

Viral Surveillance Panel

Optimierte Sequenzierung des Genoms hochansteckender Viren auf Basis von Hybrid-Capture-Anreicherung

- Coverage von 66 Viren, die als schwerwiegende Risiken für die öffentliche Gesundheit eingestuft werden
- Gezielte Anreicherung von viralen RNA- und DNA-Pathogenen
- Geeignet für zahlreiche Arten von Wirts- und Umweltproben

illumina[®]

Überwachung von Viren mit hohem Risiko für die öffentliche Gesundheit

Der Ausbruch von SARS-CoV-2 im Jahr 2019 und der Ausbruch des Affenpockenvirus im Jahr 2022 haben deutlich gemacht, wie wichtig ein Pathogen-Frühwarnsystem und geeignete Instrumente zur Überwachung und Evaluierung von Krankheitsausbrüchen sind. Die Sequenzierung der nächsten Generation (NGS, Next-Generation Sequencing) ist ein wirksames Verfahren für das Proben-Screening und den Virennachweis, bei dem der Infektionserreger nicht bereits vorab bekannt sein muss. NGS liefert umfassende Informationen für wichtige Anwendungen zur Bestimmung und Überwachung, darunter:

- Nachsequenzierung bekannter Positivproben während Ausbrüchen
- Bestimmung von Infektionsquellen und Übertragungswegen
- Überwachung von viraler Evolution und antiviraler Resistenz

Das Viral Surveillance Panel ermöglicht den NGS-Nachweis von 66 Virusgenomen, einschließlich Viren, die die Weltgesundheitsorganisation (WHO) als bedeutende Risiken für die öffentliche Gesundheit einstuft ([Tabelle 1](#)).¹ Beim Panel kommt ein Hybrid-Capture-Workflow zur Target-Anreicherung zum Einsatz, sodass sich zahlreiche Probentypen sequenzieren lassen, ohne dass die für die Shotgun-Metagenomik-Sequenzierung erforderliche hohe Proben-Read-Tiefe benötigt wird. Im Vergleich zu anderen Verfahren für die gezielte Resequenzierung (wie beispielsweise die Amplikon-Sequenzierung) zeichnet sich das Hybrid-Capture-Verfahren zudem durch eine einheitlichere genomübergreifende Coverage, wesentlich größere Sonden-Panels und eine höhere Fähigkeit zur Bestimmung von Mutationen und zugehörigen Sequenzen aus. Damit ist das Viral Surveillance Panel bestens für die Überwachung von Ausbrüchen geeignet.

Integrierter, umfassender NGS-Workflow

Beim Workflow des Viral Surveillance Panel werden Virusgenome aus einer Reihe von Wirts- und Umweltproben, einschließlich Abwasser, angereichert.² Die Bibliotheksvorbereitungs- und Sequenzierungsschritte können innerhalb von zwei Tagen auf Tischsequenziersystemen durchgeführt werden ([Abbildung 1](#)).

Tabelle 1: Inhalt des Viral Surveillance Panel¹

Adenovirus	Hepatitis-B-Virus	Parechovirus
Aichivirus	Hepatitis-C-Virus	Parvovirus
Astrovirus	Hepatitis-E-Virus	Poliovirus
Chapare-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus 1	Polyomavirus
Chikungunya-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus 2	Respiratorisches Synzytial-Virus
Coronavirus 229E	Influenza-A-Virus	Rhinovirus
Coronavirus HKU1	Influenza-B-Virus	Rifttal-Fieber-Virus
Coronavirus OC43	Japanische-Enzephalitis-Virus	Rotavirus
Coronavirus NL63	Junin-Virus	Rötelnvirus
Coxsackie-Virus	Kyasanur-Wald-Fieber-Virus	Sabia-Virus
Dengue-Virus 1	Lujo-Virus	Sapovirus
Dengue-Virus 2	Machupo-Virus	SARS-COV
Dengue-Virus 3	Marburg-Virus	SARS-COV-2
Dengue-Virus 4	MERS-CoV	FSME-Virus
Ebolavirus	Affenpockenvirus	Variolavirus
Enterovirus	Nipah-Virus	Venezolanische-Pferdeenzephalitis-Virus
Guanarito-Virus	Norovirus	West-Nil-Virus
Hantavirus	Omsk-hämorrhagisches-Fieber-Virus	Westliche-Pferdeenzephalitis-Virus
Hendra-Henipavirus	Onkolytisches humanes Papillomvirus	Gelbfieber-Virus
Hepatitis-A-Virus	Parainfluenzavirus	Zika-Virus
Krim-Kongo-Fieber-Virus	Lassa-Virus	Salivirus
Östliche-Pferdeenzephalitis-Virus	Metapneumovirus	Torque-Teno-Virus

