Identificación más rápida de enfermedades infecciosas

Fórmula turbo personalizada para la secuenciación de patógenos respiratorios en MiSeq™ i100 Series

Cobertura completa de virus, bacterias y hongos respiratorios, y genes de resistencia antimicrobiana.

Fórmula de secuenciación optimizada que permite una menor duración del experimento a la vez que mantiene una alta calidad y rendimiento.

Flujo de trabajo flexible y adaptable que incluye análisis de datos integrados.

Introducción

La identificación precisa y oportuna de patógenos respiratorios puede ser compleja, especialmente en el caso de infecciones mixtas o coinfecciones.[1,2] La secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) proporciona una forma eficaz de detectar patógenos respiratorios conocidos y de nueva aparición de diversos tipos de muestras, incluso con múltiples agentes infecciosos, en un único ensayo.[3] En esta nota técnica se destaca una fórmula de secuenciación personalizada (fórmula turbo) en MiSeq i100 Series que admite un flujo de trabajo acelerado para la identificación de patógenos respiratorios. La fórmula turbo en MiSeq i100 permite realizar lecturas de 100 pb individuales y con código de barras doble en 2,5-3 horas, en comparación con más de 4-5 horas para la fórmula de secuenciación estándar en MiSeq i100 Series (fórmula estándar).[4]

La fórmula turbo personalizada se evaluó utilizando el Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, que se dirige a más de 280 patógenos respiratorios, incluidos virus, bacterias y hongos, y marcadores de resistencia antimicrobiana (AMR, associated antimicrobial resistance) asociados. Gracias a la secuenciación en MiSeq i100 Series y al análisis con la aplicación DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus, el flujo de trabajo acelerado flexible y adaptable[4] (figura 1) permite la identificación de patógenos asociados a infecciones de las vías respiratorias en un día en entornos de investigación clínica. Con un rendimiento coherente con la fórmula estándar, el ahorro de tiempo logrado con la fórmula turbo no afecta a la precisión de la secuenciación.

Métodos

Preparación de muestras

El material de referencia utilizado fue una mezcla cualitativa compleja de partículas de virus purificadas y células bacterianas suministradas en un estado estabilizado y no infeccioso. NATtrol Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Control (ZeptoMetrix, n.º de catálogo NATRPC2.1-BIO) consta de dos mezclas de patógenos artificiales distintas: RP2.1 Control 1 (12 patógenos selectivos) y RP2.1 Control 2 (11 patógenos selectivos). RP2.1 Control 1 se utilizó con una dilución 1:10 en PBS 1× antes de la extracción con ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, n.º de catálogo R2002) utilizando el método de extracción de ADN/ARN en paralelo.

Preparación de librerías

La preparación de librerías y el enriquecimiento selectivo en hibridación de 3 unidades de plexado se llevaron a cabo con Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, n.º de catálogo 20040536) con Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel (RPIP) Kit (Illumina, n.º de catálogo 20047050).



Figura 1: Flujo de trabajo acelerado para la detección de patógenos respiratorios
La fórmula turbo personalizada en MiSeq i100 Series acelera la identificación de patógenos respiratorios basada en NGS.

Secuenciación

Las librerías preparadas se secuenciaron en MiSeq i100 Plus System (Illumina, n.º de catálogo 20115695) con una longitud de lectura de 1 × 101 pb utilizando la fórmula turbo personalizada y la fórmula estándar para MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (100 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20126567), MiSeq i100 Plus 50M Reagent Kit (100 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20141595) y MiSeq i100 Plus 100M Reagent Kit (100 ciclos) (Illumina, n.º de catálogo 20141598). Todos los experimentos se configuraron con la configuración predeterminada de lectura de índice primero.

Análisis de datos

Los archivos de secuenciación FASTQ demultiplexados se redujeron a grupos de 1 M con el kit de herramientas FASTQ y se analizaron con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus (v1.1.1) integrada en MiSeq i100 Series. Los resultados se utilizaron con el software en la nube DRAGEN Microbial Enrichment Plus para verificar la concordancia de los flujos de trabajo integrados.

