Schnellere Bestimmung von Infektionskrankheiten

Anwendungsspezifisches Turborezept für die Sequenzierung respiratorischer Pathogene auf der MiSeq™ i100 Series

Umfassende Coverage respiratorischer Viren, Bakterien, Pilze sowie zugehöriger Anitbiotikaresistenzgene

Optimiertes Sequenzierungsrezept zur Laufzeitverkürzung bei hoher Qualität und Ergebnismenge

Flexibler und skalierbarer Workflow mit integrierter Datenanalyse auf dem Gerät

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.

Einleitung

Der genaue und zeitnahe Nachweis respiratorischer Pathogene ist insbesondere bei Misch- oder Koinfektionen unter Umständen schwierig.[1,2] NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) stellt eine effektive Methode zum Nachweis bekannter und neuartiger respiratorischer Pathogene mit einem einzigen Assay in unterschiedlichen Probentypen dar, darunter solche mit mehreren Erregern.[3] Im vorliegenden technischen Hinweis wird ein anwendungsspezifisches Sequenzierungsrezept (Turborezept) für die MiSeq i100 Series vorgestellt, das den Workflow für den Nachweis respiratorischer Pathogene verkürzt. Das MiSeq 100-Turborezept ermöglicht die Sequenzierung von Single-End-Reads mit zwei Barcodes und 100 bp in 2,5 bis 3 Stunden. Im Vergleich dazu sind beim Standardsequenzierungsrezept auf der MiSeq i100 Series (Standardrezept) mehr als 4 bis 5 Stunden erforderlich.[4]

Das anwendungsspezifische Turborezept wurde mit dem Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel bewertet. Dieses visiert über 280 Atemwegspathogene an, darunter Viren, Bakterien und Pilze, sowie zugehörige Marker für Antibiotikaresistenzen (AMR, Antimicrobial Resistance). Mit der Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und der Analyse mit der DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus App ermöglicht der flexible und skalierbare verkürzte Workflow[4] (Abbildung 1) den Nachweis mit Atemwegsinfektionen assoziierter Pathogene in der klinischen Forschung innerhalb eines Tages. Die Performance entspricht der beim Standardrezept. Die mit dem Turborezept erzielte Zeitersparnis beeinträchtigt die Genauigkeit der Sequenzierung nicht.

Methoden

Probenvorbereitung

Als Referenzmaterial wurde eine qualitativ komplexe Mischung aus gereinigten Viruspartikeln und Bakterienzellen verwendet, die in stabilisiertem, nicht infektiösem Zustand geliefert wurden. NATtrol Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Control (ZeptoMetrix, Katalog-Nr. NATRPC2.1-BIO) umfasst zwei unterschiedlich erstellte Pathogenmischungen: RP2.1 Control 1 (12 anvisierte Pathogene) und RP2.1 Control 2 (11 anvisierte Pathogene). RP2.1 Control 1 wurde vor der Extraktion mit dem ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, Katalog-Nr. R2002) unter Verwendung der parallelen DNA/RNA-Extraktionsmethode in einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 in 1× PBS verwendet.

Bibliotheksvorbereitung

Bibliotheksvorbereitung und Target-Anreicherung in der 3-Plex-Hybridisierung wurden mit Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, Katalog-Nr. 20040536) und dem Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel (RPIP) Kit (Illumina, Katalog-Nr. 20047050) durchgeführt.



Abbildung 1: Verkürzter Workflow für den Nachweis respiratorischer Pathogene
Das anwendungsspezifische Turborezept auf der MiSeq i100 Series verkürzt den NGS-Nachweis respiratorischer Pathogene.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden auf dem MiSeq i100 Plus System (Illumina, Katalog-Nr. 20115695) mit einer Read-Länge von 1 × 101 bp unter Verwendung des anwendungsspezifischen Turborezepts und des Standardrezepts für das MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20126567), das MiSeq i100 Plus 50M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20141595) und das MiSeq i100 Plus 100M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, Katalog-Nr. 20141598) sequenziert. Alle Läufe wurden mit der Standardkonfiguration durchgeführt, bei der zunächst die Indizierung erfolgt.

Datenanalyse

Demultiplexierte FASTQ-Sequenzierungsdateien wurden mit dem FASTQ-Toolkit einem Downsampling auf 1 Mio. Cluster unterzogen und mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App (v1.1.1) auf der MiSeq i100 Series analysiert. Die Ergebnisse wurden mit der Cloudsoftware DRAGEN Microbial Enrichment Plus auf die Übereinstimmung der Onboard-Workflows überprüft.

