

Pan-Coronavirus Panel

Genomische Surveillance
bekannter und neuartiger
Coronaviren in Tierreservoirs

- Zur Verwendung mit der Illumina RNA Prep with Enrichment-Bibliotheksvorbereitung sowie NGS-Systemen und Analysesoftware von Illumina
- Flexible Stammsequenzierung mit Hybrid-Capture-Target-Anreicherung
- Umfassende genomischen Coverage bekannter und neuartiger Coronaviren

Einleitung

Die weltweite COVID-19-Pandemie nahm 2019 ihren Anfang.¹ Dies war der vierte und tödlichste Ausbruch eines Coronavirus in den vergangenen 20 Jahren. Die vorherigen Ausbrüche waren zwei separate SARS-Epidemien (Severe Acute Respiratory Syndrome, schweres akutes respiratorisches Syndrom) in den Jahren 2002 und 2003 sowie der MERS-Ausbruch (Middle East Respiratory Syndrome, nahöstliches Atemwegssyndrom) im Jahr 2012. Man geht davon aus, dass es in Zukunft zu weiteren Coronavirus-Ausbrüchen infolge von Zoonosen und den damit verbundenen Krisen im öffentlichen Gesundheitswesen kommen wird.^{2,3} Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer genomischen Surveillance zur Bestimmung und Überwachung von Coronaviren in tierischen Wirten. Diese wird Wissenschaftler und Beschäftigte im Bereich der öffentlichen Gesundheit dabei unterstützen, die Entwicklung und Pathogenität von Coronaviren besser zu verstehen, sodass Pandemien in Zukunft möglichst verhindert werden können.

Illumina bietet zu diesem Zweck das Pan-Coronavirus Panel an. Das Pan-Coronavirus Panel ermöglicht in Kombination mit Illumina RNA Prep with Enrichment den Nachweis und die Sequenzierung von 225 bekannten humanen und tierischen Coronaviren sowie eng verwandten neuartigen Coronaviren, die für Menschen möglicherweise infektiös werden können.

Gezielter, flexibler Panel-Inhalt

Der Inhalt des Pan-Coronavirus Panel umfasst Hybrid-Capture-Oligos, die über Referenzgenome mehrerer Coronavirus-Gattungen (Tabelle 1) sowie verschiedene bekannte Tierwirte (Tabelle 2) verteilt sind. Die gezielte Anreicherung eignet sich zum Nachweis von Mutationen und Varianten im gesamten Virengenom, was die Sequenzierung bekannter und neuartiger Coronavirus-Stämme sowie den Nachweis der Rekombination zwischen Stämmen ermöglicht.

Tabelle 1: Im Panel enthalte Coronavirus-Gattungen

Virusgenom	Anzahl der Genome
Alphacoronavirus	69
Bafinivirus	1
Betacoronavirus	59
Deltacoronavirus	13
Gammacoronavirus	61
Nicht klassifizierte Coronavirus-Familien	22
Insgesamt	225

Tabelle 2: Im Panel enthaltene Coronavirus-Genome mit bekannter Wirtsassoziation

Spezies	Anzahl der Genome
Fledermaus	64
Ratte	32
Nerz, Pangolin, Maus, Schwein, Schlange	28
Vogel	25
Kuh, Kamel, Ziege, Pferd	11
Delfin, Wal, Fisch	9
Mensch	7
Hund	7
Katze, Frettchen	6
Igel	2

