Tempi di risposta più rapidi per l'identificazione delle malattie infettive

Ricetta turbo personalizzata per il sequenziamento dei patogeni respiratori su MiSeq™ i100 Series

Copertura completa di virus respiratori, batteri, funghi e geni di resistenza antimicrobica

Ricetta di sequenziamento ottimizzata che consente di ridurre la durata della corsa pur mantenendo elevati i livelli di qualità e resa

Flusso di lavoro flessibile e scalabile che include l'analisi integrata dei dati sullo strumento

Introduzione

L'identificazione accurata e tempestiva dei patogeni respiratori può essere complessa, in particolare per le infezioni miste o le coinfezioni.[1,2] Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) rappresenta una modalità efficace per il rilevamento con un unico saggio dei patogeni respiratori noti ed emergenti in diversi tipi di campioni, inclusi quelli con più agenti infettivi.[3] Questa nota tecnica illustra una ricetta di sequenziamento personalizzata (ricetta turbo) su MiSeq i100 Series che supporta un flusso di lavoro accelerato per l'identificazione dei patogeni respiratori. La ricetta turbo di MiSeq i100 consente di completare in 2,5-3 ore le letture unidirezionali con doppio codice a barre a 100 bp, a differenza della ricetta di sequenziamento standard di MiSeq i100 Series (ricetta standard) che richiede più di 4-5 ore.[4]

La ricetta turbo personalizzata è stata valutata con Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, che ha come target oltre 280 patogeni respiratori, inclusi virus, batteri e funghi, nonché i marcatori di resistenza antimicrobica (AMR, Antimicrobial Resistance) associati. Impiegando il sequenziamento su MiSeq i100 Series e l'analisi con l'app DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus, il flusso di lavoro accelerato, flessibile e scalabile[4] (Figura 1) consente l'identificazione dei patogeni associati alle infezioni del tratto respiratorio in un solo giorno nei contesti di ricerca clinica. Poiché le prestazioni sono equivalenti a quelle ottenute con la ricetta standard, il risparmio di tempo assicurato dalla ricetta turbo non influisce sull'accuratezza del sequenziamento.

Metodi

Preparazione dei campioni

Come materiale di riferimento è stata utilizzata una miscela qualitativamente complessa di particelle di virus purificate e cellule batteriche fornite in uno stato stabilizzato e non infettivo. NATtrol Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Control (ZeptoMetrix, n. di catalogo NATRPC2.1-BIO) è costituito da due distinte miscele di patogeni artificiali: RP2.1 Control 1 (12 patogeni target) ed RP2.1 Control 2 (11 patogeni target). RP2.1 Control 1 è stato utilizzato con diluizione di 1:10 in 1 × PBS prima dell'estrazione mediante ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Reseanch, n. di catalogo. R2002) e metodo di estrazione parallela del DNA/RNA.

Preparazione delle librerie

La preparazione delle librerie e l'arricchimento del target nell'ibridazione a 3 plex sono stati eseguiti con Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, n. di catalogo 20040536) e Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel (RPIP) Kit (Illumina, n. di catalogo. 20047050).



Figura 1: flusso di lavoro accelerato per il rilevamento dei patogeni respiratori
La ricetta turbo personalizzata su MiSeq i100 Series accelera l'identificazione basata su NGS dei patogeni respiratori.

Sequenziamento

Le librerie preparate sono state sequenziate su MiSeq i100 Plus System (Illumina, n. di catalogo 20115695) a una lunghezza di lettura di 1 × 101 bp utilizzando la ricetta turbo personalizzata e la ricetta standard per MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20126567), MiSeq i100 Plus 50M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20141595) e MiSeq i100 Plus 100M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n. di catalogo 20141598). Tutte le corse sono state impostate con la configurazione predefinita di lettura index-first.

Analisi dei dati

I file di sequenziamento FASTQ sottoposti a demultiplex sono stati sottocampionati a 1 milione di cluster utilizzando il toolkit FASTQ e analizzati con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus (v1.1.1) integrata in MiSeq i100 Series. I risultati sono stati utilizzati con il software cloud DRAGEN Microbial Enrichment Plus per verificare la concordanza dei flussi di lavoro integrati.

