

Illumina Microbial Amplicon Prep für die virologische Surveillance

Flexible Performance
für eine umfassende
Coverage viraler Genome



Einleitung

Bei der genomischen Surveillance in Bezug auf pathogene Mikroben handelt es sich um ein wichtiges Instrument der öffentlichen Gesundheit. Die Erforderlichkeit zeigt sich durch immer neue Ausbrüche, die Auswirkungen des Klimawandels, die Zerstörung natürlicher Lebensräume und fortlaufende zoonotische Übertragungen.¹

Illumina Microbial Amplicon Prep ist ein anpassbares Instrument für die genomische Surveillance mit einem optimierten, etablierten Workflow, bei dem dieselbe Chemie zum Einsatz kommt wie beim Illumina COVIDSeq™ Assay (Abbildung 1). Der Workflow vereint die Proben- und Bibliotheksvorbereitung (einschließlich cDNA-Konvertierung für RNA-Targets, PCR-Amplifikation, Tagmentierung, Bibliotheksamplifikation und Bead-Cleanup-Reagenzien), die bewährte Illumina-Sequenzierung und die preisgekrönte DRAGEN™-Sekundäranalyse. Zur Demonstration der umfassenden Fähigkeit zur Sequenzierung von Virengenomen (WGS, Whole-Genome Sequencing) mit Illumina Microbial Amplicon Prep wurden mehrere Arboviren (Chikungunya, Dengue 1 und Zika), das Mpx-Virus und das humane respiratorische Synzytial-Virus (hRSV) A/B mit Primer-Sets aus Open-Source-Primer-Designtools oder etablierter wissenschaftlicher Literatur mit geringfügigen Protokolländerungen getestet. Die Ergebnisse zeigen eine umfassende Coverage viraler Genome unterschiedlicher Größe, woraus sich die Eignung für eine wirksame Surveillance ableiten lässt.

Methoden

Probenvorbereitung

Arboviren

Zur Charakterisierung der Performance des Illumina Microbial Amplicon Prep-Assays für Arboviren wurden

im Handel erhältliche genomische Kontrollproben der RNA von Chikungunya-, Dengue-1- und Zika-Viren untersucht (Tabelle 1). Zur Generierung einer künstlichen RNA-Virenprobe wurden definierte Kopienzahlen genomischer RNA per Spike-in in 10 ng Universal Human Reference RNA (Agilent, Katalog-Nr. 740000) gegeben.

Tabelle 1: Zur Evaluierung genutzte virale Proben

Virus	Anbieter	Produkt-Nr.
Chikungunya	Vircell	MBC099-R
Dengue 1	Vircell	MBC055-R
Zika	ATCC	VR-1843DQ

Mpox

Zur Charakterisierung der Performance in Bezug auf virale DNA wurden DNA-Proben aus Mpox-positiven Hautläsionen mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 61104) extrahiert und im Schritt „Amplify cDNA“ des Protokolls als Zugabe für den Illumina Microbial Amplicon Prep-Assay verwendet. Die Viruslast der Proben wurde mithilfe einer qPCR bestimmt, die von Aegis Sciences Corporation auf dem AB 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, Katalog-Nr. 4406985/4406984) zur Bestimmung der Zyklusschwellenwerte (Ct, Cycle Threshold) durchgeführt wurde.

hRSV

Zur Charakterisierung der Assay-Performance in Bezug auf hRSV wurden Nasenabstrichproben (280 µl), die in Virentransportmedien gelagert wurden, mit dem QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 52904) extrahiert. Die extrahierte Nukleinsäure wurde anschließend mit dem Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, Katalog-Nr. R1050) einer DNase-Behandlung unterzogen.

