Délai de réponse plus rapide pour l'identification des maladies infectieuses

Formule turbo personnalisée pour le séquençage des agents pathogènes respiratoires sur la série MiSeq[MC] i100

Couverture complète des virus respiratoires, des bactéries, des champignons et des gènes de résistance aux antimicrobiens

Formule de séquençage optimisée permettant des durées d'analyse plus courtes tout en maintenant une qualité et un rendement élevés

Flux de travail flexible et évolutif comprenant l'analyse intégrée des données

Introduction

L'identification précise et rapide des agents pathogènes respiratoires peut être difficile, en particulier lors d'infections mixtes ou de coinfections[1,2]. Le séquençage de nouvelle génération (SNG) fournit un moyen efficace de détecter les agents pathogènes respiratoires connus et émergents à partir de divers types d'échantillons, notamment ceux contenant plusieurs agents infectieux, dans un seul test[3]. Cette note technique met en évidence une formule de séquençage personnalisée (formule turbo) sur la série MiSeq i100 qui prend en charge un flux de travail accéléré pour l'identification des agents pathogènes respiratoires. La formule turbo de MiSeq i100 permet de réaliser des lectures uniques de 100 pb à double code-barres en 2,5 à 3 heures comparativement à plus de 4 à 5 heures pour la formule de séquençage standard sur la série MiSeq i100 (formule standard)[4].

La formule turbo personnalisée a été évaluée à l'aide du panel Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, qui cible plus de 280 agents pathogènes respiratoires, notamment les virus, les bactéries et les champignons, ainsi que les marqueurs de résistance aux antimicrobiens (RAM) associés. Grâce au séquençage sur la série MiSeq i100 et à l'analyse avec l'application DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus, le flux de travail accéléré, flexible et évolutif[4] (figure 1) permet l'identification en une journée des agents pathogènes associés aux infections des voies respiratoires dans les environnements de recherche clinique. Avec des performances identiques à la formule standard, les gains de temps réalisés avec la formule turbo n'affectent pas la précision du séquençage.

Méthodes

Préparation des échantillons

Le matériel de référence utilisé était un mélange complexe qualitatif de particules virales purifiées et de cellules bactériennes fournies dans un état stabilisé et non infectieux. Le NATtrol Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Control (ZeptoMetrix, référence n° NATRPC2.1-BIO) comprend deux mélanges d'agents pathogènes artificiels distincts : contrôle 1 du panel RP2.1 (12 agents pathogènes ciblés) et contrôle 2 du panel RP2.1 (11 agents pathogènes ciblés). Le contrôle 1 du panel RP2.1 a été utilisé à une dilution au 1:10 dans une solution saline dans un tampon phosphate (PBS, Phosphate-buffered Saline) 1× avant l'extraction à l'aide de la trousse ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, référence n° R2002) en utilisant la méthode d'extraction parallèle d'ADN/ARN.

Préparation des librairies

La préparation des librairies et l'enrichissement des cibles par hybridation à trois niveaux ont été effectués à l'aide d'Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, référence n° 20040536) avec la trousse Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel (RPIP) Kit (Illumina, référence n° 20047050).

