere sequenziate su più sistemi, inclusi i sistemi da banco MiniSeq™, MiSeq™, 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 due milioni di letture totali per campione con una lunghezza di lettura di 2 × 150 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 otto milioni di letture totali per campione. In presenza di altri acidi nucleici microbici, come quelli provenienti da batteri che si trovano in tipi di campioni complessi, sono previste numerose letture fuori target.

Analisi dei dati

I dati generati utilizzando Viral Surveillance Panel v2 vengono analizzati utilizzando DRAGEN Microbial Enrichment Plus App disponibile su BaseSpace Sequence Hub. Questa pipeline di analisi facile da utilizzare fornisce il controllo qualità del campione, l'allineamento guidato dal riferimento a un ampio database del genoma virale valutato, l'identificazione di varianti, la generazione di sequenze di consenso del genoma virale, la previsione della resistenza antivirale per i virus dell'influenza A/B, opzioni di report flessibili e l'integrazione con Pangolin e Nextclade per un'ulteriore assegnazione filogenetica dei virus supportati.

Prestazioni

Arricchimento dei target

Rispetto al sequenziamento metagenomico shotgun, in cui viene sequenziato tutto l'RNA o tutto il DNA, l'ibridazione-cattura mirata utilizzata da Viral Surveillance Panel v2 minimizza l'inutile sequenziamento dei microbi host e non target, riduce i costi e consente l'ampio sequenziamento dei genomi virali sui sistemi di sequenziamento da banco.⁷

Per valutare le prestazioni di Viral Surveillance Panel v2, i campioni virali multitarget sono stati creati con diversi numeri di copie in presenza di un elevato background di RNA (10 ng) e DNA (10 ng) umani (Tabella 2).

Il recupero del genoma virale mediante arricchimento con Viral Surveillance Panel v2 è stato confrontato con il sequenziamento metagenomico shotgun senza arricchimento. Viral Surveillance Panel v2 ha dimostrato un recupero superiore del genoma virale da campioni artificiali multitarget rispetto al sequenziamento metagenomico shotgun (Figura 2). Utilizzando il metodo di Viral Surveillance Panel v2, il 99,1% del genoma dell'adenovirus umano E e il 99,4% del genoma del virus dell'influenza A (H3N2) sono stati recuperati, in media, su sei replicati con 1.000 copie del genoma per reazione (Figura 2A, 2C). Il sequenziamento metagenomico shotgun ha dimostrato una copertura del genoma significativamente inferiore per lo stesso titolo virale. Nei replicati con 1.000 copie di genoma per reazione, in media è stato recuperato solo l'1,9% del genoma dell'adenovirus umano E e lo 0% del genoma del virus dell'influenza A (H3N2) (Figura 2B, 2D).

Tabella 2: materiale di controllo virale quantitativo utilizzato per valutare le prestazioni di Viral Surveillance Panel v2

Ceppo di riferimento	Materiale di controllo virale	Fornitore	N. di catalogo
Ceppo RI-67 di adenovirus umano 4	DNA genomico quantitativo	ATCC	VR-1572DG
Ceppo A del virus dell'influenza A (H3N2)/Wisconsin/15/2009	RNA genomico quantitativo	ATCC	VR-1882DQ

Campioni clinici residui

Il flusso di lavoro flessibile di Viral Surveillance Panel v2 è compatibile con RNA, DNA e acido nucleico totale estratti da più tipi di campioni clinici, inclusi plasma, siero, lesioni cutanee e tamponi nasofaringei. Viral Surveillance Panel v2 riduce la percentuale di letture host sequenziate e si arricchisce di letture virali mirate, dimostrando così una maggiore copertura del genoma virale e una profondità di copertura mediana. Per valutare le prestazioni di Viral Surveillance Panel v2 sono stati utilizzati campioni clinici residui con virus pre-identificati (Tabella 3). Tutti i campioni clinici residui arricchiti con Viral Surveillance Panel v2 hanno dimostrato una maggiore sensibilità al rilevamento virale su diversi tipi di virus (ad eccezione del virus dell'immunodeficienza umana 1) e di campione, rispetto al sequenziamento metagenomico shotgun (Figura 3).