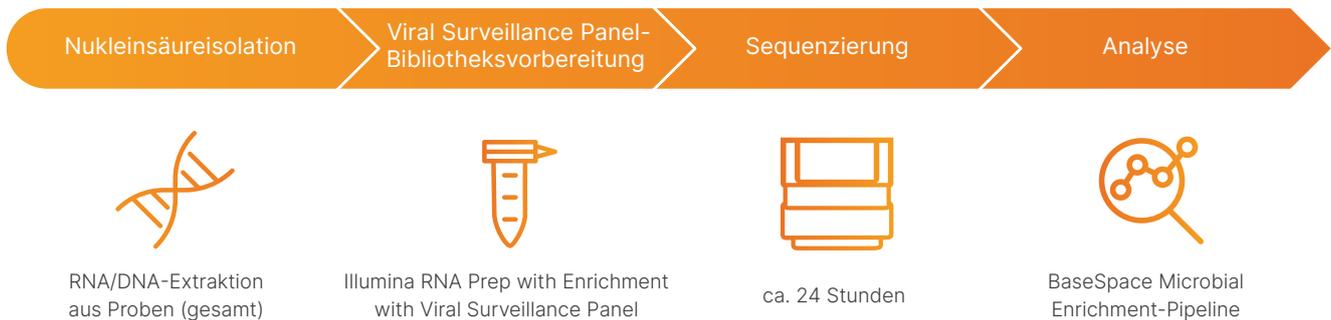


Abbildung 1: Workflow des Viral Surveillance Panel: In einem optimierten, umfassenden Workflow werden Bibliotheken aus Umwelt- oder Wirtsproben vorbereitet, auf einem beliebigen Illumina-Sequenziersystem sequenziert und in der BaseSpace Microbial Enrichment-Pipeline für die Virusbestimmung, die Generierung von Konsensus-Genomsequenzen, das Read-Mapping auf Viren mit der höchsten Übereinstimmung und die Stammtypisierung analysiert. Die Dauer der Sequenzierung ist abhängig von der Proben-Read-Tiefe und dem jeweiligen Sequenziersystem.

Bibliotheksvorbereitung

Das Protokoll zur Bibliotheksvorbereitung des Viral Surveillance Panel entspricht dem des Illumina [Respiratory Virus Oligo Panel](#).³ Illumina RNA Prep with Enrichment bietet dank On-Bead-Tagmentierung, gefolgt von einem einzigen Hybridisierungsschritt, einen schnellen Workflow für die Generierung angereicherter Bibliotheken. Vorteile von Illumina RNA Prep with Enrichment:

- Schneller, für die Automatisierung geeigneter Workflow, der in etwa zwei Tagen mit minimalem manuellen Aufwand durchgeführt werden kann
- Flexible Probenmenge von 10 ng bis 100 ng Gesamt-Nukleinsäure
- Skalierbarer Durchsatz, geeignet für das Multiplexing von bis zu 384 Proben in einem einzigen Lauf

