

illumina Microbial Amplicon Prep para vigilancia vírica

Rendimiento versátil para
una cobertura completa
del genoma vírico



Introducción

La vigilancia genómica de los microbios patógenos es una herramienta fundamental en la sanidad pública, cuya necesidad está justificada por los brotes continuos, el impacto del cambio climático, la invasión de hábitats y los incesantes eventos de transmisión zoonótica.¹

Illumina Microbial Amplicon Prep proporciona una herramienta de vigilancia genómica personalizable con un flujo de trabajo optimizado y corroborado, que utiliza la misma química que el ensayo Illumina COVIDSeq™ (figura 1). El flujo de trabajo integra la preparación de muestras y librerías (incluida la conversión del ADNc para dianas de ARN, la amplificación PCR, la tagmentación, la amplificación de librerías y los reactivos de limpieza de bolas), la secuenciación probada de Illumina y el galardonado análisis secundario de DRAGEN™. Para demostrar la amplia capacidad de la secuenciación del genoma completo (WGS, whole-genome sequencing) de virus con Illumina Microbial Amplicon Prep, se analizaron varios arbovirus (chikunguña, dengue 1 y Zika), el virus de la viruela símica (Mpox) y el virus respiratorio sincitial humano (hRSV) A/B utilizando conjuntos de cebadores de herramientas de diseño de cebadores de código abierto o bibliografía científica acreditada aplicando modificaciones menores del protocolo. Los resultados muestran una cobertura completa en genomas víricos de tamaño variable para una vigilancia eficaz.

Métodos

Preparación de muestras

Arbovirus

Para caracterizar el rendimiento del ensayo Illumina Microbial Amplicon Prep para arbovirus, se evaluaron controles de ARN genómico disponibles comercialmente de los virus chikunguña, del dengue 1 y de Zika (tabla 1).

Se añadieron números de copias definidos de ARN genómico a 10 ng de ARN de referencia humano universal (Agilent, n.º de catálogo 740000) para que funcionara como una muestra artificial de virus de ARN.

Tabla 1: Muestras víricas utilizadas para la evaluación

| Virus | Proveedor | N.º de producto |
|------------|-----------|-----------------|
| Chikunguña | Vircell | MBC099-R |
| Dengue 1 | Vircell | MBC055-R |
| Zika | ATCC | VR-1843DQ |

Mpox

Para caracterizar el rendimiento en virus de ADN, se extrajeron muestras de ADN de lesiones cutáneas positivas para Mpox utilizando QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 61104) y se utilizaron como aporte para el ensayo Illumina Microbial Amplicon Prep en el paso «Amplificación del ADNc» del protocolo. La carga vírica de las muestras se determinó mediante qPCR realizada por Aegis Sciences Corporation en el instrumento de PCR en tiempo real AB 7500 Fast Dx (Applied Biosystems, n.º de catálogo 4406985/4406984) para obtener valores de umbral de ciclos (Ct, cycle threshold).

hRSV

Para caracterizar el rendimiento del ensayo con el hRSV, las muestras de hisopos nasales (280 µl) almacenadas en medios de transporte vírico se extrajeron con el kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, n.º de catálogo 52904). El ácido nucleico extraído se trató después con ADNasa utilizando el kit Quick-RNA MicroPrep (Zymo Research, n.º de catálogo R1050). A continuación, las muestras se diluyeron en una proporción 1:10 para obtener un volumen adicional para pruebas repetidas y/u optimización del ensayo. La qPCR se realizó utilizando el protocolo y las sondas diseñadas por los



Figura 1: Flujo de trabajo de Illumina Microbial Amplicon Prep. Illumina Microbial Amplicon Prep forma parte de un flujo de trabajo optimizado para la WGS vírica, que integra la preparación de muestras y librerías con la secuenciación en cualquier sistema de secuenciación de sobremesa de Illumina y el análisis secundario de DRAGEN.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC, Centers for Disease Control) y el kit iTaq Universal Probes One-Step Kit 500 × 20 µl (Bio-Rad Laboratories, n.º de catálogo 1725141). Cuando se trabaja con muestras con números desconocidos de copias de objetivos, se recomienda incluir una muestra extraída sin diluir en el ensayo Illumina Microbial Amplicon Prep para aumentar la amplificación de objetivos.

