Tempo mais rápido para responder à identificação de doenças infecciosas

Receita personalizada Turbo para sequenciamento de patógenos respiratórios no MiSeq™ i100 Series

Cobertura abrangente de vírus respiratórios, bactérias, fungos e genes de resistência antimicrobiana

Receita de sequenciamento otimizada que permite tempos de corrida mais curtos, mantendo alta qualidade e rendimento

O fluxo de trabalho flexível e escalável inclui análise integrada de dados

Introdução

A identificação precisa e oportuna de patógenos respiratórios pode ser desafiadora, particularmente para infecções mistas ou coinfecções.[1,2] O sequenciamento de última geração fornece uma maneira eficaz de detectar patógenos respiratórios conhecidos e emergentes de vários tipos de amostras, incluindo os que têm vários agentes infecciosos, em um único ensaio.[3] Esta nota técnica destaca uma receita de sequenciamento personalizada (receita turbo) no MiSeq i100 Series que é compatível com um fluxo de trabalho acelerado para identificação de patógenos respiratórios. A receita turbo do MiSeq i100 permite que leituras single-end de 100 bp com código de barras duplo sejam concluídas em 2,5 a 3 horas, em comparação com mais de 4 a 5 horas para a receita de sequenciamento padrão no MiSeq i100 Series (receita padrão).[4]

A receita personalizada turbo foi avaliada usando o Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, que tem como alvo mais de 280 patógenos respiratórios, incluindo vírus, bactérias e fungos, e marcadores de resistência antimicrobiana associada (AMR). Com o sequenciamento no MiSeq i100 Series e a análise com o aplicativo DRAGEN™ Microbial Enrichment Plus, o fluxo de trabalho acelerado flexível e escalável[4] (Figura 1) permite a identificação de patógenos associados a infecções do trato respiratório em um dia em ambientes de pesquisa clínica. Com desempenho consistente com a receita padrão, a economia de tempo obtida com a receita turbo não afeta a precisão do sequenciamento.

Métodos

Preparação da amostra

O material de referência usado foi uma mistura complexa qualitativa de partículas de vírus purificados e células bacterianas fornecidas em um estado estabilizado e não infeccioso. O NATtrol Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) Control (ZeptoMetrix, n.º do catálogo NATRPC2.1-BIO) consiste em duas misturas elaboradas distintas de patógenos: RP2.1 Control 1 (12 patógenos direcionados) e RP2.1 Control 2 (11 patógenos direcionados). O RP2.1 Control 1 foi usado em uma diluição de 1:10 em 1 × PBS antes da extração usando o ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, n.º do catálogo R2002) com o método de extração paralela de DNA/RNA.

Preparação da biblioteca

A preparação da biblioteca e o enriquecimento do alvo na hibridização 3-plex foram realizados usando o kit Illumina RNA Prep with Enrichment (Illumina, n.º do catálogo 20040536) com o Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel (RPIP) Kit (Illumina, n.º do catálogo 20047050).



Figura 1: Fluxo de trabalho acelerado para detecção de patógenos respiratórios
A receita personalizada turbo no MiSeq i100 Series acelera a identificação de patógenos respiratórios com base no NGS.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no MiSeq i100 Plus System (Illumina, n.º do catálogo 20115695) com duração da leitura de 1 × 101 bp usando a receita personalizada turbo e a receita padrão para o MiSeq i100 Series 25M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n.º do catálogo 20126567), o MiSeq i100 Plus 50M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n.º do catálogo 20141595) e o MiSeq i100 Plus 100M Reagent Kit (100 cycles) (Illumina, n.º do catálogo 20141598). Todas as corridas foram configuradas com a configuração padrão de primeira leitura de índice.

Análise de dados

Os arquivos de sequenciamento FASTQ demultiplexados tiveram a amostra reduzida para 1M de clusters usando o kit de ferramentas FASTQ e foram analisados usando o aplicativo DRAGEN Microbial Enrichment Plus (v1.1.1) integrado ao MiSeq i100 Series. Os resultados foram usados com o software na nuvem DRAGEN Microbial Enrichment Plus para verificar a concordância dos fluxos de trabalho integrados.