Risultati

Tempi di corsa più rapidi con accuratezza e resa elevate

Rispetto alla ricetta standard, la ricetta turbo personalizzata di MiSeq i100 consente di risparmiare circa il 40% del tempo di sequenziamento per le versioni da 100 cicli dei kit di reagenti 25M, 50M e 100M. Il risparmio di tempo è stato osservato in tutti gli aspetti della ricetta di sequenziamento mediante sintesi (SBS, Sequencing By Synthesis), incluse le fasi di chimica, fluidica e imaging, sempre nell'ottica del mantenimento di elevati livelli di accuratezza e resa. Per la ricetta turbo, il sequenziamento è stato completato in circa 2,5 ore e circa 3 ore con i kit 25M e 100M rispettivamente (Figura 2). L'analisi dei campioni di Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus integrata è stata completata in meno di 30 minuti. Impiegando la ricetta turbo, l'intero flusso di lavoro relativo alle letture unidirezionali con doppio codice a barre a 100 bp, inclusi i controlli pre-corsa e l'analisi mediante app DRAGEN Microbial Enrichment Plus integrata, viene completato in meno di 3 ore con il kit 25M (Figura 2).

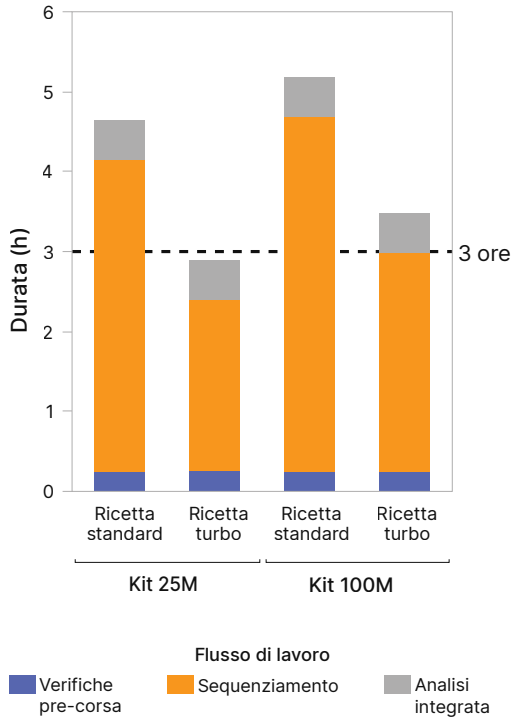


Figura 2: flusso di lavoro di sequenziamento più rapido con la ricetta turbo personalizzata di MiSeq i100
Confronto dei tempi del flusso di lavoro con ricetta turbo di MiSeq i100 rispetto alla ricetta standard per kit da 100 cicli con cella a flusso 25M e 100M e letture unidirezionali e a doppio indice a 100 bp nella configurazione index-first predefinita.

I campioni di controllo eseguiti con le ricette di sequenziamento turbo e standard hanno mostrato eccellente concordanza delle metriche primarie. L'uso della ricetta turbo non ha inciso su qualità e resa (Figura 3). Dall'analisi con DRAGEN Microbial Enrichment Plus, emerge una percentuale di letture filtrate post-qualità altamente concordante tra ricetta turbo e ricetta standard, a dimostrazione del mantenimento di un'elevata fedeltà delle letture per l'analisi secondaria (Figura 4).