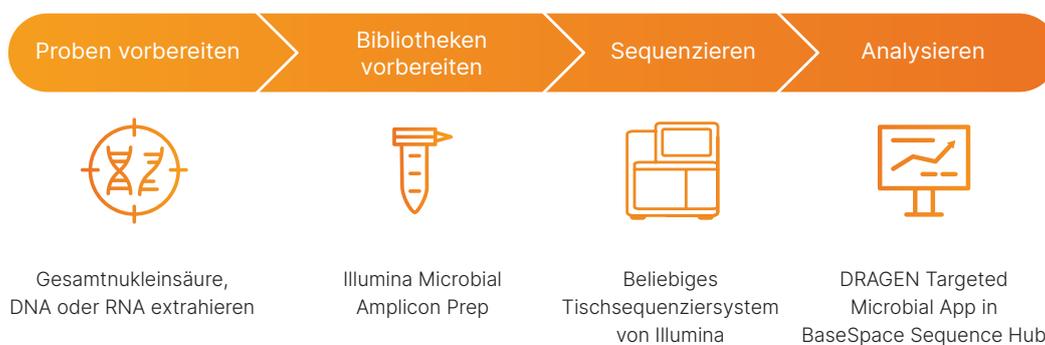


Abbildung 1: Illumina Microbial Amplicon Prep-Workflow: Illumina Microbial Amplicon Prep gehört zu einem optimierten Workflow für virale WGS, der die Proben- und Bibliotheksvorbereitung sowie die Sequenzierung auf einem beliebigen Tischsequenziersystem von Illumina sowie die DRAGEN-Sekundäranalyse vereint.

Die Proben wurden dann im Verhältnis 1:10 verdünnt, um zusätzliches Volumen für wiederholte Tests und/oder die Assayoptimierung zu erhalten. Die qPCR wurde mit dem Protokoll und den Sonden durchgeführt, die von den Centers for Disease Control (CDC) entwickelt wurden, sowie mit dem iTaq Universal Probes One-Step Kit 500 × 20 µl Kit (Bio-Rad Laboratories, Katalog-Nr. 1725141). Zur Maximierung der Zielamplifikation wird empfohlen, eine unverdünnte extrahierte Probe in den Illumina Microbial Amplicon Prep-Assay aufzunehmen, wenn Proben mit unbekannter Target-Kopienzahl verwendet werden.

Primerdesign

Alle Primer wurden von Integrated DNA Technologies (normalisiert auf 100 µM) bezogen und mit äquimolaren Konzentrationen gepoolt. Die Primer wurden zur Generierung von zwei überlappenden Amplikonsätzen in zwei Pools assembliert.

Arboviren

Zwar werden beim Primerdesign Amplikondesigns mit 400 bp als Standard-Amplikongröße empfohlen, jedoch sind längere Amplikons sowohl bei RNA- als auch bei DNA-Targets möglich. Bei längeren Amplikons werden weniger Primer benötigt und das Risiko von Heterodimer-Interaktionen sowie Off-Target-Bindungsinteraktionen verringert sich. Längere Amplikons sind unter Umständen zur Untersuchung von Regionen mit hoher Variabilität erforderlich. Kürzere Amplikons sind bei degradierten Proben und schwer zu amplifizierenden Regionen (virale Genom-Sekundärstruktur) unter Umständen von Vorteil, da sie hier eine robustere Performance zeigen.

Für das Chikungunya-Virus wurde die genomische Sequenz NC_004162.2 mit dem [Softwaretool PrimalScheme](#) mit einer Target-Amplikongröße von 400 bp verarbeitet, um das Primerpooldesign CHIK-PP zu generieren. Mit diesem Primerpool (CHIK-PP) wurde die Amplirun Chikungunya Virus RNA Control (Vircell, Katalog-Nr. MBC099-R) getestet. Für das Dengue-1-Virus wurde die genomische Sequenz KM204119.1 mit dem Softwaretool PrimalScheme mit einer Target-Amplikongröße von 400 bp verarbeitet. Mit diesem Primerpool (DENV1-PP) wurde die Amplirun Dengue 1 Virus RNA Control (Vircell, Katalog-Nr. MBC055-R) getestet. Für das Zika-Virus wurde ein mit PrimalScheme generiertes vorhandenes Primerdesign mit einer Target-Amplikongröße von 400 bp verwendet.² Die Primer wurden äquimolar gepoolt und im Assay mit Zika Virus RNA Control (ATCC, Katalog-Nr. VR-1843DQ) getestet.



