

# Illumina Microbial Amplicon Prep— Influenza A/B

Soluzione ottimizzata per la preparazione delle librerie per la ricerca sul virus dell'influenza e la sorveglianza della salute pubblica

- Consente una copertura rapida e imparziale dell'intero genoma dei ceppi di virus dell'influenza A e B
- Ospita input di RNA da un'ampia gamma di tipi di campioni e cariche virali
- Semplifica l'analisi dell'intero genoma e l'interpretazione delle varianti

**illumina**<sup>®</sup>

## Introduzione

I ceppi di virus dell'influenza A e B possono causare epidemie di malattie respiratorie stagionali, pandemiche e zoonotiche, rappresentando una minaccia globale per la salute umana e animale. La pandemia di COVID-19 ha dimostrato l'utilità della sorveglianza genomica dei patogeni basata sul sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing), che consente ai ricercatori di monitorare le varianti emergenti e di determinare la risposta della sanità pubblica. Approcci simili a base di ampliconi sono stati applicati per sequenziare e caratterizzare i virus dell'influenza.<sup>1,2</sup> Tuttavia, i virus dell'influenza presentano un'elevata variabilità genomica, il che rende difficile il loro accurato sequenziamento. Inoltre, molti protocolli di sequenziamento disponibili non sono ottimizzati e possono produrre risultati di sequenziamento variabili.

Il kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B si basa sul comprovato Illumina COVIDSeq™ Assay e consente il sequenziamento e la caratterizzazione accurati, rapidi e imparziali dei virus dell'influenza. L'integrazione con la DRAGEN™ Targeted Microbial App di facile utilizzo semplifica l'analisi dei dati, rendendo l'identificazione delle varianti e la sottotipizzazione virale accessibili ai laboratori senza esperienza in bioinformatica. Come parte di un flusso di lavoro integrato e scalabile (Figura 1), il kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B consente ai ricercatori di espandere i propri sforzi di sorveglianza genomica per proteggere la salute delle loro comunità.

## Flusso di lavoro ottimizzato

Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B è una soluzione di preparazione delle librerie basata su RT-PCR con elevato multiplex per il sequenziamento e la caratterizzazione rapidi e imparziali dei virus dell'influenza (Tabella 1). Questo kit, basato sul solido flusso di lavoro dell'Illumina COVIDSeq Assay, include le fasi per l'isolamento del materiale genetico attraverso il sequenziamento e l'analisi dei dati per il rilevamento e la caratterizzazione dei ceppi del virus dell'influenza (Figura 1).

### Preparazione delle librerie

Il kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B include i reagenti necessari per la trascrizione inversa di RNA, l'amplificazione mediante PCR, i trasposoni legati a microsferi per la tagmentazione degli ampliconi e gli adattatori indicizzati per generare librerie di sequenziamento da ampliconi dell'intero genoma (Figura 2). Il kit è compatibile con l'RNA estratto utilizzando i kit disponibili in commercio.