Resultados

Menor duración del experimento con alta precisión y rendimiento

La fórmula turbo personalizada de MiSeq i100 ahorra aproximadamente un 40 % de tiempo durante la secuenciación para las versiones de 100 ciclos de los kits de reactivos 25M, 50M y 100M, en comparación con la fórmula estándar. Esta menor duración se consiguió gracias a un ahorro de tiempo en todos los aspectos de la fórmula de secuenciación por síntesis (SBS, sequencing by synthesis), incluidos los pasos de química, fluídica y adquisición de imágenes, con el objetivo de mantener una alta precisión y rendimiento. Para la fórmula turbo, la secuenciación se completó en aproximadamente 2,5 horas y aproximadamente 3 horas para los kits 25M y 100M, respectivamente (figura 2). El análisis integrado de DRAGEN Microbial Enrichment Plus de muestras del Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel se completa en menos de 30 minutos. El flujo de trabajo completo, incluidas las comprobaciones previas al experimento y el análisis integrado de DRAGEN Microbial Enrichment Plus para la fórmula turbo en lecturas de 100 pb individuales y con código de barras doble, finaliza en menos de tres horas para el kit 25M (figura 2).

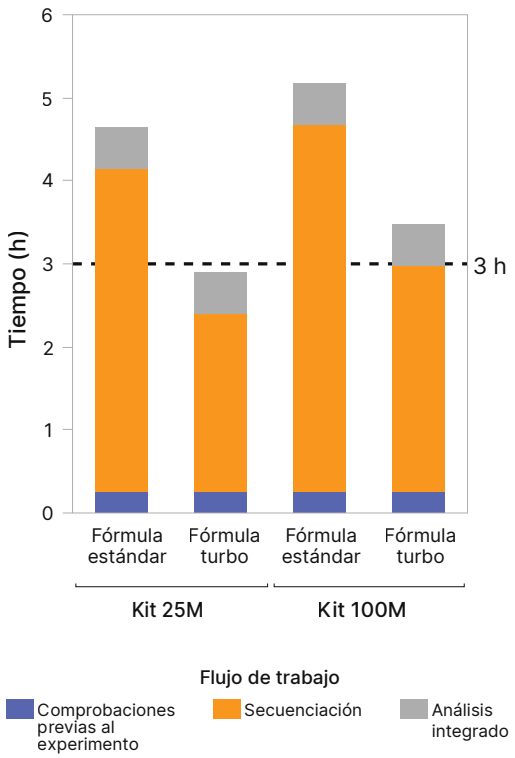


Figura 2: Flujo de trabajo de secuenciación más rápido con la fórmula turbo personalizada en MiSeq i100
Comparación de la duración del flujo de trabajo para la fórmula turbo en MiSeq i100 en relación con la fórmula estándar para los kits de 100 ciclos de celdas de flujo 25M y 100M con lecturas de 100 pb individuales y de índice doble en la configuración predeterminada de índice primero.

Las muestras de control procesadas con las fórmulas de secuenciación turbo y estándar mostraron una concordancia excelente de los criterios de medición principales. La calidad y el rendimiento se mantuvieron con la fórmula turbo (figura 3). A partir del análisis de DRAGEN Microbial Enrichment Plus, el porcentaje de lecturas filtradas tras el control de calidad muestra una alta concordancia entre la fórmula turbo y la fórmula estándar, lo que indica que se conserva una alta fidelidad de las lecturas para el análisis secundario (figura 4).