Ergebnisse

Kürzere Laufzeiten mit hoher Genauigkeit und umfangreichen Ergebnissen

Das anwendungsspezifische MiSeq i100-Turborezept erzielt gegenüber dem Standardrezept eine Zeitersparnis von ca. 40 % während der Sequenzierung für 100-Zyklen-Versionen der 25M-, 50M- und 100M-Reagenzien-Kits. Zeiteinsparungen wurden bei sämtlichen Aspekten des SBS-Rezepts (Sequencing by Synthesis, Sequenzierung durch Synthese) umgesetzt, einschließlich der Chemie-, Fluidik- und Bildgebungsschritte. Ziel war die Aufrechterhaltung einer hohen Genauigkeit und umfangreicher Ergebnisse. Die Sequenzierung mit dem Turborezept erfolgte in ca. 2,5 Stunden bzw. ca. 3 Stunden für die 25M- bzw. 100M-Kits (Abbildung 2). Die DRAGEN Microbial Enrichment Plus-Analyse von Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel-Proben benötigte weniger als 30 Minuten. Der gesamte Turborezept-Workflow, einschließlich Selbsttests und DRAGEN Microbial Enrichment Plus-Analyse auf dem Gerät bei Single-End-Reads mit zwei Barcodes (100 bp), benötigt beim 25M-Kit weniger als drei Stunden (Abbildung 2).

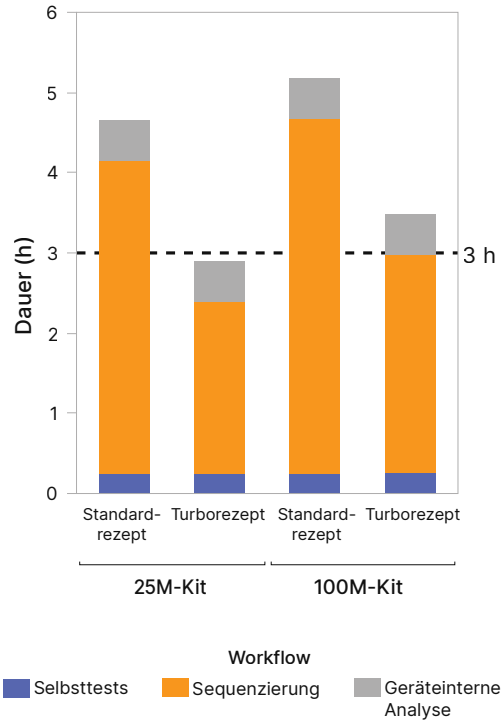


Abbildung 2: Verkürzter Sequenzierungsworkflow mit dem anwendungsspezifischen MiSeq i100-Turborezept
Vergleich der Workflow-Dauer für das MiSeq i100-Turborezept und das Standardrezept für 25M- und 100M-Fließzellen-Kits mit 100-Zyklen und doppelt indizierten Single-End-Reads (100 bp) in der Standardkonfiguration, bei der zunächst die Indizierung erfolgt.

Der Kontrollprobenlauf mit Turbo- und Standardsequenzierungsrezepten zeigte eine herausragende Übereinstimmung der primären Metriken. Qualität und Ergebnis waren beim Turborezept unverändert (Abbildung 3). Der prozentuale Anteil der Reads nach Filterung und Qualitätssicherung bei der DRAGEN Microbial Enrichment Plus-Analyse zeigt eine hohe Übereinstimmung zwischen dem Turbo- und dem Standardrezept, was darauf hindeutet, dass die hohe Read-Qualität für die Sekundäranalyse beibehalten wird (Abbildung 4).