Weitere Informationen zum PrimalScheme-Tool finden Sie unter www.primalscheme.com.

Mpox

Für das Mpox-Virus wurde gDNA mit einem optimierten, mit PrimalScheme generierten Primerpool mit einer Target-Amplikongröße von ca. 2.000 bp getestet.³ Der anfängliche Mpox-Primerpool zur Generierung des Primerpools MPX-GL-Yv2 enthielt 326 Primer, die durch die Zugabe von fünf ergänzenden Primern optimiert wurden, um Verluste zu kompensieren, die in den Amplikons 11, 75 und 118 beobachtet wurden.

hRSV

Ein Primerdesign der CDC⁴ sowie ein Primerdesign des WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (WCCRRI)⁵ wurden mit hRSV-positiven Nasopharyngealabstrichproben getestet, die von Discovery Life Sciences bezogen wurden. Das CDC-Primerdesign (hRSV-A/B-CDC20) umfasste je ein Primerdesign für hRSVA und hRSVB. Anhand der hRSV-A/B-CDC20-Primerdesigns wurden 19 (hRSVA) bzw. 20 (hRSVB) Amplikons insgesamt mit einer Target-Amplikongröße von ca. 925 bp generiert. Bei Verwendung des CDC-Primerdesigns müssen Anwender den hRSV-Subtyp (A/B) durch qPCR mit etablierten Sondenätzen bestimmen, um das geeignete Primerdesign zu ermitteln.⁶ Das WCCRRI-Primerdesign (hRSV-WCCRRI6) generiert sechs Amplikons sowohl für hRSVA als auch hRSVB mit variablen Target-Amplikongrößen zwischen ca. 2.000 und 4.400 bp. Beim WCCRRI-Primerdesign muss der hRSV-Subtyp nicht bestimmt werden.

Bibliotheksvorbereitung

Die Bibliotheken für das Chikungunya-, Dengue-1- und Zika-Virus wurden anhand des [Illumina Microbial Amplicon Prep-Protokolls](#) ohne Modifikationen vorbereitet. Für das Mpox-Virus wurde die aus Mpox-positiven Proben extrahierte DNA ab dem Schritt „Amplify cDNA“ des Protokolls verarbeitet, da der Schritt zur reversen Transkription bei DNA-Virusproben nicht erforderlich ist. Für hRSV wurde extrahierte RNA gemäß dem Illumina Microbial Amplicon Prep-Protokoll mit folgenden Modifikationen verarbeitet:

- Der Schritt „Anneal RNA“ wurde modifiziert, sodass statt der Standardzugabe von 8,5 µl EPH3 2,5 µl EPH3 und 6 µl Wasser in Molekularbiologie-Qualität zugegeben wurden. Vorherige Tests haben gezeigt, dass die Reduzierung der EPH3-Zugabe die Performance bei Amplikons über 400 bp verbessert (Daten nicht dargestellt).
- Das PCR-Programm „Amplify cDNA“ wurde geändert, sodass durch die Absenkung der Annealingtemperatur das ordnungsgemäße Primerannealing ermöglicht wird ([Tabelle 2](#)). Diese Temperatur wurde anhand der Primersequenzen aus den CDC20- und WCCRRI-Primerdesigns und eines online verfügbaren [Tm-Rechners](#) ermittelt.

Tabelle 2: Änderungen am PCR-Programm „Amplify cDNA“

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Anzahl der Zyklen
1	98	180	1
2	98	15	
3	56/59 ^a	30	35
4	72	180	
5	4	halten	—

a. Die Annealingtemperatur wurde für die Primersätze CDC20-RSV-A/B und WCCRR1 von 63 °C auf 56 °C bzw. 59 °C abgesenkt. Das PCR-Programm wurde mit 35 Zyklen ausgeführt.

Sequenzierung

Vorbereitete Bibliotheken wurden denaturiert und aus einer gepoolten Bibliothek verdünnt, wie im Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für die Sequenziersysteme NextSeq™ 500 und 550 angegeben. Die Bibliotheken wurden auf dem NextSeq 550 System mit einer Read-Länge von 2 × 149 bp sequenziert und gemäß den aktuellen Sequenzierungsempfehlungen für den COVIDSeq-Assay auf eine Tiefe von 1 Mio. Paired-End-Reads normalisiert.