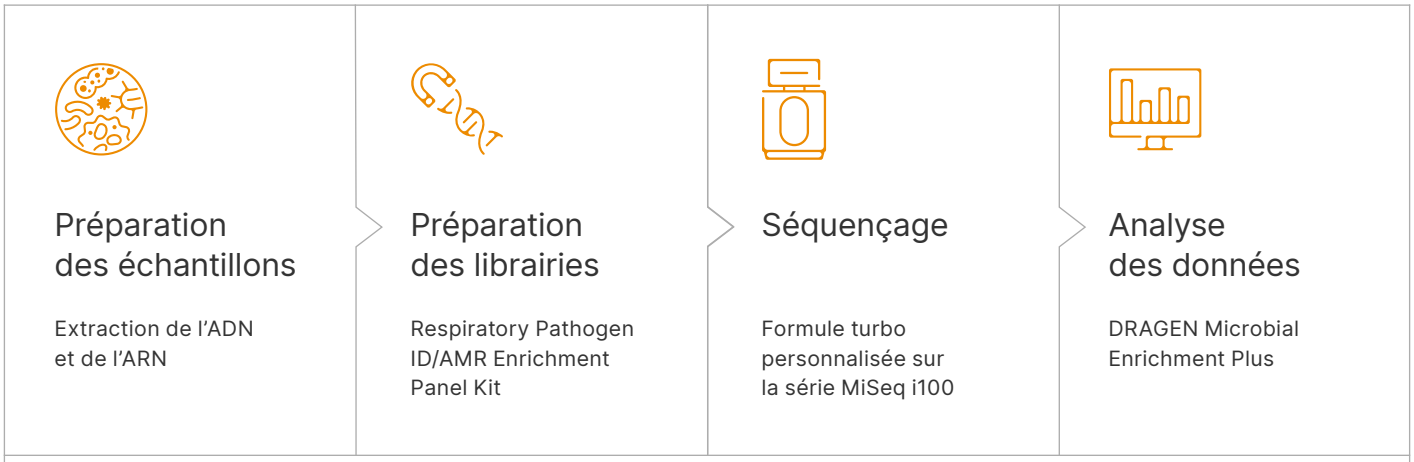


Figure 1 : Flux de travail accéléré pour la détection des agents pathogènes respiratoires
La formule turbo personnalisée de la série MiSeq i100 accélère l'identification basée sur le SNG des agents pathogènes respiratoires.

Séquençage

Les librairies préparées ont été séquencées sur MiSeq i100 Plus System (Illumina, référence nº 20115695) à une longueur de lecture de 1 × 101 pb à l'aide de la formule turbo personnalisée et de la formule standard de MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, référence nº 20126567), de MiSeq i100 Plus 50M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, référence nº 20141595) et de MiSeq i100 Plus 100M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, référence nº 20141598). Toutes les analyses ont été configurées avec, par défaut, la lecture des index en premier.

Analyse des données

Les fichiers de séquençage FASTQ démultiplexés ont été sous-échantillonnés en 1 million d'amplifiats à l'aide de l'application FASTQ Toolkit et analysés à l'aide de l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus (v1.1.1) intégrée à la série MiSeq i100. Les résultats ont été utilisés avec le logiciel infonuagique DRAGEN Microbial Enrichment Plus pour vérifier la concordance des flux de travail intégrés.

Résultats

Durées d'analyse plus courtes avec une précision et un rendement élevés

La formule turbo personnalisée de MiSeq i100 permet un gain de temps d'environ 40 % pendant le séquençage pour les versions à 100 cycles des trousses de réactifs 25M, 50M et 100M, par rapport à la formule standard. Des gains de temps ont été réalisés à tous les niveaux de la formule de séquençage par synthèse (SBS, Sequencing by Synthesis), notamment lors des étapes de chimie, de fluides et d'imagerie, dans le but de maintenir une précision et un rendement élevés. Pour la formule turbo, le séquençage s'est terminé en 2,5 heures environ et en 3 heures environ pour les trousses 25M et 100M, respectivement (figure 2). L'analyse avec l'application intégrée DRAGEN Microbial Enrichment Plus des échantillons du panel Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel a été effectuée en moins de 30 minutes. Le flux de travail complet, comprenant les vérifications préalables à l'analyse et l'analyse avec l'application intégrée DRAGEN Microbial Enrichment Plus pour la formule turbo et des lectures uniques de 100 pb à double code-barres, s'est terminé en moins de trois heures pour la trousse 25M (figure 2).

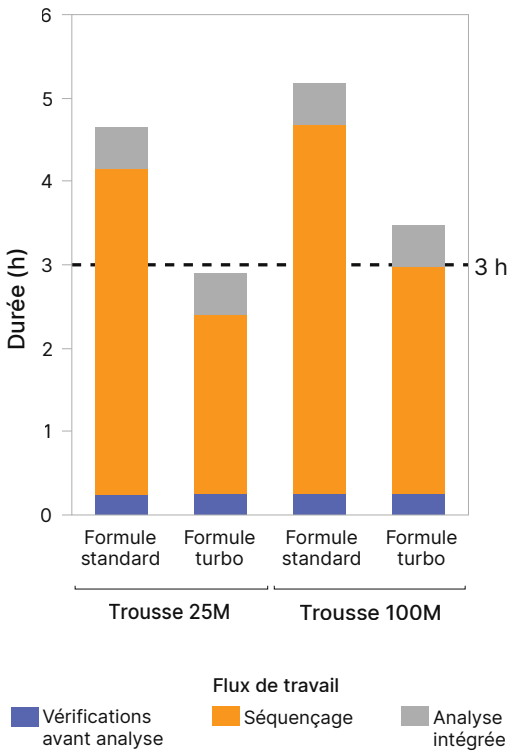


Figure 2 : Flux de travail de séquençage plus rapide grâce à la formule turbo personnalisée de MiSeq i100
Comparaison de la durée du flux de travail pour la formule turbo de MiSeq i100 par rapport à la formule standard pour les trousses de Flow Cell 25M et de Flow Cell 100M à 100 cycles avec des lectures uniques de 100 pb à index double dans la configuration par défaut donnant la priorité aux index.