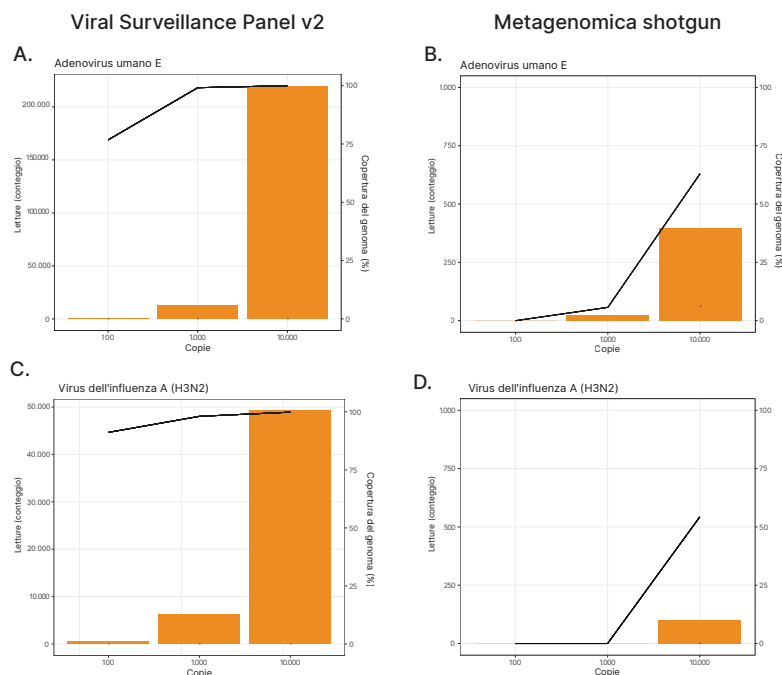


Figura 2: conteggi delle letture e copertura genomica virale ottenuti con Viral Surveillance Panel v2. Le prestazioni di Viral Surveillance Panel v2 e del sequenziamento shotgun senza arricchimento sono state confrontate mediante campioni artificiali quantitativi multitarget disponibili in commercio. (A) Adenovirus umano 4 (ceppo RI-67) arricchito con Viral Surveillance Panel v2, (B) adenovirus umano 4 (ceppo RI-67) sequenziato mediante metagenomica shotgun senza arricchimento, (C) virus dell'influenza A (H3N2) arricchito con Viral Surveillance Panel v2, (D) virus dell'influenza A (H3N2) sequenziato mediante metagenomica shotgun senza arricchimento. Sei replicati a 1.000 copie/livello di reazione di ciascun campione artificiale sono stati sequenziati su NextSeq 550 System con celle a flusso a output elevato. I dati di sequenziamento sono stati normalizzati a due milioni di letture totali.

Tabella 3: campioni clinici residui utilizzati per valutare le prestazioni di Viral Surveillance Panel v2

Virus preidentificato	Tipo di campione	Kit di estrazione	Input di campione
Herpes simplex virus 1	Lesione cutanea	ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep	Acido nucleico totale
Herpes simplex virus 2	Lesione cutanea	ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep	Acido nucleico totale
Virus dell'immunodeficienza umana 1	Plasma/siero	MagMAX Microbiome UltraNucleic Acid Isolation Kit	DNA, RNA
Virus dengue	Siero	QIAmp Viral RNA Kit	RNA
Virus respiratorio sinciziale umano A	Tampone nasofaringeo	QIAmp Viral RNA Kit	RNA
Virus dell'influenza A (H3N2)	Tampone nasofaringeo	QIAmp Viral RNA Kit	RNA