Resultados

Tempos de corrida mais rápidos com alta precisão e rendimento

A receita personalizada turbo do MiSeq i100 obtém uma economia de tempo de ~40% durante o sequenciamento para versões de 100 ciclos dos kits de reagentes de 25M, 50M e 100M, em relação à receita padrão. A economia de tempo foi obtida em todos os aspectos da receita de sequenciamento por síntese (SBS, sequencing by synthesis), incluindo etapas químicas, fluídicas e de imagem, com o objetivo de manter alta precisão e rendimento. Na receita turbo, o sequenciamento foi concluído em ~2,5 horas e ~3 horas para os kits de 25M e 100M, respectivamente (Figura 2). A análise integrada do DRAGEN Microbial Enrichment Plus de amostras do Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel foi concluída em menos de 30 minutos. O fluxo de trabalho completo, incluindo verificações pré-corrida e uma análise integrada com o DRAGEN Microbial Enrichment Plus para a receita turbo em leituras single-end de 100 bp com código de barras duplo, é concluído em menos de três horas para o kit de 25M (Figura 2).

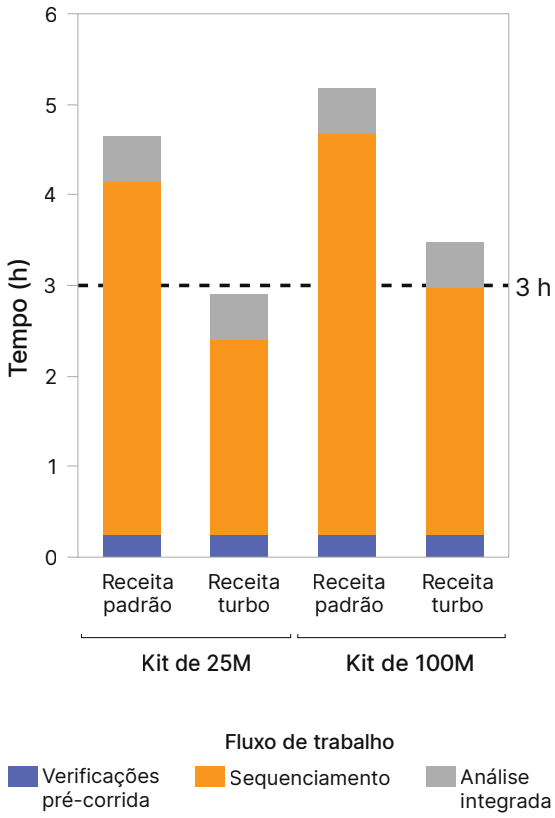


Figura 2: Fluxo de trabalho de sequenciamento mais rápido com a receita personalizada turbo do MiSeq i100

Comparação dos tempos de fluxo de trabalho da receita turbo do MiSeq i100 com relação à receita padrão em kits de 100 ciclos de lâminas de fluxo de 25M e de lâminas de fluxo de 100M com leituras single-end de 100 bp de índice duplo na configuração padrão index-first.

As amostras de controle executadas com as receitas de sequenciamento turbo e padrão mostraram excelente concordância das métricas primárias. A qualidade e o rendimento foram mantidos com a receita turbo. (Figura 3). Com base na análise do DRAGEN Microbial Enrichment Plus, a porcentagem de leituras filtradas pós-qualidade exibe alta concordância entre a receita turbo e a receita padrão, indicando que uma alta fidelidade de leituras é retida para análise secundária (Figura 4).