Tabella 1: tempistiche totali di elaborazione e degli interventi manuali

N. di campioni	Tempo di elaborazione	Durata interventi manuali
8 campioni	8 ore	1,9 ore
48 campioni	9,3 ore	3,2 ore

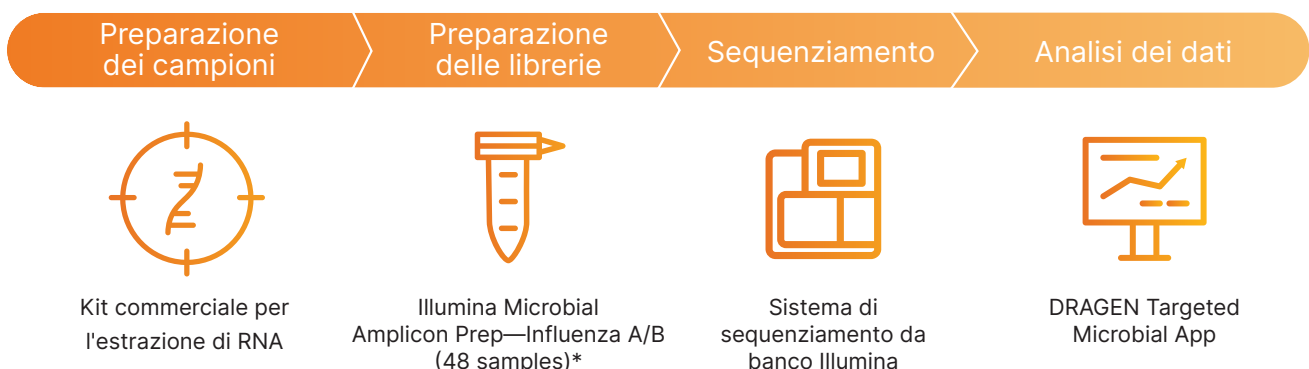


Figura 1: flusso di lavoro Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B. In un flusso di lavoro ottimizzato, le librerie dei virus dell'influenza vengono preparate utilizzando il kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B, sequenziate su qualsiasi sistema di sequenziamento da banco Illumina e analizzate nella DRAGEN Targeted Microbial App per il rilevamento, l'identificazione di varianti e la tipizzazione dei ceppi. \*Il kit fornisce tutti i reagenti necessari per la preparazione delle librerie, inclusi un pool di primer universali per il virus dell'influenza A/B, reagenti RT-PCR e indici doppi univoci. I reagenti per l'estrazione dell'RNA non sono inclusi.

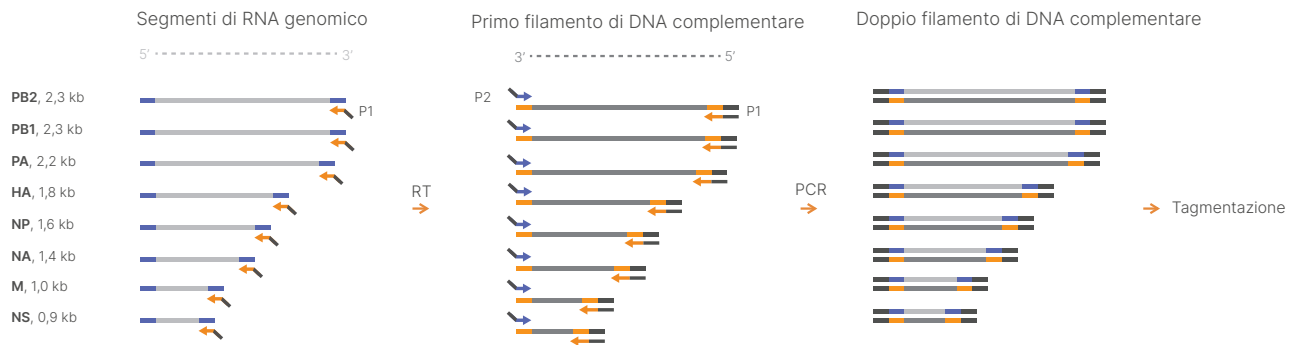


Figura 2: approccio universale alla RT-PCR dell'intero genoma del virus dell'influenza A/B per generare ampliconi pronti per la tagmentazione. Il pool di primer dell'influenza A/B contiene 16 primer progettati per ibridarsi alle tre estremità del primo e del secondo filamento di DNA complementare (cDNA, complementary DNA), consentendo sia la sintesi di cDNA a lunghezza intera di ciascun segmento di RNA genomico sia la successiva amplificazione della PCR per produrre ampliconi completi pronti per la tagmentazione e il completamento della libreria. Le linee arancioni rappresentano le regioni non codificanti conservate del segmento di RNA genomico. Le linee nere rappresentano le ulteriori sequenze di DNA aggiunte dai primer universali.

## Sequenziamento

Le librerie preparate possono essere sequenziate su qualsiasi sistema di sequenziamento Illumina. Tuttavia, la configurazione a 48 campioni di Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B rende il kit ideale per le piattaforme da banco, ad esempio iSeq™ 100 System, MiniSeq™ System, MiSeq™ System, NextSeq™ 500 System, NextSeq 550 System, NextSeq 1000 System e NextSeq 2000 System.

## Analisi dei dati

L'Illumina DRAGEN Targeted Microbial App è disponibile gratuitamente su BaseSpace™ Sequence Hub. L'app di facile utilizzo allinea le letture ai genomi di riferimento, identifica le varianti e genera una sequenza di genomi con consenso che rappresenta la popolazione delle specie di acido nucleico nel campione (Figura 3). Quando disponibili, per un'ulteriore analisi dei lignaggi, è possibile accedere a database esterni selezionati.