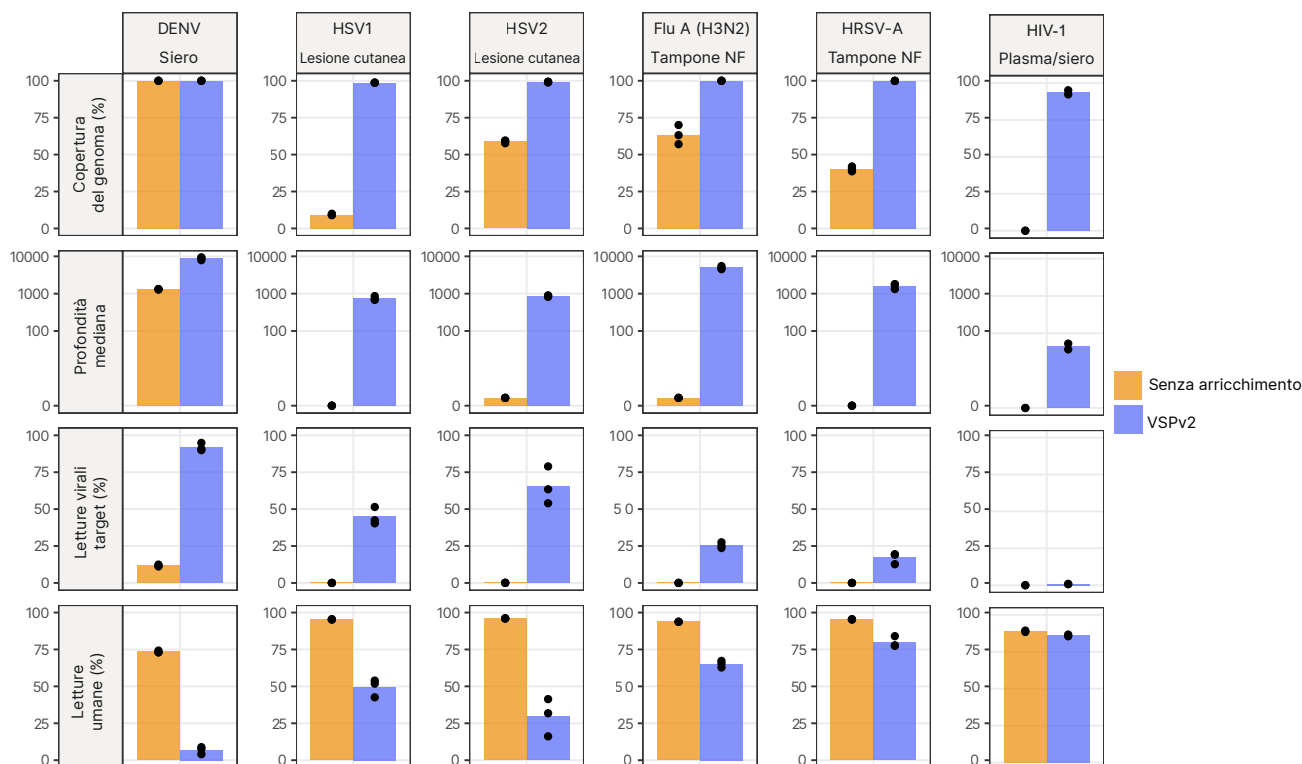


Figura 3: prestazioni di Viral Surveillance Panel v2 con i campioni clinici residui. Copertura del genoma, letture virali mirate, profondità mediana e percentuale di letture umane ottenute utilizzando Viral Surveillance Panel v2 o il sequenziamento metagenomico shotgun. Due o tre replicati di sei campioni clinici sono stati sequenziati su NextSeq 550 System con celle a flusso a output elevato. I dati di sequenziamento sono stati normalizzati a un milione di letture totali. DENV, virus dengue; HSV1, virus Herpes simplex 1; HSV2, virus Herpes simplex 2; Flu A, influenza A; HRSV-A, virus respiratorio sinciziale umano A; HIV-1, virus dell'immunodeficienza umana; NF, nasofaringeo; VSPv2, Viral Surveillance Panel v2.

Sorveglianza delle acque reflue

La sorveglianza delle sequenze virali nelle acque reflue fornisce un indicatore regionale della diffusione comune dei patogeni virali, fornendo ai professionisti della sanità pubblica preziose informazioni per la pianificazione delle risposte.⁹ Viral Surveillance Panel può essere utilizzato con questi campioni per consentire il rilevamento e l'identificazione precoci dei genomi virali nelle acque reflue a concentrazioni inferiori rispetto al sequenziamento shotgun (Tabella 4).