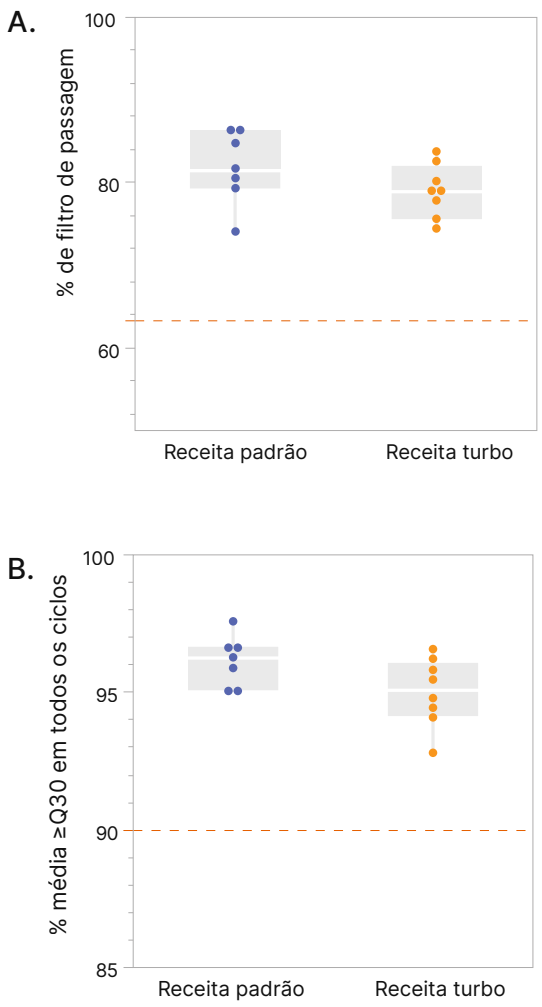


Figura 3: Concordância das métricas primárias entre as receitas turbo e padrão do MiSeq i100
Comparação de (A) porcentagem de leituras que passam pelo filtro e (B) porcentagem média de leituras ≥Q30 para as duas receitas de sequenciamento, agregadas de corridas com kits de reagentes de 100 ciclos MiSeq i100 25M, 50M e 100M.

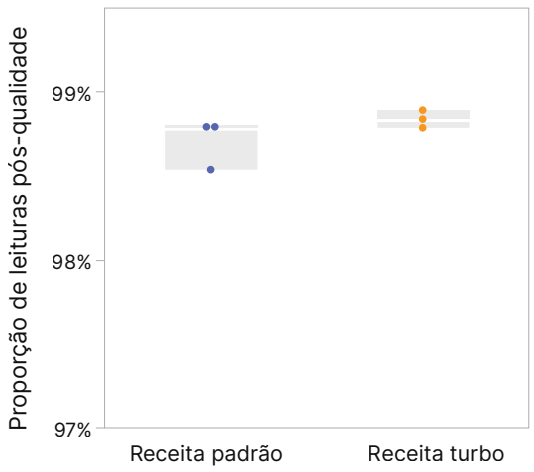


Figura 4: Leituras de alta fidelidade com a receita personalizada turbo do MiSeq i100
Comparação da proporção de resultados de leituras de pós-qualidade do aplicativo DRAGEN Microbial Enrichment Plus em três corridas, cada uma delas das receitas turbo e padrão em kits de reagentes de 25M 100 ciclos.

Alto desempenho analítico para detecção de patógenos respiratórios

A receita personalizada turbo atinge uma economia significativa de tempo sem sacrificar o desempenho do ensaio. O Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit tem como alvo 11 dos 12 patógenos no RP2.1 Control 1 e todos foram detectados nas corridas com receita turbo e receita padrão (Tabela 1). O adenovírus tipo 31 também está incluído na mistura do RP2.1 Control 1, mas não é direcionado pelo Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit e não é esperado que seja relatado.

O RPKM (reads per kilobase of targeted sequence per million quality-filtered reads, leituras por quilobase de sequências direcionadas por milhão de leituras filtradas por qualidade) médio em réplicas, conforme informado pelo aplicativo DRAGEN Microbial Enrichment Plus, foi avaliado para cada vírus e bactéria direcionado. O RPKM normaliza a contagem de leituras direcionadas entre patógenos e amostras ao considerar as diferenças no comprimento da sequência direcionada e na profundidade do sequenciamento. O RPKM relatado por patógeno dentro do RP2.1 Control 1 mostrou alta correlação entre a receita turbo e as corridas de sequenciamento da receita padrão (Figura 5).