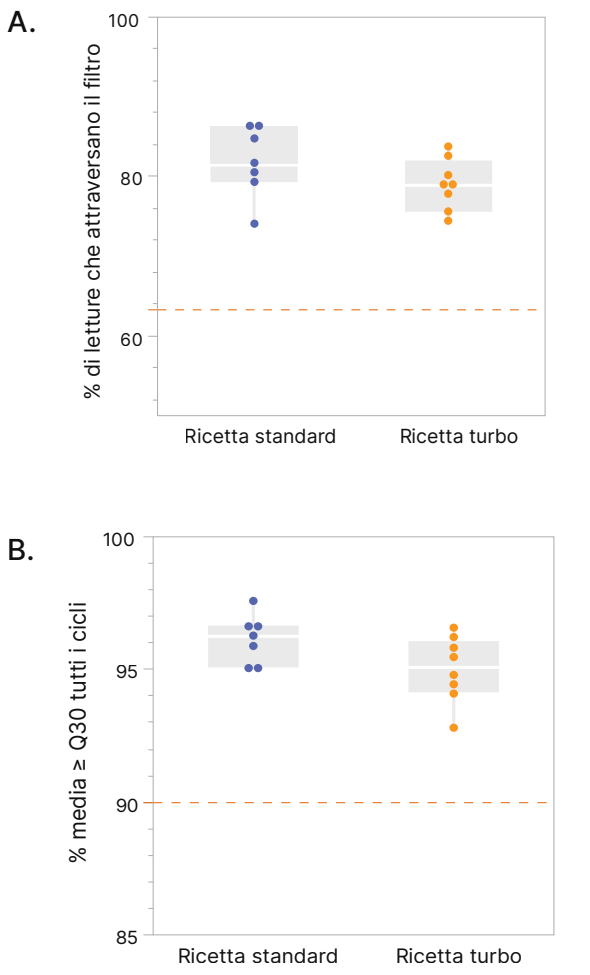


Figura 3: concordanza delle metriche primarie con ricetta turbo e ricetta standard di MiSeq i100
Confronto tra (A) la percentuale di letture che attraversano il filtro e (B) la percentuale media di letture con punteggio qualitativo pari o superiore a Q30 per le due ricette di sequenziamento, aggregate dalle corse con kit di reagenti da 100 cicli MiSeq i100 25M, 50M e 100M.

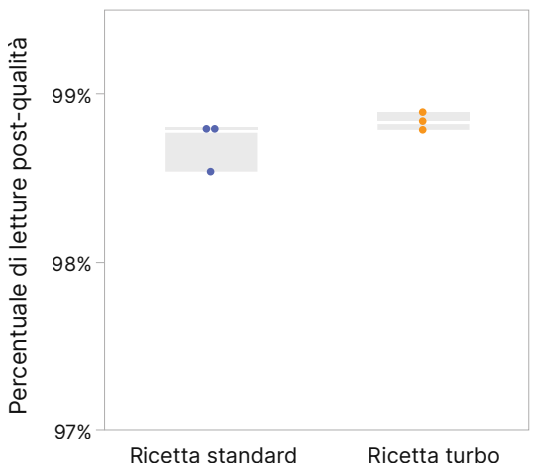


Figura 4: letture ad alta fedeltà con la ricetta turbo personalizzata di MiSeq i100
Confronto della percentuale di letture post-qualità rilevata dall'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus per tre corse della ricetta turbo e tre della ricetta standard con kit di reagenti 25M da 100 cicli.

Alte prestazioni analitiche per il rilevamento dei patogeni respiratori

La ricetta turbo personalizzata consente di risparmiare tempo in modo significativo senza sacrificare le prestazioni del saggio. Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit è progettato per rilevare 11 dei 12 patogeni inclusi in RP2.1 Control 1 e tutti sono stati individuati sia nella corsa con ricetta turbo sia in quella con ricetta standard (Tabella 1). La miscela RP2.1 Control 1 comprende anche l'adenovirus di tipo 31, il quale però non figura tra i target di Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit e pertanto non viene rilevato.

Per ciascun virus e batterio target è stata valutata la media di RPKM (letture per kilobase di sequenza target per milione di letture filtrate in base alla qualità) nei replicati, come riportato dall'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Il valore RPKM normalizza il conteggio delle letture target dei diversi patogeni e campioni tenendo conto delle differenze a livello di lunghezza della sequenza target e profondità di sequenziamento. Il valore RPKM per patogeno riportato con l'esecuzione di RP2.1 Control 1 ha evidenziato un'elevata correlazione tra la corsa di sequenziamento con ricetta turbo e quella con ricetta standard (Figura 5).