I campioni di acque reflue provenienti da due siti sono stati raccolti ed estratti attraverso collaborazioni con il Wisconsin State Lab of Hygiene (WSLH) e la Colorado State University (CSU). Sono stati valutati tre campioni provenienti da ciascun sito di raccolta. Le librerie preparate da questi sei campioni di acque reflue sono state sequenziate e normalizzate a otto milioni di letture totali per l'arricchimento di Viral Surveillance Panel v2 o a otto milioni e 25 milioni di letture totali per il sequenziamento metagenomico shotgun.

In questo confronto è stata utilizzata una profondità di sequenziamento di otto milioni di letture totali perché i campioni di acque reflue possono variare notevolmente in termini di complessità e possono contenere dozzine di virus a bassa abbondanza. Viral Surveillance Panel v2 ha dimostrato una maggiore sensibilità al rilevamento virale in un tipo di campione ambientale complesso con bassa carica virale complessiva rispetto al sequenziamento metagenomico shotgun, anche quando le letture totali per il sequenziamento metagenomico shotgun erano aumentate di circa sei volte (Tabella 4).

Tabella 4: principali virus rilevati nelle acque reflue utilizzando Viral Surveillance Panel v2 o il sequenziamento metagenomico shotgun

Virus (ceppo)	8 milioni di letture totali				25 milioni di letture totali	
	Viral Surveillance Panel v2		Metagenomica shotgun		Metagenomica shotgun	
	Copertura del genoma (%)	Conteggio letture	Copertura del genoma (%)	Conteggio letture	Copertura del genoma (%)	Conteggio letture
Sapovirus (GII.1)	99,7	219.539	50,0	57	84,2	360
Adenovirus umano F (adenovirus umano 41)	100	104.693	6,4	18	23,6	72
Coronavirus umano OC43 (HCoV_OC43)	98,1	23.857	0	0	10,0	26
Sapovirus (GV)	99,6	10.750	0	0	25,3	19
Adenovirus umano E	88,4	6.733	0	0	0	0
Poliomavirus JC (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
Adenovirus umano A (adenovirus umano 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
Polyomavirus BK (BKPyV)	100	1.522	0	0	11,1	4
Mamastrovirus 8 (MAstV8) [VA2]	92,1	1.208	0	0	6,1	4
Papillomavirus umano 59 (HPV59; ad alto rischio)	69,3	1.015	0	0	0	0
Enterovirus A (non virus Coxsackie) [Enterovirus A71]	70,0	295	5,1	4	9,0	6

Riepilogo

Viral Surveillance Panel v2 fa parte di un flusso di lavoro ottimizzato e completo per il rilevamento di epidemie virali, la sorveglianza zoonotica e il monitoraggio delle mutazioni. Il kit include sonde di ibridazione-cattura per identificare circa 200 genomi di virus a RNA e DNA che sono stati definiti come ad alto rischio per la salute pubblica. L'arricchimento del target mediante ibridazione-cattura riduce la necessità di un'elevata profondità di lettura del campione concentrandosi sulle sequenze target, riducendo i costi e aumentando la processività. Il flusso di lavoro semplificato è compatibile con un'ampia gamma di tipi di campioni e applicazioni, inclusi i campioni clinici e la sorveglianza delle acque reflue per individuare la presenza di virus sul territorio. I dati generati utilizzando Viral Surveillance Panel v2 possono essere analizzati utilizzando l'app di facile utilizzo DRAGEN Microbial Enrichment Plus App disponibile su BaseSpace Sequence Hub. Questo efficace flusso di lavoro NGS fornisce eccellenti prestazioni di cattura virale per l'identificazione di DNA e RNA in campioni complessi, fornendo alle organizzazioni di salute pubblica e ai ricercatori un'alternativa avanzata al sequenziamento shotgun.

Maggiori informazioni

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[DRAGEN Microbial Enrichment Analysis Plus App](#)

[Sistemi di sequenziamento Illumina](#)

Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
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

Bibliografia

- 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](#). Pubblicato il 30 luglio 2024. Consultato il 9 agosto 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](#). Consultato il 9 agosto 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](#). Aggiornato il 31 luglio 2024. Consultato il 9 agosto 2024.

6. Africa Centers for Disease Control and Prevention. Diseases information. africacdc.org/disease/. Consultato il 9 agosto 2024.
7. Dati in archivio. 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.



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

© 2024 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, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02882 ITA v1.0