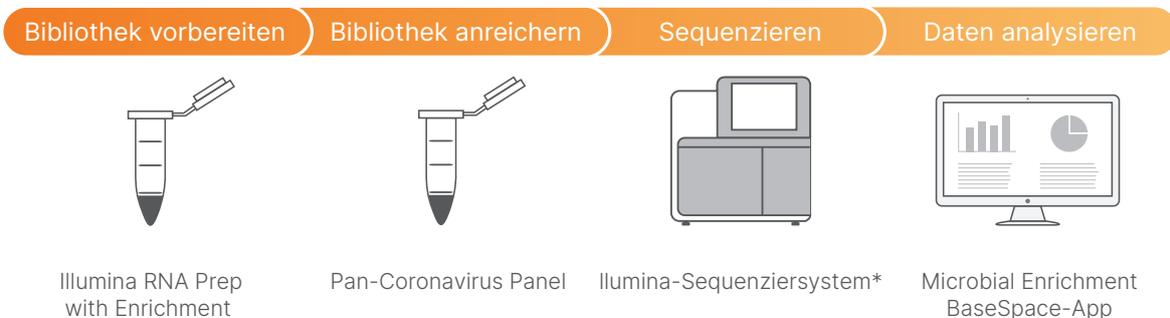


Abbildung 1: Workflow für das Varianten-Calling: Das Pan-Coronavirus Panel ist Bestandteil eines integrierten Workflows, der die Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung und die vereinfachte Datenanalyse in BaseSpace Sequence Hub umfasst.

* Die Sequenzierung kann auf den Systemen Illumina MiniSeq, MiSeq, NextSeq 550, NextSeq 1000 und NextSeq 2000 erfolgen.

Bestandteil eines integrierten Workflows

Das Pan-Coronavirus Panel ist Bestandteil einer integrierten Lösung zur Sequenzierung von Viren (Abbildung 1). Bibliotheken werden mit Illumina RNA Prep with Enrichment und Illumina DNA/RNA UD Indexes vorbereitet. Nach der Anreicherung mit dem Pan-Coronavirus Panel werden die Bibliotheken auf einem NGS-System (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) von Illumina sequenziert. Mit einer empfohlenen Read-Länge von 2 × 150 bp und einer Tiefe von 500.000 bis 1 Mio. Reads ist das Panel ideal für Tischsysteme geeignet, darunter das MiniSeq™, das MiSeq™, das NextSeq™ 550, das NextSeq 1000 und das NextSeq 2000. Die Analyse per Schaltflächen kann mit der DRAGEN™ Microbial Enrichment App erfolgen, die in BaseSpace™ Sequence Hub kostenlos zur Verfügung steht.

Höhere Genom-Coverage dank der Pan-Coronavirus Panel-Anreicherung

Um die herausragende Leistung des Pan-Coronavirus Panel zu demonstrieren, wurden fünf synthetische Virusproben (Tabelle 3) per Spike-in in Universal Human Reference RNA (Agilent Technologies, Katalog-Nr. 74000) transferiert. Die Bibliotheken wurden in dreifacher Ausführung mit Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (Illumina, Katalog-Nr. 20040537) und IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (Illumina, Katalog-Nr. 20027214) vorbereitet.* Die Anreicherung erfolgte mit dem Pan-Coronavirus Panel, indem Replikate in 3-plex-Hybridisierungsreaktionen gepoolt wurden. Angereicherte Bibliotheken und nicht angereicherte Kontrollbibliotheken wurden auf dem NextSeq 550 System mit einer Read-Länge von 2 × 150 bp sequenziert.

Die Anreicherung mit dem Pan-Coronavirus Panel erhöhte die Anzahl der Coronafamilien-Reads bei allen getesteten Bibliotheken im Vergleich zu nicht angereicherten Kontrollen um das mehr als 100-Fache (Abbildung 2). Die Anreicherung mit dem Panel ergab zudem eine herausragende Virengenom-Coverage (Abbildung 3A). Obwohl eine Read-Länge von 2 × 74 bp für bestimmte Vireng Genome eine ausreichende Coverage bietet, ist bei einer Read-Länge von 2 × 150 bp die Coverage bei komplexeren Genomen überlegen. Illumina empfiehlt die größere Read-Länge von 2 × 150 bp, da sich so bei den meisten Vireng Genomen optimale Ergebnisse erzielen lassen (Abbildung 3B). Diese Kombination aus größerer Read-Länge und höherer Sequenzierungstiefe verbessert bei bestimmten Coronavirus-Stämmen die Coverage.

