

Polish and Estonian Scientists Provide First Unbiased Comparison of Gut Microbiome Sequencing Platforms - and Find Both Promise and an Important Caveat

A new study by researchers from the Małopolska Centre of Biotechnology at Jagiellonian University (dr Kinga Zielińska and prof. Paweł P Łabaj) and Sano Centre for Computational Medicine in Kraków (dr Tomasz Kościółek), in collaboration with scientists from the University of Tartu in Estonia, provides the most comprehensive comparison to date of two DNA sequencing technologies used in microbiome research (doi: 10.1128/msystems.01714-25). The findings, published alongside an accompanying perspective article (doi: 10.1128/msystems.00144-26), offer critical guidance for scientists designing large-scale population health studies.

The human gut microbiome - trillions of microorganisms living in our digestive tract - plays a central role in health and disease. To study it at scale, researchers sequence microbial DNA from thousands of individuals. Until recently, Illumina sequencing technology was the near-universal standard for such work. However, newer and more affordable alternatives have emerged - most notably the MGI platforms developed by BGI Tech Solutions, which has an established European hub in Warsaw. As these platforms gain adoption, a pressing question has gone unanswered: can data generated on MGI and Illumina instruments be used interchangeably, and if not, what are the caveats? No large-scale, unbiased comparison existed - until now.

To answer this question, the team analyzed 1,351 matched gut microbiome samples from the Estonian Biobank - a unique resource in which the same biological material was sequenced on both platforms simultaneously. This is one of the largest comparisons of its kind ever conducted.

The good news: the two platforms agreed very well on **which microorganisms are present**. Over 92% of detected species were shared between the platforms, and measures of microbial diversity showed no significant differences. This means that large existing datasets from different platforms can potentially be combined and compared in taxonomic studies.

However, the picture was more complex when examining **what those microorganisms can do** - their functional potential, such as which metabolic pathways or antibiotic resistance genes are present. Here, the researchers identified systematic differences linked not to the sequencing machines themselves, but to how samples were prepared before sequencing. In particular, running too many samples simultaneously on a single sequencing instrument (a practice called high multiplexing) reduces the depth and evenness of coverage, causing rare but biologically important genes to be missed entirely - a loss that cannot be corrected after the fact by computational methods.

These findings carry broad implications for the entire field. As microbiome science moves toward clinical applications - from personalized medicine to global antimicrobial resistance surveillance - the ability to reliably detect what microbes are doing, not just

which microbes are present, becomes essential. The researchers call for a rethinking of how sequencing studies are designed, recommending that scientists prioritize sufficient per-sample coverage depth over the cost savings of high multiplexing, particularly when functional profiling is the goal.

"Our results confirm that we can trust cross-platform taxonomic comparisons in large cohorts, but we urgently need to raise the bar for functional studies," says dr Kinga Zielińska, the first author of both publications.

These findings align with earlier work of prof. Paweł P. Łabaj within US FDA MAQC/SEQC Consortia (<https://tinyurl.com/usfdaseqc>) and Massive Analysis and Quality Control Society (<https://themaqc.org>) where he helped define the strengths and limitations of NGS based expression profiling and the influence of study design-based confounding factors on results. Here, the conclusions are similar as the underneath technology is the same, just applied to metagenomics.

"Decisions made at the very start of the sequencing workflow - long before any data analysis - can create blind spots that no algorithm can fix.", says prof. Paweł P. Łabaj.

For the wider scientific community, this work establishes a new empirical benchmark for cross-platform study design. It provides concrete, data-driven guidance that will help researchers around the world design better experiments, combine datasets more reliably, and ultimately translate microbiome findings into actionable health insights.

The authors bring extensive experience in building benchmarks and community datasets, having run challenges within the Critical Assessment of Massive Data Analysis (CAMDA) for nearly two decades (<http://www.camda.info>). These efforts first explored city microbiome data from The International MetaSUB Consortium (<https://www.metasub.org>, prof. Łabaj is a member of the board of directors), and more recently, through the involvement of dr. Zielińska, have turned to benchmarking gut microbiome metagenomic analyses.

The work was supported by the National Science Centre of Poland (NCN), the Polish Ministry of Science and Higher Education and the Estonian Research Council.

Polscy i estońscy naukowcy przeprowadzają pierwsze bezstronne porównanie platform do sekwencjonowania mikrobiomu jelitowego – i odkrywają zarówno obiecujące wyniki, jak i istotne zastrzeżenie

Nowe badanie naukowców z Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (dr Kinga Zielińska i prof. Paweł P. Łabaj) oraz Centrum Sano Medycyny Obliczeniowej w Krakowie (dr Tomasz Kościótek), we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu w Tartu w Estonii, dostarcza najbardziej kompleksowego jak dotąd porównania dwóch technologii sekwencjonowania DNA stosowanych w badaniach mikrobiomu (doi: 10.1128/msystems.01714-25). Wyniki, opublikowane wraz z towarzyszącym artykułem perspektywicznym (doi: 10.1128/msystems.00144-26), stanowią istotne wskazówki dla naukowców projektujących wielkoskalowe badania zdrowia populacyjnego.