Datenanalyse

Die Sequenzierungsdaten wurden mit der DRAGEN Targeted Microbial App analysiert, die in BaseSpace™ Sequence Hub zur Verfügung steht. Die anwenderfreundliche App ermöglicht das Alignment von Reads auf Referenzgenome, das Varianten-Calling sowie die Erstellung einer Konsens-Genomsequenz, die die Verbreitung der Nukleinsäurespezies in der Probe darstellt. Wenn verfügbar, wurden für eine weiterführende Lineage-Analyse externe kuratierte Datenbanken hinzugezogen.

Ergebnisse

Arbovirus-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Arbovirus-Bibliotheken ergab einen technischen Replikat-Median von 80 % bzw. von 96 % bei ≥ 10-facher Genom-Coverage bei Zugabe von 500 bzw. 5.000 viralen Kopien für das Chikungunya-Virus (Abbildung 2A, 2B), einen Median von 94 % bzw. von 98,5 % bei ≥ 10-facher Genom-Coverage bei Zugabe von 500 bzw. 5.000 viralen Kopien für das Dengue-1-Virus (Abbildung 2C, 2D) und einen Median von 97,2 % bzw. 98,5 % bei ≥ 10-facher Genom-Coverage bei Zugabe von 500 bzw. 5.000 viralen Kopien für das Zika-Virus (Abbildung 2E, 2F).

Für alle sequenzierten Arboviren erhöhte sich die Coverage bei der Zugabe von mehr viralen Kopien, was die Variabilität der Performance abhängig vom Virustiter zeigt. Das Sequenzierungs-Read-Alignment ergab den Nachweis mehrerer Substitutionen im viralen Referenzgenom, das für die Analyse und das Primerdesign verwendet wurde. Diese Substitutionen können die Coverage beeinträchtigen oder Amplikonverluste verursachen, wenn sie an Primer-Bindungsstellen auftreten, insbesondere am 3'-Ende der Primer. Zwischen Bibliotheken zum Testen derselben Virus- oder Kontrollprobe traten Substitutionsdifferenzen auf (Abbildung 2E, 2F). Technische Replikatere können bei inkonsistent amplifizierenden Amplikons hilfreich sein und werden empfohlen, um das Varianten-Calling in der DRAGEN Targeted Microbial App zu bestätigen.

Mpox-Sequenzierung

Die Sequenzierung des Mpox-Virus ergab bei 1 Mio. Paired-End-Reads eine robuste Genom-Coverage, obwohl das Genom um das ca. 20-Fache größer war als die getesteten Arboviren (Abbildung 3A). Die Coverage invertierter Terminal-Repeats (ITR) wird nicht dargestellt (da die Analysepipeline Reads mit mehreren Alignments auslässt). Die nachfolgende Analyse von ergänzenden Alignments in der BAM-Datei zeigte jedoch, dass diese Regionen erfolgreich amplifiziert wurden (Daten nicht dargestellt). Die Evaluierung der Auswirkung der Viruszugabe auf die Performance ergab, dass gemappte Reads bei Proben mit niedrigem Titer unter Umständen keine vollständige Coverage des Genoms ermöglichen (Abbildung 3B).

hRSV-Sequenzierung

Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass beide evaluierten Primerpools hRSV-A/B-Genome amplifizieren konnten (Abbildung 4). Weitere Analysen zeigten, dass die reduzierte Coverage-Tiefe, die bei dem mit dem WCCRR1-Primerpool amplifizierten hRSV-A/B beobachtet wurde, dem längsten Amplikon entsprach (ca. 4.300 bp, Abbildung 4A, 4C).⁵ Obwohl PrimalScheme für das Amplikondesign empfohlen wird, zeigen diese Ergebnisse, dass mit Protokollmodifikationen auch andere Primerdesigns eine umfassende Genom-Coverage leisten können. Eine weitere Optimierung wäre durch die Einbeziehung der neuesten an GISAID übermittelten hRSV-Genome in das Primerdesign möglich, da dies das Targeting der gängigsten und aktuellen hRSV-Stämme ermöglicht.