Diseño de cebadores

Todos los cebadores se solicitaron a Integrated DNA Technologies (normalizados a 100 µM) y se agruparon con concentraciones equimolares. Los cebadores se ensamblaron en dos grupos para generar dos conjuntos superpuestos de amplicones.

Arbovirus

Aunque para el diseño de cebadores se recomienda un tamaño predeterminado de 400 pb, se pueden utilizar amplicones más largos tanto con objetivos de ARN como de ADN. Los amplicones más largos reducen el número de cebadores necesarios, el riesgo de interacciones de heterodímeros, las interacciones de unión fuera del objetivo y pueden ser necesarios para cubrir regiones con una alta variabilidad. Los amplicones más cortos pueden ser ventajosos, ya que ofrecen un rendimiento más sólido con muestras degradadas y regiones difíciles de amplificar (estructura secundaria del genoma vírico).

En el caso del virus chikunguña, la secuencia genómica NC_004162.2, selectiva para un tamaño de amplicón de 400 pb, para generar el diseño del grupo de cebadores CHIK-PP, se procesó mediante la [herramienta de software PrimalScheme](#). Este grupo de cebadores (CHIK-PP) se utilizó para el análisis de Amplirun Chikungunya Virus RNA Control (Vircell, n.º de catálogo MBC099-R). Para el virus del dengue 1, la secuencia genómica KM204119.1, selectiva de un tamaño de amplicón de 400 pb, se procesó mediante la herramienta de software PrimalScheme. Este grupo de cebadores (DENV1- PP) se utilizó para el análisis de Amplirun Dengue 1 Virus RNA Control (Vircell, n.º de catálogo MBC055-R). En el caso del virus de Zika, se utilizó un diseño de cebadores existente selectivo para un tamaño de amplicón de 400 pb generado mediante PrimalScheme.² Los cebadores se agruparon de forma equimolar y se analizaron en el ensayo utilizando Zika Virus RNA Control (ATCC, n.º de catálogo VR-1843DQ).



Para obtener más información sobre la herramienta PrimalScheme, consulte www.primalscheme.com

Mpox

En el caso del virus Mpox, el ADN_g se analizó utilizando un grupo de cebadores optimizados diseñado con

PrimalScheme específico para un tamaño de amplicón de unos 2000 pb.³ El grupo inicial de cebadores de Mpox contiene 326 cebadores optimizados mediante la incorporación de cinco cebadores adicionales para abordar las pérdidas observadas en los amplicones 11, 75 y 118, a fin de crear el grupo de cebadores MPX-GL-Yv2.

hRSV

Se analizaron un diseño de cebadores de los CDC⁴ y un diseño de cebadores del Centro colaborador de la OMS para la Referencia y la Investigación sobre la Gripe (WCCRRRI)⁵ con muestras de hisopos nasofaríngeos positivas para el hRSV adquiridas de Discovery Life Sciences. El diseño de cebadores de los CDC (hRSV-A/B-CDC20) consistió en un diseño de cebadores para el hRSVA y otro para el hRSVB. Los diseños de cebadores de hRSV-A/B-CDC20 generaron un total de 19 amplicones (hRSVA) o 20 amplicones (hRSVB) con un tamaño de amplicón de aproximadamente 925 pb. Si se utiliza el diseño de cebadores de los CDC, los usuarios deben determinar el subtipo de hRSV (A/B) mediante qPCR con conjuntos de sondas establecidos para decidir qué diseño de cebadores utilizar.⁶ El diseño de cebadores del WCCRRRI (hRSV-WCCRRRI6) está pensado para generar seis amplicones tanto para el hRSVA como para el hRSVB, específicos de tamaños de amplicones variables de entre unos 2000 y 4400 pb. Con el diseño de cebadores del WCCRRRI, no es necesario determinar el subtipo de hRSV.