Sequenzierung

Aufgrund der bei VSP-angereicherten Bibliotheken geringeren Anforderungen an die Read-Tiefe können zahlreiche Sequenziersysteme verwendet werden, darunter die Tischsysteme MiniSeq™, MiSeq™ sowie NextSeq™ 550, NextSeq 1000 und NextSeq 2000. Die Anzahl der virusspezifischen Reads und die erzielte Sequenz-Coverage sind abhängig vom Virustiter, der Qualität der Nukleinsäureprobe, der Proben-Read-Tiefe sowie der Anzahl der Reads pro Probe. Die allgemeine Empfehlung für die Read-Tiefe bei der Sequenzierung für Proben guter Qualität beträgt minimal zwei Millionen Paired-End-Reads pro Probe mit einer Read-Länge von 149 bp. Die empfohlene Read-Tiefe hängt zudem vom jeweiligen Proben typ ab. Für komplexere Proben (z. B. Abwasser) werden mindestens vier Millionen Paired-End-Reads pro Probe empfohlen.

Datenanalyse

Das Viral Surveillance Panel lässt sich gemeinsam mit der Microbial Enrichment-Sekundäranalyse-Pipeline von [BaseSpace™ Sequence Hub](#) verwenden. Die Microbial Enrichment-Pipeline liefert Contig-Assemblierung, Konsensus-Sequenzen und Genom-Coverage für die im Panel enthaltenen Virusgenome.

Leistung

Target-Anreicherung

Die Hybrid-Capture-Target-Anreicherung für das Viral Surveillance Panel erfolgt anhand des Illumina RNA Prep with Enrichment Kit. Im Vergleich zur Shotgun-Metagenomik-Sequenzierung, bei der die gesamte RNA/DNA sequenziert wird, reduziert das gezielte Hybrid-Capture-Verfahren die unnötige Sequenzierung von RNA/DNA des Wirts bzw. von Mikroorganismen, die nicht von Interesse sind. Das senkt die Kosten und ermöglicht eine umfassende Sequenzierung von Virusgenomen auf Tischsequenziersystemen ([Abbildung 2](#)).

Die gleichzeitige Sequenzierung des Genoms mehrerer Viren ermöglicht die Überwachung auf Viren sowie die Analyse der viralen Evolution. Die Target-Anreicherungs sonden im Viral Surveillance Panel sorgen für eine einheitliche Coverage gesamt Virusgenome ([Abbildung 3](#)). Zudem sind die für Hybrid-Capture-Protokolle verwendeten Oligosonden auch in mutierten Regionen wirksam, sodass auch Viren erfasst werden können, die sich schnell verändern (z. B. RNA-Viren).