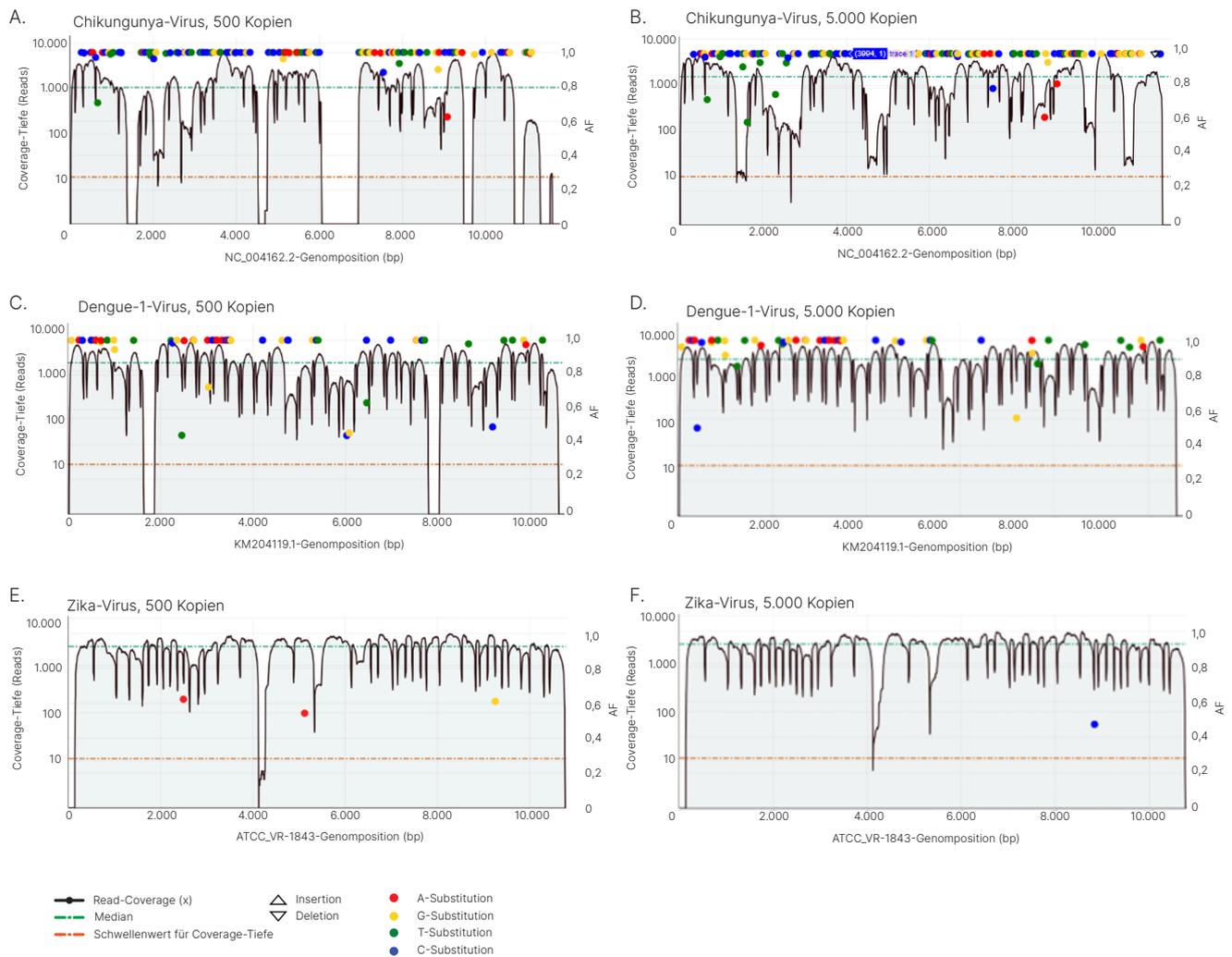


Abbildung 2: Coverage des Arbovirus-Genoms mit der DRAGEN Targeted Microbial App: Sequenzierungsergebnisse von Arboviren, einschließlich des (A, B) Chikungunya-Virus, des (C, D) Dengue-1-Virus und des (E, F) Zika-Virus, ergaben eine hohe mediane Coverage bei einer Zugabe von 500 Kopien und eine erhöhte Coverage mit 5.000 Kopien.