Tabella 1: riepilogo degli organismi rilevati nelle corse con ricetta turbo personalizzata e con ricetta standard

ID pannello NATtrol RP2.1 Control 1	Nome del patogeno rilevato	Riepilogo del rilevamento su tre corse	
		Ricetta standard	Ricetta turbo
Adenovirus type 1	Adenovirus umano C	3/3	3/3
Adenovirus type 3	Adenovirus umano B	3/3	3/3
Adenovirus type 31[a]	(non target o non rilevato)	–	–
Chlamydia pneumoniae CWL-029	*Chlamydia pneumoniae*	3/3	3/3
Influenza A 2009 H1N1 pdm A/NY/02/2009	Virus dell'influenza A (H1N1)	3/3	3/3
Influenza A H3N2 A/Brisbane/10/07	Virus dell'influenza A (H3N2)	3/3	3/3
Metapneumovirus B Peru6-2003	Metapneumovirus umano (HMPV)	3/3	3/3
Mycoplasma pneumoniae M129	*Mycoplasma pneumoniae*	3/3	3/3
Parainfluenza type 1	Virus parainfluenzale umano 1 (HPIV-1)	3/3	3/3
Parainfluenza type 4	Virus parainfluenzale umano 4 (HPIV-4)	3/3	3/3
Rhinovirus 1A	Rinovirus umano A (HRV-A)	3/3	3/3
SARS-CoV-2 USA-WA 1/2020	SARS-CoV-2	3/3	3/3

a. La miscela RP2.1 Control 1 comprende l'adenovirus di tipo 31, il quale però non figura tra i target di Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit e, pertanto, non viene riportato.

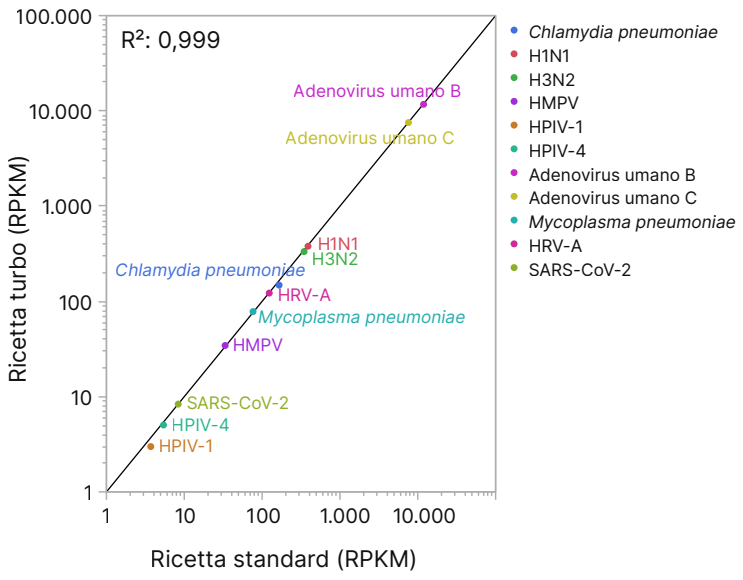


Figura 5: elevata correlazione del rilevamento dei patogeni con ricetta turbo e ricetta standard di MiSeq i100
Correlazione del valore RPKM (letture per kilobase di sequenza target per milione di letture filtrate in base alla qualità) degli 11 patogeni inclusi in NATtrol RP2.1 Control 1 e target di Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, calcolata come media di tre corse della ricetta turbo personalizzata e tre della ricetta standard per i kit di reagenti 25M da 100 cicli.

Riepilogo

Una ricetta turbo personalizzata su MiSeq i100 Series consente di accelerare il sequenziamento per l'identificazione dei patogeni respiratori, riducendone i tempi del 40% senza compromettere l'elevata qualità delle prestazioni. I controlli di qualità relativi ai patogeni respiratori hanno evidenziato elevata concordanza tra il flusso di lavoro con ricetta turbo e quello con ricetta di sequenziamento standard di MiSeq i100.

Per accedere alle ricette turbo personalizzate per i kit di reagenti da 100 cicli MiSeq i100 Series 25M, 50M e 100M, rivolgersi all'assistenza tecnica Illumina (techsupport@illumina.com).

Maggiori informazioni →

MiSeq i100 Series

Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit

Bibliografia

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. Brochure di 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. Pubblicata nel 2025. Consultata il 4 marzo 2026.

illumina®

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

© 2026 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-04204 ITA v1.0