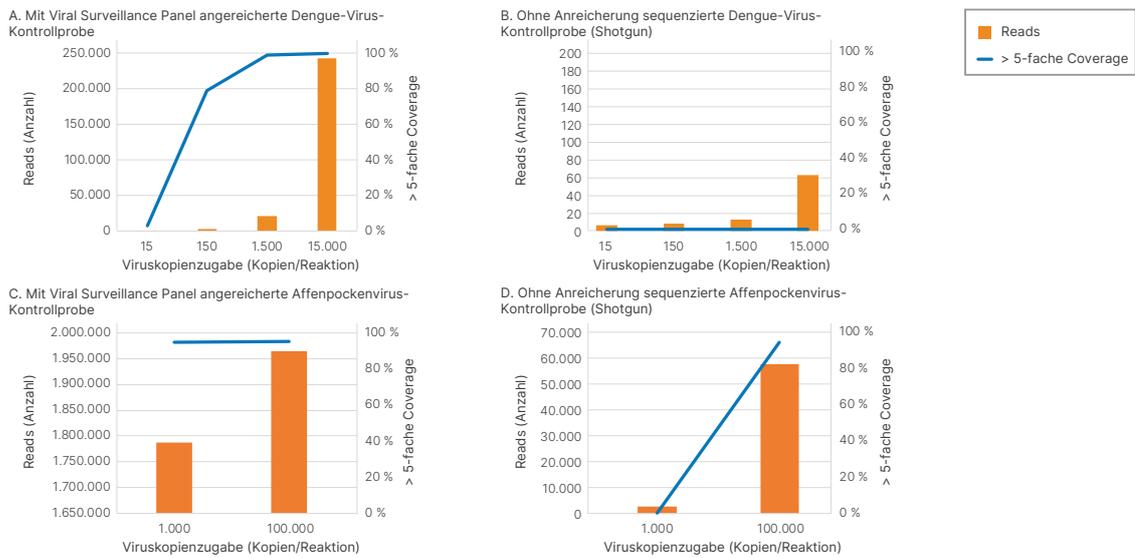


Abbildung 2: Höhere Read-Zahlen und Virusgenom-Coverage mit dem Viral Surveillance Panel: Vergleich der Leistung des Viral Surveillance Panel und der Sequenzierung ohne Anreicherung unter Verwendung handelsüblicher Viruskontrollproben. (A) Dengue-Virus-Kontrollprobe, gemischt mit 10 ng Human-RNA und angereichert mit Viral Surveillance Panel, (B) Dengue-Virus-Kontrollprobe, gemischt mit 10 ng Human-RNA und ohne Anreicherung sequenziert, (C) Affenpockenvirus-Kontrollprobe, gemischt mit 10 ng Human-RNA sowie 10 ng Human-DNA und angereichert mit Viral Surveillance Panel, (D) Affenpockenvirus-Kontrollprobe, sequenziert ohne Anreicherung, gemischt mit 10 ng Human-RNA sowie 10 ng Human-DNA und ohne Anreicherung sequenziert. Die Proben wurden sequenziert und die Daten auf zwei Millionen Paired-End-Reads bei 2 × 149 bp normalisiert.

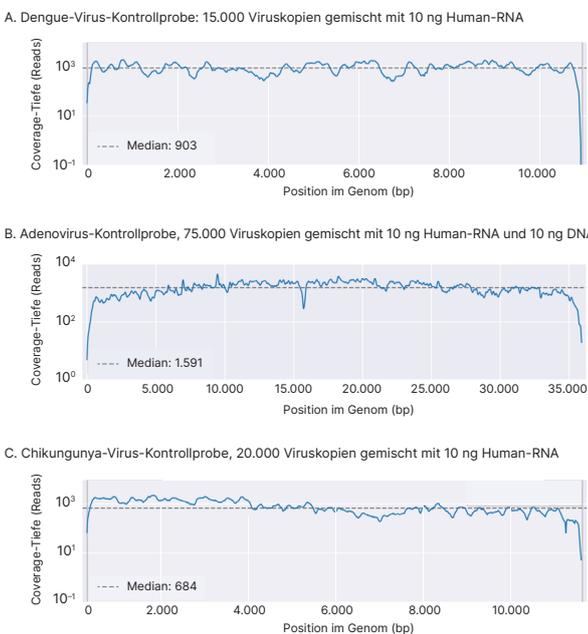


Abbildung 3: Einheitliches Virusgenom nach Anreicherung mit dem Viral Surveillance Panel: Die Viruskontrollproben wurden durch Mischen von Viruskontrollproben mit bekannter Kopienzahl mit einer Mischung aus 10 ng Human-RNA/DNA hergestellt. Die Bibliotheken wurden gemäß dem Workflow des Viral Surveillance Panel vorbereitet und sequenziert.

Abwasserüberwachung

Die Überwachung von Abwasser auf Virussequenzen stellt einen Indikator für die regionale Verbreitung viraler Pathogene dar und liefert wertvolle Informationen für die Planung von Maßnahmen im öffentlichen Gesundheitswesen. Mit dem Viral Surveillance Panel lassen sich Virusgenome in Abwasserproben bei niedrigeren Konzentrationen erkennen und bestimmen als mit der Shotgun-Sequenzierung (Tabelle 2).