Tabela 1: Resumo da detecção de organismos nas corridas da receita personalizada turbo e da receita padrão

ID do NATtrol RP2.1 Control 1 Panel	Nome do patógeno relatado	Resumo da detecção em três corridas	
		Receita padrão	Receita turbo
Adenovírus tipo 1	Adenovírus humano C	3/3	3/3
Adenovírus tipo 3	Adenovírus humano B	3/3	3/3
Adenovírus tipo 31[a]	(não direcionado nem relatado)	–	–
Chlamydia pneumoniae CWL-029	*Chlamydia pneumoniae*	3/3	3/3
Influenza A 2009 H1N1 pdm A/NY/02/2009	Vírus da influenza A (H1N1)	3/3	3/3
Influenza A H3N2 A/Brisbane/10/07	Vírus da influenza A (H3N2)	3/3	3/3
Metapneumovírus B Peru6-2003	Metapneumovírus humano (HMPV)	3/3	3/3
Mycoplasma pneumoniae M129	*Mycoplasma pneumoniae*	3/3	3/3
Parainfluenza tipo 1	Vírus da parainfluenza humana 1 (HPIV-1)	3/3	3/3
Parainfluenza tipo 4	Vírus da parainfluenza humana 4 (HPIV-4)	3/3	3/3
Rinovírus 1A	Rinovírus humano A (HRV-A)	3/3	3/3
SARS-CoV-2 USA-WA 1/2020	SARS-CoV-2	3/3	3/3

a. O adenovírus tipo 31 está incluído na mistura do RP2.1 Control 1, mas não é direcionado pelo Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit e não é esperado que seja detectado.

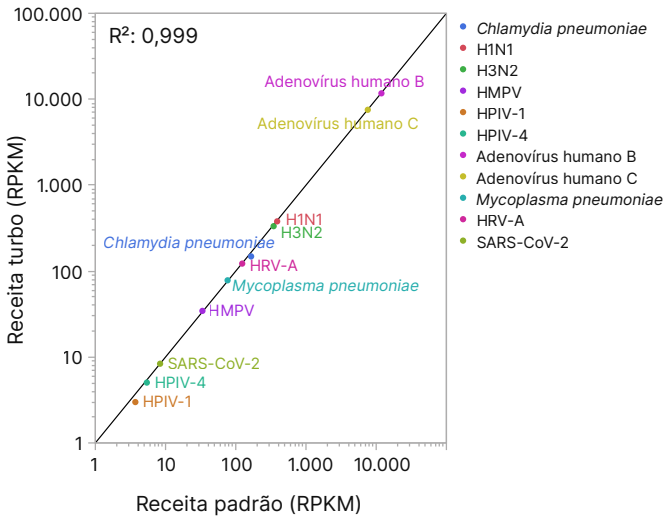


Figura 5: Alta correlação da detecção de patógenos com a receita turbo e a receita padrão do MiSeq i100
Correlação do RPKM dos 11 patógenos no NATtrol RP2.1 Control 1 que são direcionados pelo Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel, calculada com base em três corridas, cada uma delas das receitas personalizadas turbo e padrão em kits de reagentes de 25M 100 ciclos.

Resumo

Uma receita personalizada turbo no MiSeq i100 Series permite sequenciamento acelerado para identificação de patógenos respiratórios, reduzindo o tempo de sequenciamento em 40%, mantendo o desempenho de sequenciamento de alta qualidade. Os resultados dos controles de qualidade dos patógenos respiratórios estavam altamente concordantes entre o fluxo de trabalho habilitado para receita turbo e a receita padrão do sequenciamento do MiSeq i100.

Entre em contato com o suporte técnico da Illumina (techsupport@illumina.com) para acessar as receitas personalizadas turbo para os kits de reagentes de 100 ciclos MiSeq i100 Series 25M, 50M e 100M.

Saiba mais →

MiSeq i100 Series

Respiratory Pathogen ID/AMR Enrichment Panel Kit

Referências

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. Publicado em 2025. Acessado em 4 de março de 2026.

illumina®

+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2026 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-04204 PTB v1.0