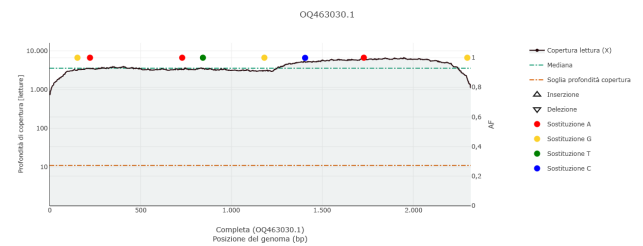


Figura 3: diagramma di copertura del virus dell'influenza A generato utilizzando la DRAGEN Targeted Microbial App. Gli output del diagramma di copertura dalla DRAGEN Targeted Microbial App sono interattivi, con la possibilità di passare da una scala logaritmica all'altra, includere o escludere le linee di copertura mediane e/o le informazioni sulla sostituzione/delezione. Per i virus segmentati, come i virus dell'influenza A e B, ogni segmento è mostrato in un diagramma di copertura separato. Ogni cerchio rappresenta un polimorfismo di singolo nucleotide (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) che varia rispetto al genoma di riferimento. Ogni colore indica se si tratta di sostituzioni A, G, T o C. Le inserzioni e le delezioni sono indicate anche dai triangoli. I grafici interattivi possono essere scaricati come file PNG, come mostrato qui.

## Eccellente copertura sui genomi del virus dell'influenza A/B

Ilumina Microbial sia Amplicon Prep—Influenza A/B è progettato per fornire un'ampia copertura di sequenziamento sui genomi dei virus dell'influenza sia A sia B. Questo kit include un pool di 16 primer universali ben testati e consolidati<sup>3,4</sup> che forniscono una copertura superiore al 98% per i ceppi del virus dell'influenza A e B, inclusi i geni altamente variabili di neuraminidasi (NA, Neuraminidase) ed emoagglutinina (HA, Hemagglutinin) (Figura 4, Figura 5).<sup>5</sup>

Il kit Ilumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B flessibile è compatibile con i campioni di RNA isolati utilizzando protocolli di estrazione standard senza la necessità di modifiche. I campioni per la ricerca clinica, inclusi i tamponi nasali, possono variare per qualità e carica virale. Il kit Ilumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B mantiene prestazioni eccellenti su isolati di virus con valori Ct compresi tra 21,2 e 31,1 (ovvero, titoli di virus da alti a bassi). Per risultati ottimali, si raccomandano campioni con valori Ct inferiori a 30.