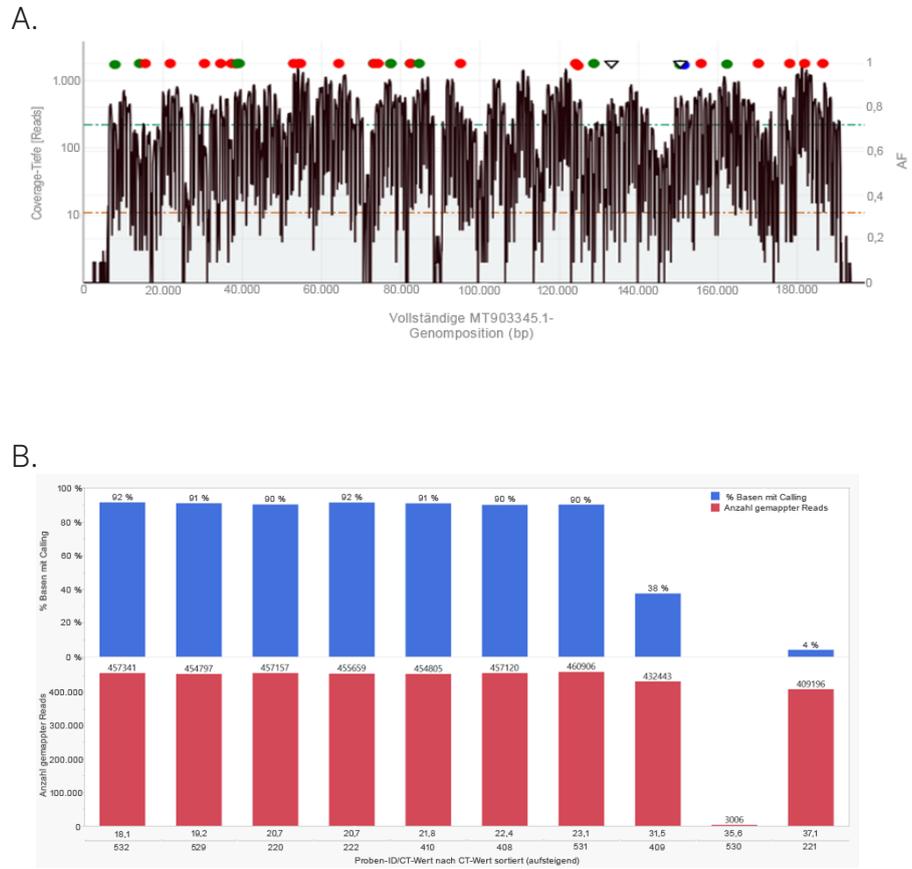


Abbildung 3: Coverage des Mpxv-Genoms: Sequenzierungsergebnisse mit (A) einer repräsentativen Probe des Mpxv-Virus zeigten eine Coverage über das gesamte Genom; (B) Proben mit geringem Virustiter zeigten eine niedrigere Coverage.