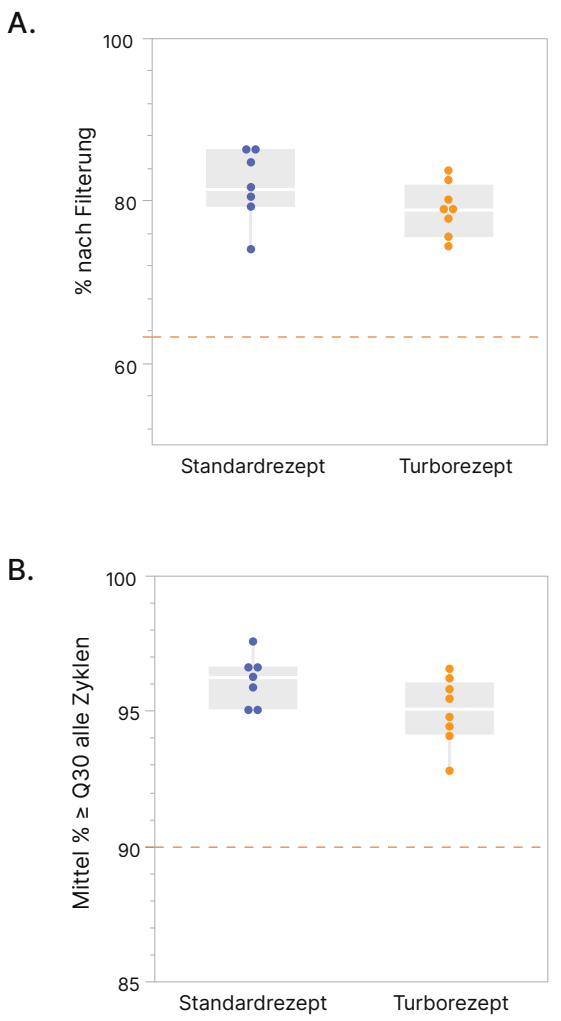


Abbildung 3: Übereinstimmung der primären Metriken zwischen dem MiSeq i100-Turborezept sowie dem entsprechenden Standardrezept
Vergleich des (A) prozentualen Anteils der Reads nach Filterung und des (B) mittleren prozentualen Anteils der Reads ≥ Q30 für die beiden Sequenzierungsrezepte, zusammengefasst aus Läufen mit 25M-, 50M- und 100M-Reagenzien-Kits (100 Zyklen) auf dem MiSeq i100.

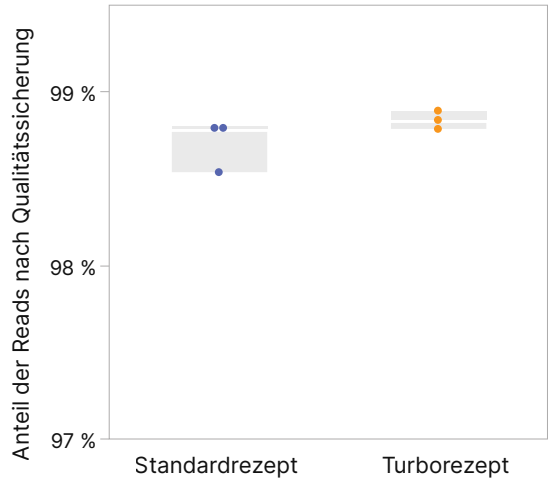


Abbildung 4: Hochpräzise Reads mit dem anwendungsspezifischen MiSeq i100-Turborezept
Vergleich des Anteils der Reads nach Qualitätssicherung aus der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App für drei Läufe mit jeweils dem Turbo- und dem Standardrezept für 25M-Reagenzien-Kits (100 Zyklen).

Hohe Analyseperformance für den Nachweis respiratorischer Pathogene

Das Turborezept sorgt für eine erhebliche Zeitersparnis ohne Beeinträchtigung der Assayperformance. Das Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit visiert 11 der 12 Pathogene in RP2.1 Control 1 an. Diese wurden sowohl mit dem Turbo- als auch mit den Standardrezeptläufen nachgewiesen (Tabelle 1). Das Adenovirus Typ 31 ist zudem in der RP2.1 Control 1-Mischung enthalten, wird vom Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit jedoch nicht anvisiert und ist nicht zur Befundung vorgesehen.

Die mittlere RPKM (Reads per Kilobase of Targeted Sequence per Million Quality-filtered Reads, Reads pro Kilobase der Target-Sequenz pro Million Reads nach Qualitätsfilterung) für die Replikate im Befund der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App wurde für jedes anvisierte Virus und jedes entsprechende Bakterium bestimmt. Die RPKM normalisieren die Anzahl anvisierter Reads über Pathogene und Proben hinweg, indem Unterschiede bei der Länge der anvisierten Sequenz und bei der Sequenzierungstiefe ausgewertet werden. Die RPKM pro Pathogen in der RP2.1 Control 1 zeigen eine hohe Korrelation zwischen Sequenzierungsläufen mit dem Turbo- und dem Standardrezept (Abbildung 5).

Tabelle 1: Übersicht über den Organismennachweis bei Läufen mit dem anwendungsspezifischen Turborezept sowie dem Standardrezept