Mikrobiom jelitowy człowieka – biliony mikroorganizmów zasiedlających nasz przewód pokarmowy – odgrywa kluczową rolę w zdrowiu i chorobie. Aby badać go na szeroką skalę, naukowcy sekwencjonują mikrobowe DNA pochodzące od tysięcy osób. Do niedawna technologia sekwencjonowania firmy Illumina była niemal powszechnym standardem w tego typu badaniach. Pojawiły się jednak nowsze i bardziej przystępne cenowo alternatywy – w szczególności platformy MGI opracowane przez BGI Tech Solutions, które posiadają ugruntowane europejskie centrum w Warszawie. W miarę jak platformy te zyskują na popularności, pilne pytanie pozostawało bez odpowiedzi: czy dane generowane na urządzeniach MGI i Illumina można stosować zamiennie, a jeśli nie – jakie są zastrzeżenia? Do tej pory nie istniało żadne wielkoskalowe, bezstronne porównanie – aż do teraz.

Aby odpowiedzieć na to pytanie, zespół przeanalizował 1351 dopasowanych próbek mikrobiomu jelitowego z Estońskiego Biobanku – wyjątkowego zasobu, w którym ten sam materiał biologiczny był sekwencjonowany na obu platformach jednocześnie. Jest to jedno z największych porównań tego rodzaju, jakie kiedykolwiek przeprowadzono.

Dobra wiadomość: obie platformy bardzo dobrze zgadzały się co do tego, jakie mikroorganizmy są obecne. Ponad 92% wykrytych gatunków było wspólnych dla obu platform, a miary różnorodności mikrobiologicznej nie wykazały istotnych różnic. Oznacza to, że duże istniejące zestawy danych z różnych platform mogą potencjalnie być łączone i porównywane w badaniach taksonomicznych.

Obraz był jednak bardziej złożony w przypadku analizy tego, co te mikroorganizmy mogą robić – ich potencjału funkcjonalnego, takiego jak obecność ścieżek metabolicznych czy genów oporności na antybiotyki. Badacze zidentyfikowali tu systematyczne różnice związane nie z samymi urządzeniami do sekwencjonowania, lecz ze sposobem

przygotowania próbek przed sekwencjonowaniem. Jednoczesne sekwencjonowanie zbyt wielu próbek na jednym instrumencie (praktyka zwana wysokim multipleksowaniem) zmniejsza głębokość i równomierność pokrycia, powodując, że rzadkie, lecz biologicznie istotne geny są pomijane – a strata ta nie może zostać naprawiona żadnymi metodami obliczeniowymi.

Wyniki te mają szerokie implikacje dla całej dziedziny. W miarę jak nauka o mikrobiomie zmierza ku zastosowaniom klinicznym – od medycyny spersonalizowanej po globalny nadzór nad opornością na antybiotyki – kluczowa staje się zdolność do niezawodnego wykrywania tego, co robią drobnoustroje, a nie tylko tego, które drobnoustroje są obecne. Badacze wzywają do przemyślenia sposobów projektowania badań sekwencjonowania, zalecając naukowcom priorytetowe traktowanie wystarczającej głębokości pokrycia na próbkę ponad oszczędności wynikające z wysokiego multipleksowania, szczególnie gdy celem jest profilowanie funkcjonalne.

„Nasze wyniki potwierdzają, że możemy ufać porównaniom taksonomicznym między platformami w dużych kohortach, ale pilnie musimy podnieść poprzeczkę dla badań funkcjonalnych” – mówi dr Kinga Zielińska, pierwsza autorka obu publikacji.

Wyniki te są zbieżne z wcześniejszymi pracami prof. Pawła P. Łabają prowadzonymi w ramach konsorcjów US FDA MAQC/SEQC (<https://tinyurl.com/usfdaseqc>) oraz Massive Analysis and Quality Control Society (<https://themaqc.org>), gdzie współdefiniował on możliwości i ograniczenia profilowania ekspresji genów opartego na NGS oraz wpływ czynników zakłócających związanych z projektowaniem badań. Wnioski są tu podobne – technologia leżąca u podstaw jest ta sama, zastosowana jedynie do badań metagenomicznych.

„Decyzje podejmowane na samym początku procesu sekwencjonowania – na długo przed jakąkolwiek analizą danych – mogą tworzyć martwe punkty, których żaden algorytm nie jest w stanie naprawić” – mówi prof. Paweł P. Łabaj.

Dla szerszej społeczności naukowej praca ta ustanawia nowy empiryczny punkt odniesienia dla projektowania badań wieloplatformowych. Dostarcza konkretnych, opartych na danych wskazówek, które pomogą naukowcom na całym świecie projektować lepsze eksperymenty, łączyć zestawy danych w bardziej wiarygodny sposób i ostatecznie przekładać odkrycia dotyczące mikrobiomu na praktyczne wnioski zdrowotne.

Autorzy posiadają rozległe doświadczenie w tworzeniu benchmarków i ogólnodostępnych zbiorów danych – od niemal dwóch dekad prowadzą wyzwania w ramach Critical Assessment of Massive Data Analysis (CAMDA) (<http://www.camda.info>). Działania te początkowo koncentrowały się na danych dotyczących mikrobiomu miejskiego z International MetaSUB Consortium (<https://www.metasub.org>; prof. Łabaj jest członkiem rady dyrektorów), a ostatnio –

dzięki zaangażowaniu dr Zielińskiej – skupiły się na benchmarkingu metagenomicznych analiz mikrobiomu jelitowego.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Estońską Radę ds. Badań Naukowych.