Les échantillons de contrôle analysés avec les formules de séquençage turbo et standard ont montré une excellente concordance des indicateurs principaux. La qualité et le rendement ont été préservés avec la formule turbo (figure 3). D'après l'analyse avec DRAGEN Microbial Enrichment Plus, le pourcentage de lectures filtrées après le contrôle de la qualité présente une forte concordance entre la formule turbo et la formule standard, ce qui indique qu'une fidélité élevée des lectures est conservée pour l'analyse secondaire (figure 4).

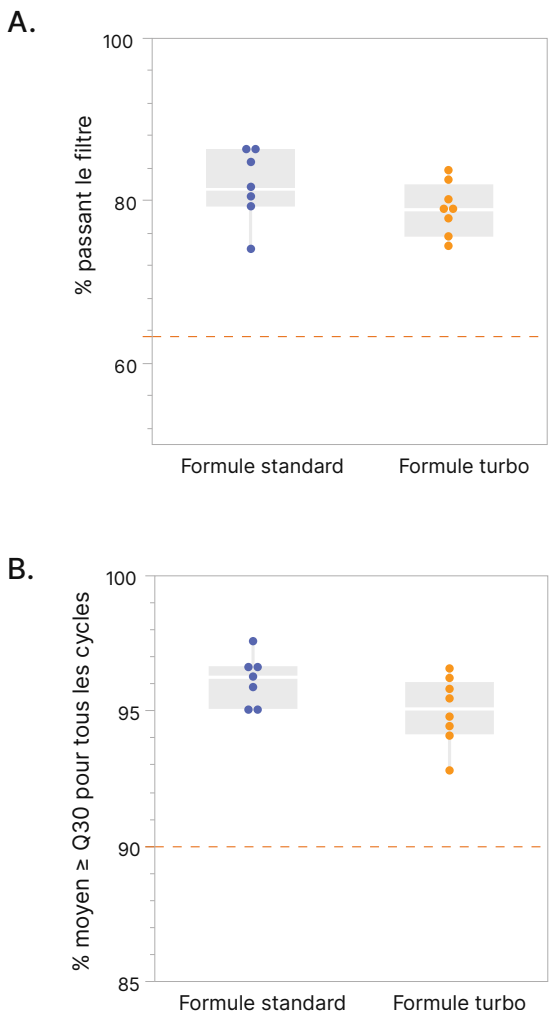


Figure 3 : Concordance des indicateurs principaux entre la formule turbo et la formule standard de MiSeq i100
Comparaison du (A) pourcentage de lectures passant le filtre et (B) du pourcentage moyen de lectures avec un score ≥ Q30 pour les deux formules de séquençage, agrégés à partir des analyses effectuées avec les trousses de réactifs 25M, 50M et 100M à 100 cycles de MiSeq i100.

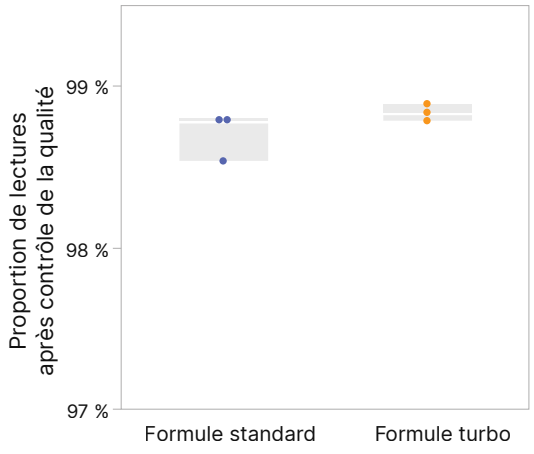


Figure 4 : Lectures à fidélité élevée avec la formule turbo personnalisée de MiSeq i100
Comparaison de la proportion de lectures après contrôle de la qualité générées par l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus pour trois analyses avec la formule turbo et avec la formule standard à l'aide des trousses de réactifs 25M à 100 cycles.

Haute performance analytique pour la détection des agents pathogènes respiratoires

La formule turbo personnalisée permet d'économiser beaucoup de temps sans sacrifier les performances du test. Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit cible 11 des 12 agents pathogènes dans le contrôle 1 du panel RP2.1 et tous ont été détectés à la fois dans les analyses effectuées avec la formule turbo et avec la formule standard (tableau 1). L'adénovirus de type 31 est également inclus dans le mélange du contrôle 1 du panel RP2.1, mais n'est pas ciblé par Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit et ne devrait pas être rapporté.

Les lectures moyennes par kilobase de la séquence ciblée par million de lectures filtrées selon la qualité (RPKM, Reads per Kilobase per Million reads) parmi les réplicats, telles que rapportées par l'application DRAGEN Microbial Enrichment Plus, ont été évaluées pour chaque virus et bactérie ciblés. Les RPKM normalisent le nombre de lectures ciblées entre les agents pathogènes et les échantillons en tenant compte des différences de longueur des séquences ciblées et de profondeur de séquençage. Les RPKM rapportées par agent pathogène dans le contrôle 1 du panel RP2.1 ont montré une corrélation élevée entre les analyses de séquençage effectuées avec la formule turbo et avec la formule standard (figure 5).