Preparación de librerías

Se siguió el [protocolo Illumina Microbial Amplicon Prep](#) para preparar librerías para los virus chikunguña, del dengue 1 y de Zika, sin modificaciones. En el caso del Mpox, el ADN extraído de muestras positivas para este virus se procesó empezando por el paso «Amplificación del ADN_c» del protocolo, ya que el paso de transcripción inversa no es necesario para las muestras de virus de ADN. Para el hRSV, el ARN extraído se procesó siguiendo el protocolo Illumina Microbial Amplicon Prep, con las siguientes modificaciones:

- El paso «Hibridación del ARN» se modificó para añadir 2,5 µl de EPH3 y 6 µl de agua de grado molecular, en lugar del aporte predeterminado de 8,5 µl de EPH3. Las pruebas anteriores han demostrado que la reducción del aporte de EPH3 mejora el rendimiento con amplicones de más de 400 pb (no se muestran los datos).
- En el programa de «Amplificación del ADN_c» de la PCR se redujo la temperatura de hibridación para facilitar una buena hibridación de los cebadores ([tabla 2](#)). Esta temperatura se determinó utilizando las secuencias de los diseños de cebadores de los CDC20 y el WCCRRRI, así como una [calculadora de la temperatura de fusión \(T_m\)](#) en línea.

Tabla 2: Cambios en el programa de «Amplificación del ADNc» de la PCR

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (s) | N.º de ciclos |
|------|--------------------|------------|---------------|
| 1 | 98 | 180 | 1 |
| 2 | 98 | 15 | |
| 3 | 56/59 ^a | 30 | 35 |
| 4 | 72 | 180 | |
| 5 | 4 | Retención | — |

a. La temperatura de hibridación se redujo de 63 °C a 56 °C, para el conjunto de cebadores CDC20-RSV-A /B, y a 59 °C para el conjunto del WCCRRRI. El programa de PCR se ejecutó durante 35 ciclos.

Secuenciación

Las librerías preparadas se desnaturalizaron y diluyeron a partir de una librería agrupada de acuerdo con la Guía de desnaturalización y dilución de librerías para los sistemas de secuenciación NextSeq™ 500 y 550. Las librerías se secuenciaron en NextSeq 550 System a una longitud de lectura de 2 × 149 pb y se normalizaron a una profundidad de lectura «paired-end» de 1 millón según las recomendaciones de secuenciación actuales para el ensayo COVIDSeq.

Análisis de datos

Los datos de secuenciación se analizaron con la aplicación DRAGEN Targeted Microbial, disponible en BaseSpace™ Sequence Hub. La aplicación, de fácil uso, alinea las lecturas con los genomas de referencia, realiza la llamada de variantes y genera una secuencia de genoma de consenso que representa la población de especies de ácido nucleico en la muestra. Cuando están disponibles, se accede a bases de datos seleccionadas externas para realizar análisis de linaje adicionales.

Resultados

Secuenciación de arbovirus

La secuenciación de librerías de arbovirus dio como resultado una mediana de los duplicados técnicos de la cobertura del genoma del 80 % y el 96 %, con una cobertura de al menos 10 veces del genoma con aportes de 500 y 5000 copias víricas, respectivamente, para el virus chikunguña (figura 2A, 2B); una mediana de la cobertura del genoma del 94 % y el 98,5 %, con una cobertura de al menos 10 veces del genoma con aportes de 500 y 5000 copias víricas, respectivamente, para el virus del dengue 1 (figura 2C, 2D); y una mediana de la cobertura

del genoma del 97,2 % y el 98,5 %, con una cobertura de al menos 10 veces del genoma con aportes de 500 y 5000 copias víricas, respectivamente, para el virus de Zika (figura 2E, 2F).

Para todos los arbovirus secuenciados, la cobertura aumentó con un mayor aporte de copias víricas, lo que demuestra la variabilidad del rendimiento en función de la titulación vírica. La alineación de la lectura de secuenciación produjo la detección de múltiples sustituciones en todo el genoma de referencia vírico utilizado para el análisis y el diseño de cebadores. Estas sustituciones podrían reducir la cobertura o provocar la pérdida de amplicones si se producen en los sitios de unión de los cebadores, especialmente en el extremo 3' de estos. Se observó una discrepancia en la sustitución entre las librerías para el análisis de la misma muestra o control vírico (figura 2E, 2F). Las réplicas técnicas pueden ser útiles para los amplicones que no se amplifican de manera uniforme y se recomiendan para confirmar la llamada de variantes en la aplicación DRAGEN Targeted Microbial App.