NATtrol RP2.1 Control 1 Panel ID	Name des Pathogens im Befund	Übersicht über den Nachweis bei drei Läufen	
		Standardrezept	Turborezept
Adenovirus Typ 1	humanes Adenovirus C	3/3	3/3
Adenovirus Typ 3	humanes Adenovirus B	3/3	3/3
Adenovirus Typ 31[a]	(nicht anvisiert oder befundet)	–	–
Chlamydia pneumoniae CWL-029	*Chlamydia pneumoniae*	3/3	3/3
Influenza A 2009 H1N1 pdm A/NY/02/2009	Influenza-A-Virus (H1N1)	3/3	3/3
Influenza A H3N2 A/Brisbane/10/07	Influenza-A-Virus (H3N2)	3/3	3/3
Metapneumovirus B Peru6-2003	humanes Metapneumovirus (HMPV)	3/3	3/3
Mycoplasma pneumoniae M129	*Mycoplasma pneumoniae*	3/3	3/3
Parainfluenza Typ 1	humanes Parainfluenzavirus 1 (HPIV-1)	3/3	3/3
Parainfluenza Typ 4	humanes Parainfluenzavirus 4 (HPIV-4)	3/3	3/3
Rhinovirus 1A	humanes Rhinovirus A (HRV-A)	3/3	3/3
SARS-CoV-2 USA-WA 1/2020	SARS-CoV-2	3/3	3/3

a. Das Adenovirus Typ 31 ist in der RP2.1 Control 1-Mischung enthalten, wird vom Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit jedoch nicht anvisiert. Daher ist kein Nachweis vorgesehen.

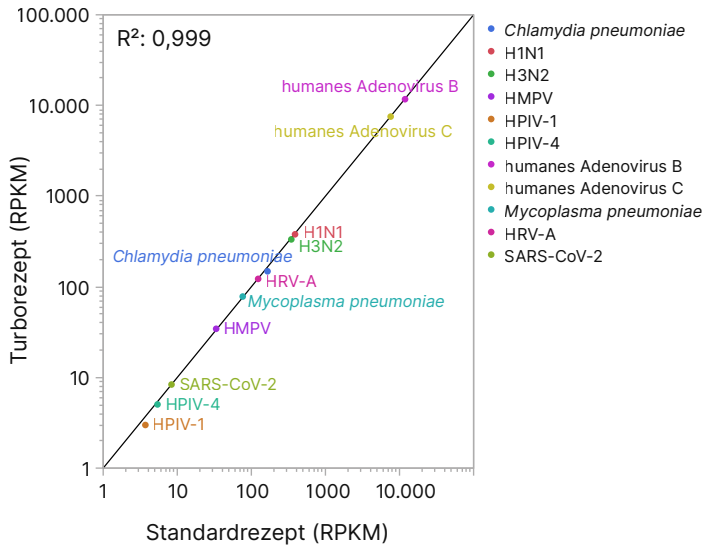


Abbildung 5: Hohe Korrelation des Pathogennachweises mit dem MiSeq i100-Turborezept sowie dem Standardrezept
Korrelation von Reads pro Kilobase der Target-Sequenz pro Million Reads nach Qualitätsfilterung (RPKM, Reads Per Kilobase Per Million) der 11 Pathogene in NATtrol RP2.1 Control 1, die vom Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel anvisiert werden, gemittelt aus drei Läufen mit jeweils dem anwendungsspezifischen Turborezept und dem Standardrezept für Reagenzien-Kits mit 25 Mio. Reads (100 Zyklen).

Zusammenfassung

Ein Turborezept auf der MiSeq i100 Series verkürzt die Sequenzierung für den Nachweis respiratorischer Pathogene bei unverändert hoher Sequenzierungsperformance um 40 %. Die Ergebnisse der Qualitätssicherung im Zusammenhang mit respiratorischen Pathogenen stimmten bei den Workflows mit Turbo- und Standardsequenzierungsrezept auf dem MiSeq i100 hochgradig überein.

Zugang zu den anwendungsspezifischen Turborezepten für die 25M-, 50M- und 100M-Reagenzien-Kits (100 Zyklen) für die MiSeq i100 Series erhalten Sie per Anfrage an den technischen Support von Illumina (techsupport@illumina.com).

Weitere Informationen →

MiSeq i100 Series

Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit

Quellen

1. Georgakopoulou VE. Insights from respiratory virus co-infections. *World J Virol.* 2024;13(4):98600. doi:10.5501/wjv.v13.i4.98600
2. Li X, Pan L, Li Z, et al. Etiology and clinical characteristics of pathogen co-detection in pediatric Mycoplasma pneumoniae pneumonia: A multicenter retrospective study. *Int J Infect Dis.* 2026;162:108230. doi:10.1016/j.ijid.2025.108230
3. Zhao M, Shi Y, Zhang C, et al. Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing using bronchoalveolar lavage fluid samples for pathogen detection in children with severe or refractory pneumonia. *Microbiol Spectr.* 2025;13(3):e0108724. doi:10.1128/spectrum.01087-24
4. Illumina. Simplest, fastest. For every lab. Broschüre zur MiSeq i100 Series. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-i100-brochure-m-gl-02245/miseq-i100-brochure-m-gl-02245.pdf. Veröffentlicht 2025. Aufgerufen am 4. März 2026.

illumina®

1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-04204 DEU v1.0