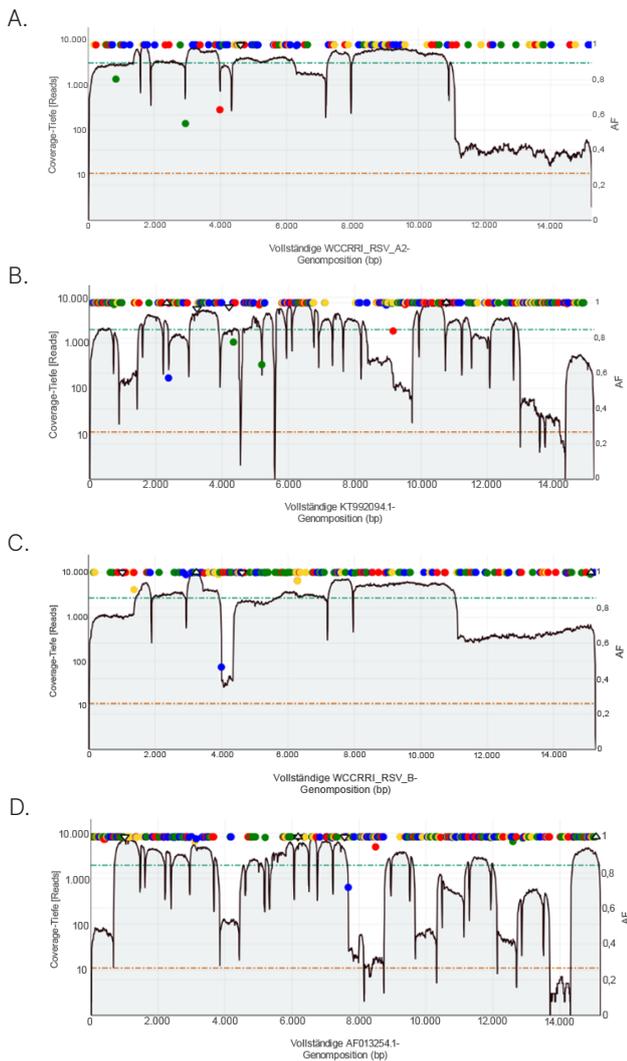


Abbildung 4: Coverage des hRSV A/B-Genoms:

Die Sequenzierungsergebnisse mit repräsentativen Proben von (A, B) hRSV-A und (C, D) hRSV-B zeigten, dass, obwohl beide Primerdesigns zur Amplifikation viraler Genome geeignet sind, sich beim (A, C) WCCRRI-Primerpool eine reduzierte Coverage ergab, die dem längsten Amplikon (ca. 4.300 bp) entspricht.

Zusammenfassung

ILLUMINA Microbial Amplicon Prep ist eine Lösung für die genomische Surveillance mit nachgewiesener Performance bei unterschiedlichen RNA- und DNA-Virusfamilien und Genomgrößen. Wie in diesem Anwendungshinweis dargestellt, bietet ILLUMINA Microbial Amplicon Prep eine umfassende Genom-Coverage (hier definiert als mindestens ≥ 10 -fache Coverage bei $> 90\%$ des viralen Genoms) für alle untersuchten Viren. Dieses Kit bietet einen universellen Workflow, der sich flexibel an praktisch jedes mikrobielle Target von Interesse anpassen lässt.

Weitere Informationen

[ILLUMINA Microbial Amplicon Prep](#)

Quellen

1. B Yeh K, M Fair J, Smith W, et al. [Assessing Climate Change Impact on Ecosystems and Infectious Disease: Important Roles for Genomic Sequencing and a One Health Perspective](#). *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(2):90. doi:10.3390/tropicalmed5020090.
2. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. [Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples](#). *Nat Protoc*. 2017;12(6):1261-1276. doi:10.1038/nprot.2017.066
3. Chen NFG, Gagne L, Doucette M, et al. [Monkeypox virus multiplexed PCR amplicon sequencing \(PrimalSeq\) V.2](#). protocols.io. Veröffentlicht am 26. Juli 2022. Aufgerufen am 28. August 2023.
4. Wang L, Ng TFF, Castro CJ, et al. [Next-generation sequencing of human respiratory syncytial virus subgroups A and B genomes](#). *J Virol Methods*. 2022;299:114335. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114335
5. Dong X, Deng YM, Aziz A, et al. [A simplified, amplicon-based method for whole genome sequencing of human respiratory syncytial viruses](#). *J Clin Virol*. 2023;161:105423. doi:10.1016/j.jcv.2023.105423
6. Wang L, Piedra PA, Avadhanula V, et al. [Duplex real-time RT-PCR assay for detection and subgroup-specific identification of human respiratory syncytial virus](#). *J Virol Methods*. 2019;271:113676. doi:10.1016/j.jviromet.2019.113676.

illumina[®]

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-02215 DEU v1.0