Secuenciación de Mpox

La secuenciación del Mpox dio como resultado una sólida cobertura del genoma en 1 millón de lecturas «paired-end», a pesar de que el tamaño del genoma era aproximadamente 20 veces mayor que el de los arbovirus analizados (figura 3A). Aunque no se representa la cobertura de las repeticiones terminales invertidas (RTI), (debido a que el proceso de análisis omite lecturas con múltiples alineaciones), el análisis posterior de alineaciones suplementarias de archivos BAM mostró que estas regiones se amplificaron con éxito (no se muestran los datos). La evaluación del efecto del aporte vírico en el rendimiento demostró que puede que las lecturas mapeadas no se traduzcan en una cobertura completa del genoma para muestras con títulos bajos (figura 3B).

Secuenciación del hRSV

Los resultados de secuenciación mostraron que ambos grupos de cebadores evaluados pudieron amplificar los genomas de hRSV-A/B (figura 4). Un análisis posterior mostró que la menor profundidad de cobertura observada en las amplificaciones de hRSV-A/B con el grupo de cebadores del WCCRRRI correspondía al amplicón más largo (unos 4300 pb, figuras 4A, 4C).⁵ Aunque se recomienda PrimalScheme para el diseño de amplicones, estos resultados muestran que otros diseños de cebadores pueden proporcionar una cobertura genómica completa con modificaciones del protocolo. Una mayor optimización podría ser la incorporación de los genomas más recientes del hRSV enviados a GISAID en el diseño de cebadores selectivos de las cepas más frecuentes y actuales de este virus.