* Katalog-Nr. 20027214 ist veraltet und wurde durch Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples), Katalog-Nr. 20091656 ersetzt.

Tabelle 3: Coronaviren-Kontrollproben zur Validierung

Probe	Gattung
SARS-CoV-2 (Twist Bioscience, Katalog-Nr. 102019)	Betacoronavirus (2b)
SARS-CoV-2 (BA.2) (Twist Bioscience, Katalog-Nr. 105346)	Betacoronavirus (2b)
HCoV-OC43 (Twist Bioscience, Katalog-Nr. 103013)	Betacoronavirus (2a)
HCoV-229E (Twist Bioscience, Katalog-Nr. 103011)	Alphacoronavirus (1b)
HCoV-NL63 (Twist Bioscience, Katalog-Nr. 103012)	Alphacoronavirus (1b)

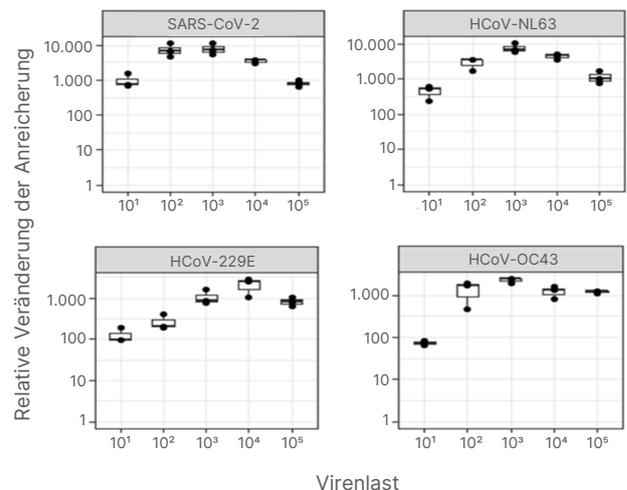


Abbildung 2: Anreicherung von Coronafamilien-Reads: Mit dem Pan-Coronavirus Panel wurden die Coronafamilien-Reads in allen Bibliotheken erfolgreich angereichert, die mit unterschiedlichen Virenlasten getestet wurden. Die relative Veränderung der Anreicherung wurde als das Verhältnis der Coronafamilien-Reads in angereicherten/nicht angereicherten Bibliotheken berechnet. Die Daten wurden einem Downsampling auf 1 Mio. Cluster unterzogen und auf 74 bp getrimmt. Die Anreicherung fällt bei höheren Virustitern geringer aus, da nicht angereicherte Bibliotheken bei hohen Virustitern eine bessere Leistung zeigen. Die Leistung bleibt jedoch auch bei Anreicherung hoch.

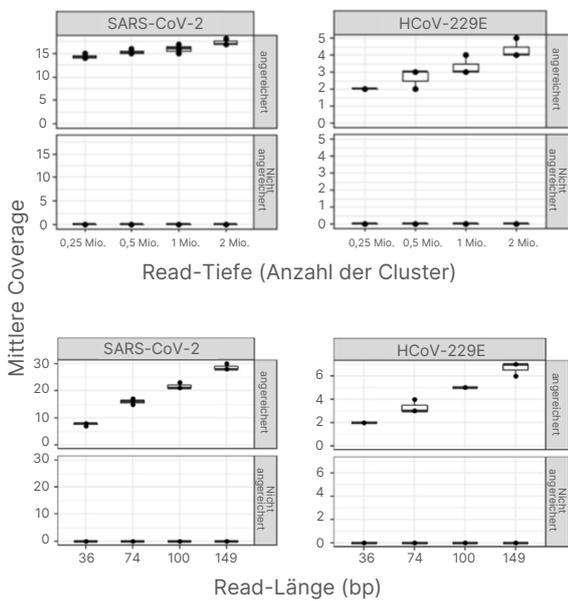


Abbildung 3: Verbesserte Coverage des Coronavirus-Genoms: Mittlere Coverage synthetischer RNA-Viruskontrollproben (SARS-CoV-2 und HCoV-229E) in 10 ng UHR nach Anreicherung mit dem Pan-Coronavirus Panel. Eine höhere Read-Tiefe (oben) und eine größere Read-Länge (unten) ergaben eine verbesserte Genom-Coverage. Die Read-Längen wurden auf 36, 74, 100 und 149 bp getrimmt.