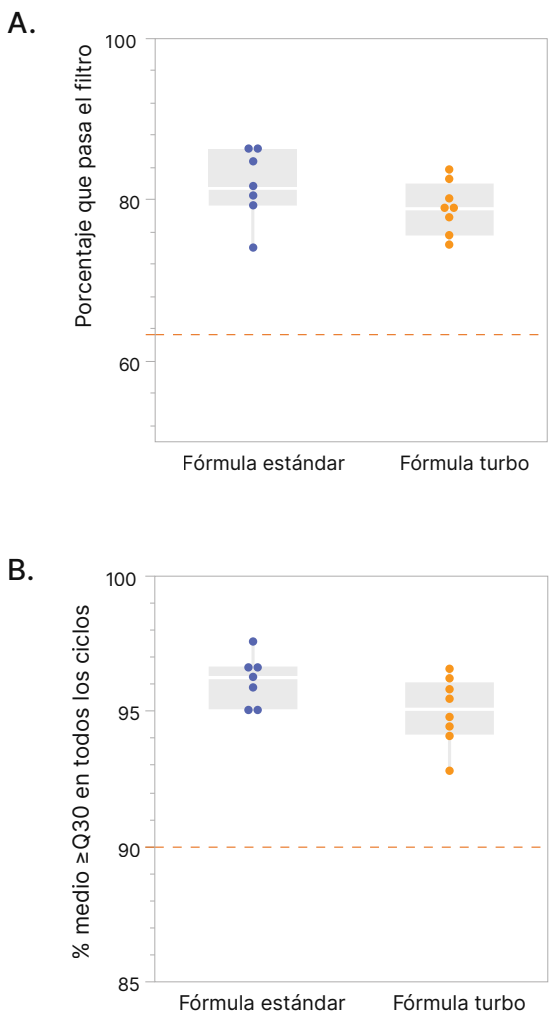


Figura 3: Concordancia de los criterios de medición principales entre las fórmulas turbo y estándar en MiSeq i100
Comparación de (A) porcentaje de lecturas que pasan el filtro y (B) porcentaje medio de lecturas ≥Q30 para las dos fórmulas de secuenciación, a partir de la suma de experimentos con los kits de reactivos de 100 ciclos 25M, 50M y 100M de MiSeq i100.

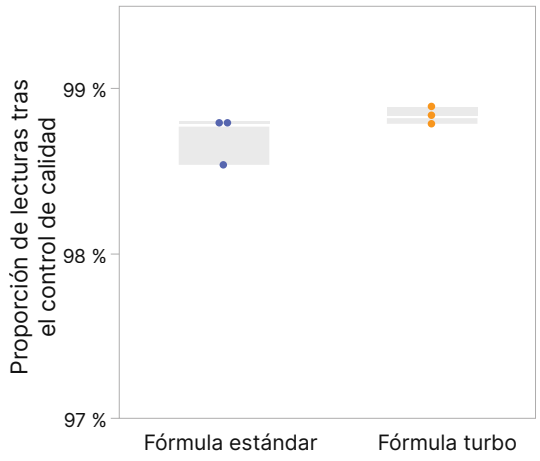


Figura 4: Lecturas de alta fidelidad con la fórmula turbo personalizada en MiSeq i100
Comparación de la proporción de resultados de lecturas posteriores al control de calidad de la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus para tres experimentos con cada una de las fórmulas turbo y estándar para kits de reactivos de 100 ciclos 25M.

Alto rendimiento analítico para la detección de patógenos respiratorios

La fórmula turbo personalizada logra un ahorro de tiempo significativo sin sacrificar el rendimiento del ensayo. Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit es selectivo de 11 de los 12 patógenos en RP2.1 Control 1 y todos se detectaron en los experimentos tanto con la fórmula turbo como con la fórmula estándar (tabla 1). El adenovirus de tipo 31 también se incluye en la mezcla RP2.1 Control 1, pero no es un objetivo en el Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit por lo que no se espera que se notifique.

Se evaluó la media de lecturas por kilobase por millón de lecturas filtradas tras el control de calidad (RPKM, reads per kilobase of targeted sequence per million) en las réplicas, según lo notificado por la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus, para cada virus y bacteria objetivo. La RPKM normaliza el recuento de lecturas objetivo entre patógenos y muestras teniendo en cuenta las diferencias en la longitud de la secuencia objetivo y la profundidad de secuenciación. La RPKM notificada por patógeno para RP2.1 Control 1 mostró una alta correlación entre los experimentos de secuenciación con la fórmula turbo y la fórmula estándar (figura 5).