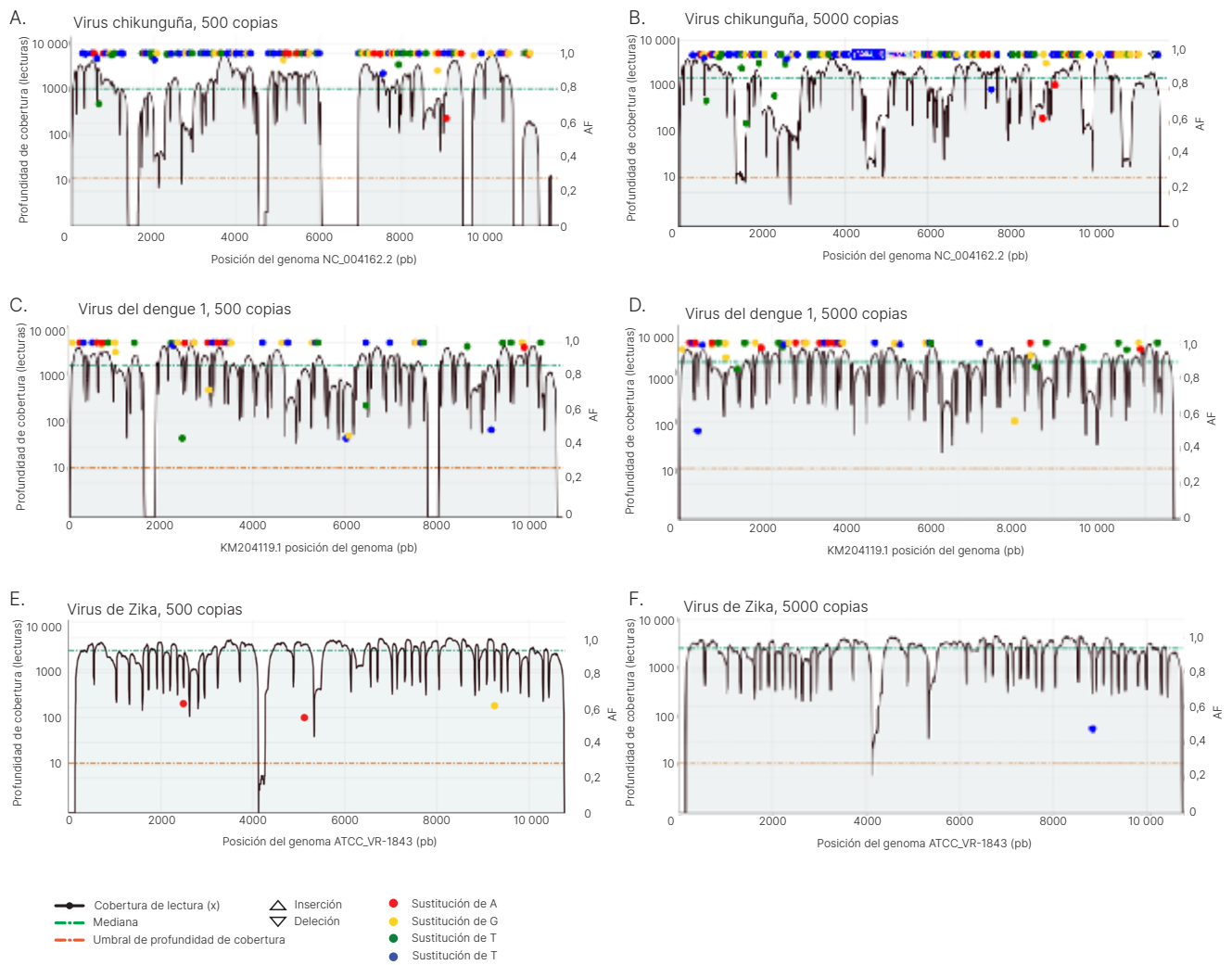


Figura 2: Cobertura del genoma de arbovirus de la aplicación DRAGEN Targeted Microbial. Los resultados de secuenciación de arbovirus, incluidos (A, B) el virus chikunguña, (C, D) el virus del dengue 1 y (E, F) el virus de Zika, mostraron una mediana elevada de la cobertura con un aporte de 500 copias y una mayor cobertura con 5000 copias.