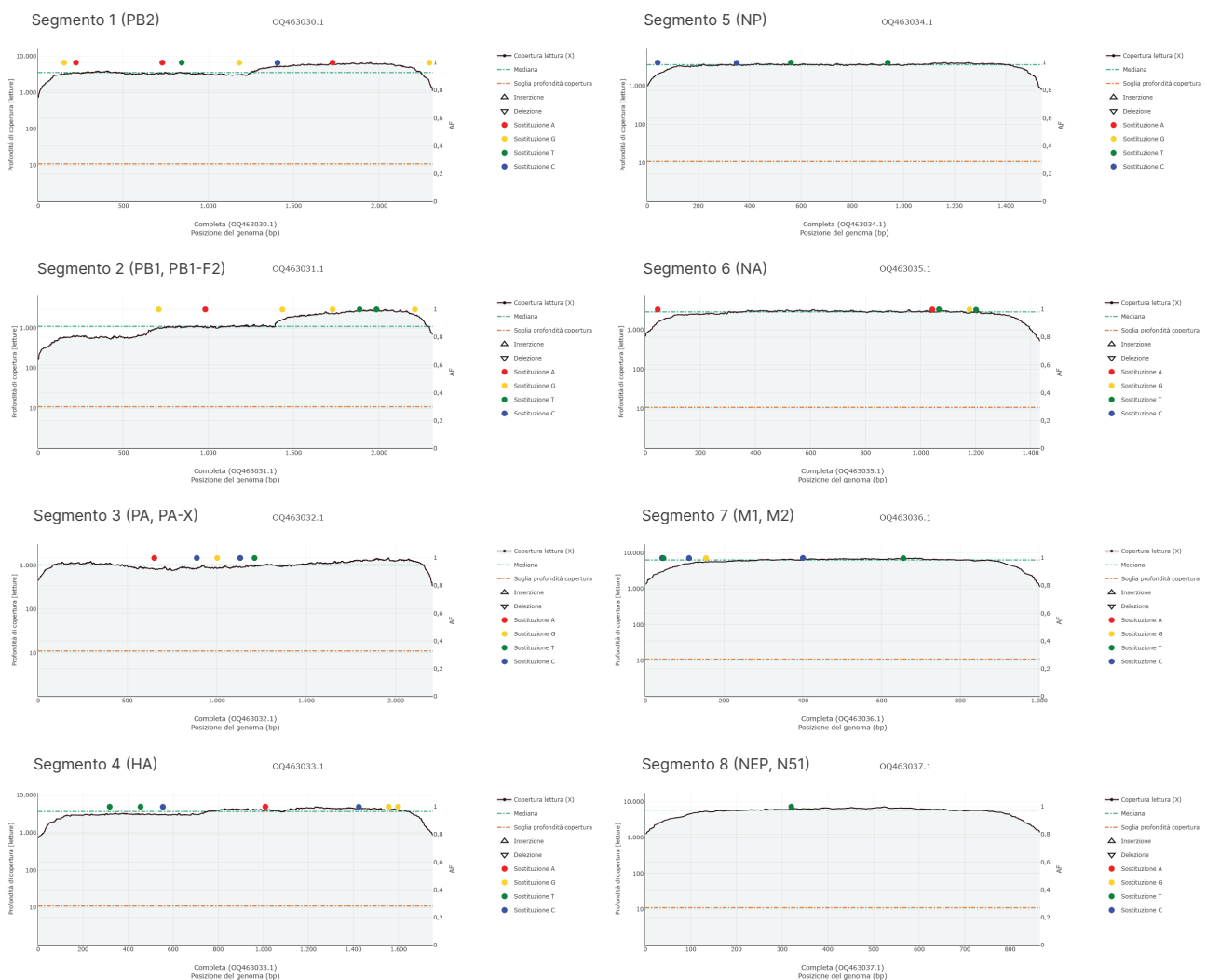


Figura 4: grafici di copertura genomica per i campioni di virus dell'influenza A. Grafici di copertura rappresentativi da un campione di virus H1N1 (valore Ct = 21,2, circa 482 copie di RNA virale) da tamponi nasofaringei che mostrano la copertura dell'intero genoma su tutti gli otto segmenti del virus dell'influenza A. Ciascun grafico rappresenta la copertura di ogni segmento del genoma del virus dell'influenza A. Gli ID di accesso al genoma di riferimento sono forniti in ciascun grafico. Le linee tratteggiate rappresentano la profondità di copertura mediana. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato un milione di letture paired-end ( $2 \times 149$  bp). I dati sono stati analizzati utilizzando la DRAGEN Targeted Microbial App.



Figura 5: grafici di copertura genomica per i campioni di virus dell'influenza B. Grafici di copertura rappresentativi da un campione di virus dell'influenza B (ATCC VR-1735, valore Ct = 22,1, circa 85.000 copie di RNA virale) che mostrano la copertura dell'intero genoma su tutti gli otto segmenti del virus dell'influenza B. Ciascun grafico rappresenta la copertura di ogni segmento del genoma del virus dell'influenza B. Gli ID di accesso al genoma di riferimento sono forniti in ciascun grafico. Le linee tratteggiate rappresentano la profondità di copertura mediana. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato un milione di letture paired-end ( $2 \times 149$  bp). I dati sono stati analizzati utilizzando la DRAGEN Targeted Microbial App.

## Riepilogo

Il kit Illumina Microbial Amplicon Prep—Influenza A/B consente ai ricercatori della sanità pubblica di proteggere la salute delle comunità grazie a una soluzione ottimizzata per la caratterizzazione e la sorveglianza del virus dell'influenza. Questo saggio flessibile è compatibile con gli input di RNA estratti da colture o tamponi nasali e lavaggi a cariche virali variabili. L'integrazione con le innovative piattaforme NGS offre un'eccezionale qualità dei dati, flessibilità e scalabilità per una sorveglianza della salute pubblica a elevata efficacia e una ricerca sui virus dell'influenza ad alto impatto.

## Maggiori informazioni

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

[Genomica microbica](#)

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	N. di catalogo
Illumina Microbial Amplicon Prep— Influenza A/B (48 samples)	20106305

## Bibliografia

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](http://www.protocols.io/view/a-sequencing-and-subtyping-protocol-for-influenza-n2bvj8mrxgk5). Pubblicato il 28 marzo 2023. Consultato il 21 giugno 2023.



Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com) | [www.illumina.com](http://www.illumina.com)

© 2023 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](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
 M-GL-01898 ITA v1.0