Zusammenfassung

Das Viral Surveillance Panel bietet einen optimierten Komplet-Workflow zur Bestimmung und Überwachung von Virusausbrüchen. Es umfasst Hybrid-Capture-Sonden für 66 RNA- und DNA-Virusgenome, die als schwerwiegende Risiken für die öffentliche Gesundheit gelten.¹ Da bei der Hybrid-Capture-Target-Anreicherung eine Fokussierung auf die Zielsequenzen erfolgt, ist keine hohe Proben-Read-Tiefe erforderlich. Das senkt die Kosten und erhöht den Durchsatz. Zudem ist der Workflow für eine Reihe von Probenarten und Anwendungen geeignet, einschließlich der regionsspezifischen Bestimmung des Vorhandenseins von Viren durch Abwasserüberwachung.

Tabelle 2: Mit Viral Surveillance Panel oder Shotgun-Sequenzierung in Abwasser nachgewiesene Viren^a

Erkanntes Virus	Viral Surveillance Panel	Shotgun-Sequenzierung	Viral Surveillance Panel	Shotgun-Sequenzierung
	Genome mit mehr als 5-facher Coverage (%)		Reads (Anzahl)	
Astrovirus	98,9	0	122.525	7
JC-Virus	98,9	0	29.749	0
BK-Virus	97,8	0	29.318	5
hCoV-OC43	87,3	0	23.352	8
Aichivirus A	95,1	0	16.919	4
Norovirus GII	90,0	0	7.873	0
Coxsackie-Virus A19	65,2	0	7.195	0
Norovirus GII.P7_GII.6	69,7	0	2.572	0
Norovirus	57,3	0	1.191	0
Norovirus GI	51,2	0	859	0

a. Die Proben wurden von Forschern der Colorado State University entnommen und die gereinigten Gesamt-Nukleinsäuren zur Untersuchung an Illumina gesendet. Die Bibliotheken wurden aus 100 ng Gesamt-Nukleinsäuren vorbereitet und sequenziert.

Schließlich kann das Viral Surveillance Panel auch noch zusammen mit der kostenlosen Microbial Enrichment Analysis-Pipeline auf BaseSpace Sequence Hub verwendet werden. Mit diesem NGS-Workflow steht Organisationen des öffentlichen Gesundheitswesens und Forschern eine fortschrittliche Alternative zur teuren, komplizierten Shotgun-Sequenzierung zur Verfügung.

Weitere Informationen

Viral Surveillance Panel, illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/viral-surveillance-panel.html

Illumina RNA Prep with Enrichment, illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/rna-prep-enrichment.html

BaseSpace-Anwendungen, illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps.html

Illumina-Sequenzierplattformen, illumina.com/systems/sequencing-platforms.html

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Viral Surveillance Panel (96 samples)	20088154
Viral Surveillance Panel with Illumina RNA Prep with Enrichment Indexes Set A (96 samples)	20087932
Viral Surveillance Panel with Illumina RNA Prep with Enrichment Indexes Set B (96 samples)	20087929

Quellen

1. Bloom DE, Cadarette D. [Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response](#). *Front Immunol*. 2019;10:549. Veröffentlicht am 28. März 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.00549
2. McClary-Gutierrez JS, Aanderud ZT, Al-Faliti M, et al. [Standardizing data reporting in the research community to enhance the utility of open data for SARS-CoV-2 wastewater surveillance](#). *Environ Sci (Camb)*. 2021;9:10.1039/d1ew00235j. doi:10.1039/d1ew00235j
3. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment (L) Tagmentation: Reference guide. support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/RNA/illumina-rna-prep-reference-guide-1000000124435-03.pdf. Veröffentlicht 2021. Abgerufen am 13. September 2022.

illumina[®]

+1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) | +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA)
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. oder der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01240 DEU v1.0