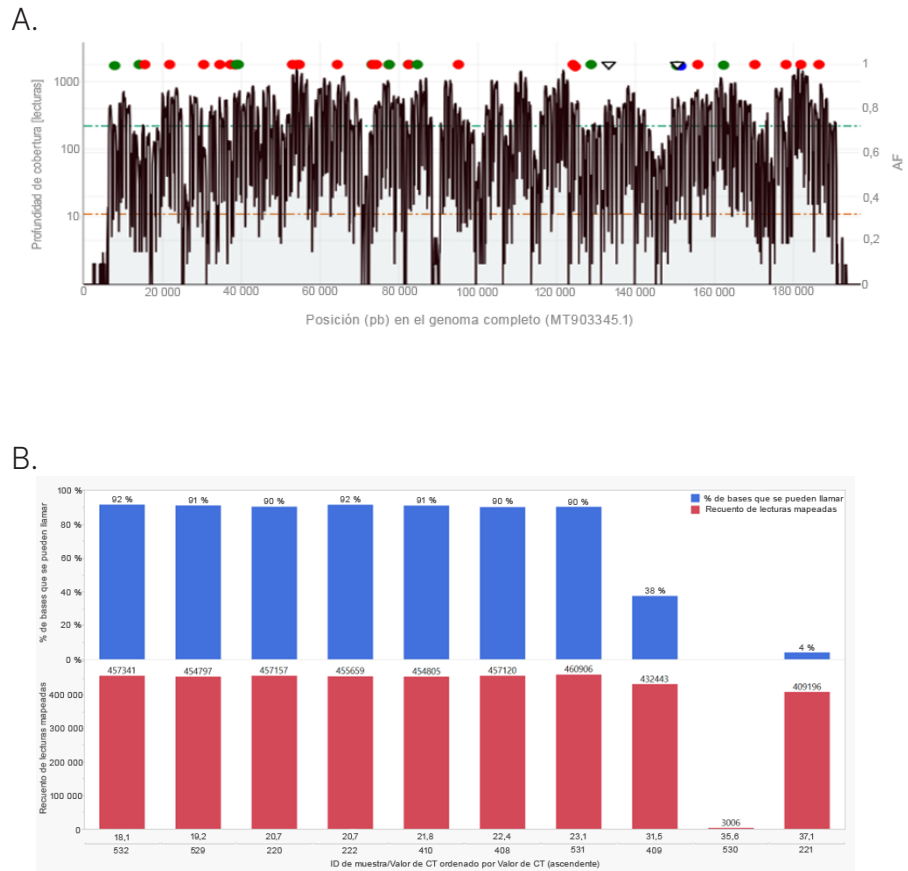


Figura 3: Cobertura del genoma del Mpx. Los resultados de secuenciación con (A) una muestra representativa del Mpx mostraron cobertura del genoma completo; (B) las muestras con titulaciones víricas bajas mostraron una cobertura reducida.

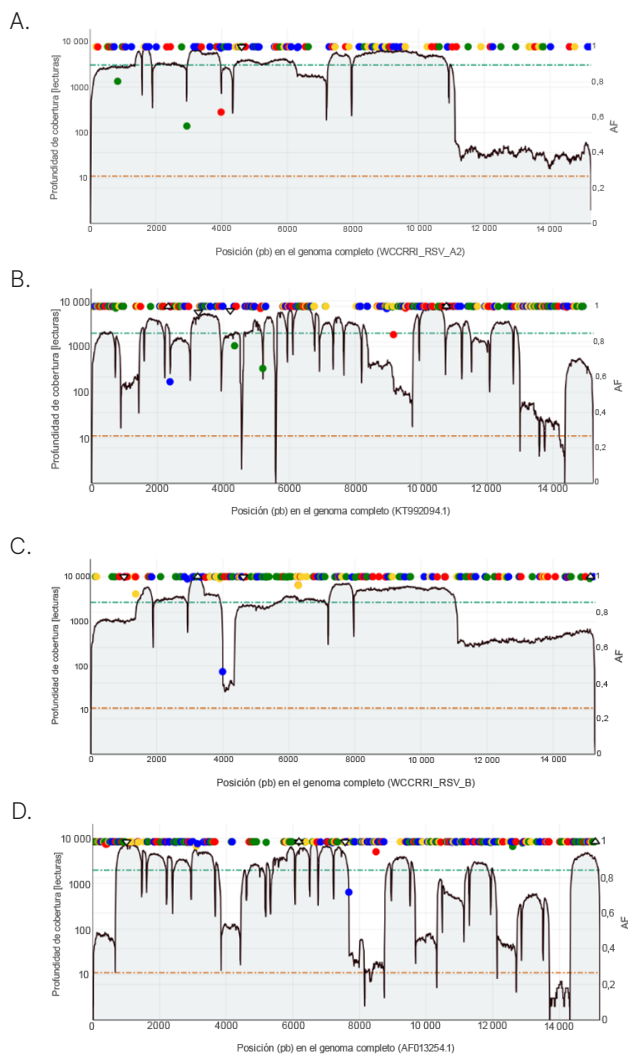


Figura 4: Cobertura del genoma de hRSV A/B. Los resultados de secuenciación con muestras representativas del hRSV-A (A, B) y el hRSV-B (C, D) mostraron que, aunque ambos diseños de cebadores amplificaron los genomas víricos, la cobertura reducida observada con el grupo de cebadores del WCCRRI (A, C) correspondía al amplicón más largo (~4300 pb).

illumina[®]

1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Si desea consultar información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html. M-GL-02215 ESP v1.0

Resumen

Illumina Microbial Amplicon Prep proporciona una solución de vigilancia genómica con un rendimiento demostrado en una amplia gama de familias de virus de ARN y ADN, y de diversos tamaños genómicos. Como se muestra en esta nota de aplicación, Illumina Microbial Amplicon Prep proporciona una cobertura completa del genoma (que aquí se define como una cobertura del genoma vírico superior al 90 %, con una cobertura de al menos 10 veces del genoma) para todos los virus evaluados. Este kit ofrece un flujo de trabajo universal con la flexibilidad de poder personalizarlo para prácticamente cualquier objetivo microbiano de interés.

Más información

[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)

Bibliografía

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. Fecha de publicación: 26 de julio de 2022. Fecha de consulta: 28 de agosto de 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.