Tabla 1: Resumen de la detección de microorganismos en los experimentos con las fórmulas turbo personalizada y estándar

ID de NATtrol RP2.1 Control 1 Panel	Nombre del patógeno notificado	Resumen de detección en tres experimentos	
		Fórmula estándar	Fórmula turbo
Adenovirus tipo 1	Adenovirus humano C	3/3	3/3
Adenovirus tipo 3	Adenovirus humano B	3/3	3/3
Adenovirus tipo 31[a]	(No incluido ni notificado)	–	–
Chlamydia pneumoniae CWL-029	*Chlamydia pneumoniae*	3/3	3/3
Gripe A 2009 H1N1 pdm A/NY/02/2009	Virus de la gripe A (H1N1)	3/3	3/3
Gripe A H3N2 A/Brisbane/10/07	Virus de la gripe A (H3N2)	3/3	3/3
Metapneumovirus B Peru6-2003	Metapneumovirus humano (MPVh)	3/3	3/3
Mycoplasma pneumoniae M129	*Mycoplasma pneumoniae*	3/3	3/3
Virus paragripal tipo 1	Virus paragripal humano 1 (HPIV-1)	3/3	3/3
Virus paragripal tipo 4	Virus paragripal humano 4 (HPIV-4)	3/3	3/3
Rinovirus 1A	Rinovirus humano A (HRV-A)	3/3	3/3
SARS-CoV-2 USA-WA 1/2020	SARS-CoV-2	3/3	3/3

a. El adenovirus de tipo 31 se incluye en la mezcla RP2.1 Control 1, pero no es un objetivo en el Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit y no se espera que se detecte.

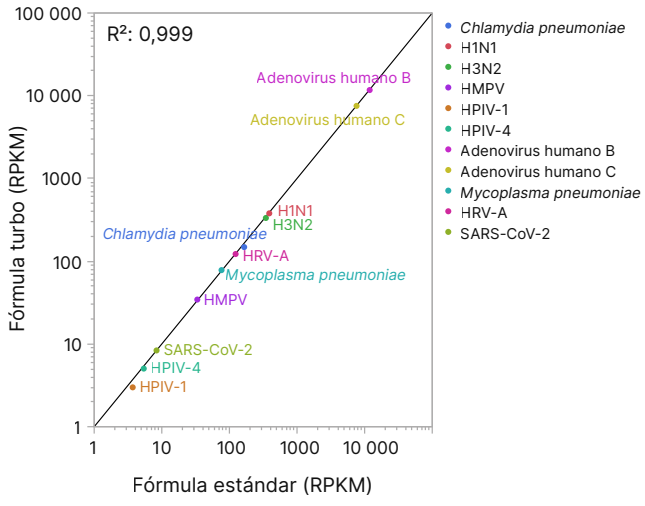


Figura 5: Alta correlación de la detección de patógenos con las fórmulas turbo y estándar en MiSeq i100
Correlación de RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas filtradas tras el control de calidad) de los 11 patógenos en NATtrol RP2.1 Control 1 que son un objetivo en el Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, promediada a partir de tres experimentos con cada una de las fórmulas turbo personalizada y estándar para los kits de reactivos de 100 ciclos 25M.

Resumen

Una fórmula turbo personalizada en MiSeq i100 Series permite una secuenciación acelerada para la identificación de patógenos respiratorios, lo que reduce la duración de la secuenciación en un 40 % al tiempo que mantiene un rendimiento de secuenciación de alta calidad. Los resultados de los controles de calidad de patógenos respiratorios fueron muy concordantes entre el flujo de trabajo habilitado para las fórmulas de secuenciación turbo y estándar en MiSeq i100.

Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina (techsupport@illumina.com) para acceder a las fórmulas turbo personalizadas para los kits de reactivos de 100 ciclos 25M, 50M y 100M de MiSeq i100 Series.

Más información →

MiSeq i100 Series

Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit

Bibliografía

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. Más sencillo y rápido. Para todos los laboratorios. Folleto de 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. Año de publicación: 2025. Fecha de consulta: 4 de marzo de 2026.

illumina®

1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-04204 ESP v1.0