Tableau 1 : Résumé de la détection des organismes dans les analyses avec formule turbo personnalisée et formule standard

ID du NATtrol RP2.1 Control 1 Panel	Nom de l'agent pathogène rapporté	Résumé de la détection sur trois analyses	
		Formule standard	Formule turbo
Adénovirus de type 1	Adénovirus humain de l'espèce C	3/3	3/3
Adénovirus de type 3	Adénovirus humain de l'espèce B	3/3	3/3
Adénovirus de type 31[a]	(Non ciblé ou rapporté)	–	–
Chlamydia pneumoniae CWL-029	*Chlamydia pneumoniae*	3/3	3/3
Grippe A (H1N1) pdm09 A/NY/02/2009	Virus grippal A (H1N1)	3/3	3/3
Grippe A (H3N2) A/Brisbane/10/07	Virus grippal A (H3N2)	3/3	3/3
Métapneumovirus B Peru6-2003	Métapneumovirus humain (HMPV)	3/3	3/3
Mycoplasma pneumoniae M129	*Mycoplasma pneumoniae*	3/3	3/3
Parainfluenza de type 1	Virus parainfluenza humain 1 (HPIV-1)	3/3	3/3
Parainfluenza de type 4	Virus parainfluenza humain 4 (HPIV-4)	3/3	3/3
Rhinovirus 1A	Rhinovirus humain A (HRV-A)	3/3	3/3
SRAS-CoV-2 USA-WA 1/2020	SRAS-CoV-2	3/3	3/3

a. L'adénovirus de type 31 est inclus dans le mélange du contrôle 1 du panel RP2.1, mais n'est pas ciblé par Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit et ne devrait pas être détecté.

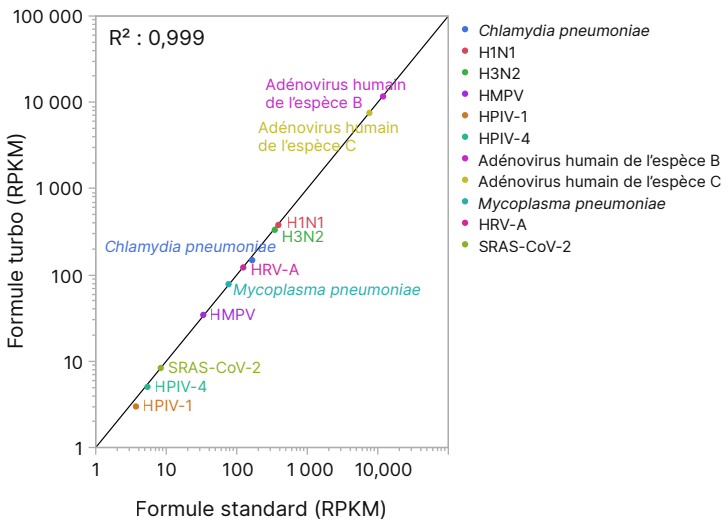


Figure 5 : Corrélation élevée de la détection des agents pathogènes avec la formule turbo et la formule standard de MiSeq i100
Corrélation des RPKM (lectures par kilobase de la séquence ciblée par million de lectures filtrées selon la qualité) des 11 agents pathogènes dans le contrôle 1 NATtrol du panel RP2.1 qui sont ciblés par le panel Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, calculée à partir de la moyenne de trois analyses avec la formule turbo personnalisée et avec la formule standard pour les trousses de réactifs 25M à 100 cycles.

Résumé

Une formule turbo personnalisée sur la série MiSeq i100 permet un séquençage accéléré pour l'identification des agents pathogènes respiratoires, réduisant ainsi la durée du séquençage de 40 % tout en maintenant des performances de séquençage de haute qualité. Les résultats des contrôles de qualité des agents pathogènes respiratoires étaient fortement concordants entre le flux de travail utilisant la formule turbo et celui utilisant la formule de séquençage standard de MiSeq i100.

Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina (techsupport@illumina.com) pour accéder aux formules turbo personnalisées pour les trousses de réactifs 25M, 50M et 100M à 100 cycles de la série MiSeq i100.

En savoir plus →

Série MiSeq i100

Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit

Références

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. MiSeq i100 Series brochure. illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/miseq-i100-brochure-m-gl-02245/miseq-i100-brochure-m-gl-02245.pdf. Publié en 2025. Consulté le 4 mars 2026.

illumina[MD]

Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 |
Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

M-GL-04204 FRA v1.0