Sequenzierung von nicht im Panel enthaltenen Stämmen

Das Panel wurde vor dem Auftreten der Omikron-BA.2-Variante von SARS-CoV-2 zusammengestellt. Die Anreicherung und Sequenzierung ergaben beim Omikron-BA.2-Stamm jedoch eine umfassende genomische Coverage (Abbildung 4). Damit wird deutlich, dass das Pan-Coronavirus Panel zur Sequenzierung neuartiger Coronavirus-Stämme geeignet ist, die nicht im Panel enthalten sind.

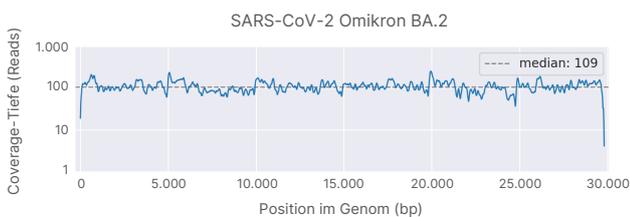


Abbildung 4: Umfassende Genom-Coverage beim Omikron-BA.2-Stamm: Die Anreicherung mit dem Pan-Coronavirus Panel ergab bei der Variante Omikron BA.2 SARS-CoV-2 eine nahezu 100%ige Coverage.

Zusammenfassung

Die COVID-19-Pandemie und frühere Coronavirus-Ausbrüche verdeutlichen die Notwendigkeit einer genomischen Surveillance zur Bestimmung und Überwachung von Coronaviren in tierischen Wirten. Derartige Bemühungen können dazu beitragen, zukünftige Pandemien zu verhindern. Das Pan-Coronavirus Panel ist Bestandteil einer integrierten Lösung, die Illumina RNA Prep with Enrichment, ein NGS-Tischsystem und die Analyse per Schaltflächen in BaseSpace Sequence Hub umfasst. Die Lösung ermöglicht die Sequenzierung bekannter und neuartiger Coronavirus-Stämme mit umfassender Genom-Coverage bei relativ geringen Sequenzierungstiefen – auch wenn die Virenlast niedrig und der Wirtsanteil hoch sind. Dank der Flexibilität des Panels können auch neuartige Stämme, die nicht im ursprünglichen Design enthalten waren, mit signifikanter Coverage sequenziert werden. Das Pan-Coronavirus Panel ist ein wichtiges Instrument im Kampf gegen zukünftige Virusausbrüche.

Weitere Informationen

[Pan-Coronavirus Panel](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment](#)

[Illumina RNA Prep with Enrichment – Protokollcheckliste](#)

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Pan-Coronavirus Panel (96 reactions)	20088155
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples)	20040537
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) 20091654	20027213
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) 20091656	20027214
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) 20091658	20042666
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 indexes, 96 samples) 20091660	20042667

Quellen

1. World Health Organization. [WHO Director-General's statement on IHR Emergency Committee on Novel Coronavirus \(2019-nCoV\)](#). Veröffentlicht am 30. Januar 2020. Aufgerufen am 9. September 2022.
2. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. [A Centenary Tale of Two Pandemics: The 1918 Influenza Pandemic and COVID-19, Part II](#). *Am J Public Health*. 2021;111(7):1267-1272. doi: 10.2105/AJPH.2021.306326.
3. Rubin R. [The Search for a Single Vaccine Against Coronaviruses Yet to Come](#). *JAMA*. 2021;326(2):118-120. doi: 10.1001/jama.2021.9477.



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

© 2023 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-01239 DEU v2.0