

illumina Microbial Amplicon Prep para vigilância viral

Desempenho flexível com
cobertura abrangente do
genoma viral



Introdução

A vigilância genômica para micróbios patogênicos é uma ferramenta crucial para a saúde pública. A necessidade é justificada por surtos contínuos e pelo impacto das mudanças climáticas, da invasão do habitat e dos eventos contínuos de transmissão zoonótica.¹

O Illumina Microbial Amplicon Prep fornece uma ferramenta de vigilância genômica personalizável com um fluxo de trabalho simplificado e definido através do mesmo processo químico do Illumina COVIDSeq™ Assay (figura 1). O fluxo de trabalho integra a preparação de amostras e bibliotecas (incluindo conversão de cDNA para alvos de RNA, amplificação de PCR, tagmentação, amplificação de biblioteca e reagentes de limpeza de beads), bem como o sequenciamento comprovado da Illumina e o DRAGEN™ secondary analysis. Para demonstrar a ampla capacidade de sequenciamento do genoma completo (WGS) do vírus com o Illumina Microbial Amplicon Prep, vários arbovírus (Chikungunya, Dengue 1 e Zika), vírus da varíola e vírus sincicial respiratório humano (hRSV) A/B foram testados através de conjuntos de primers oriundos de ferramentas de design de primer de código aberto ou por meio da literatura científica estabelecida com pequenas modificações no protocolo. Os resultados demonstram uma cobertura abrangente em genomas virais de tamanho variável, favorecendo uma vigilância eficiente.

Métodos

Preparação da amostra

Arbovírus

Para caracterizar o desempenho do ensaio Illumina Microbial Amplicon Prep para arbovírus, foram avaliados

os controles de RNA genômico comercialmente disponíveis dos vírus da Chikungunya, da Dengue 1 e da Zika (tabela 1). Os números de cópias definidos de RNA genômico foram enriquecidos em 10 ng do Universal Human Reference RNA (Agilent, n.º de catálogo 740000), funcionando como uma amostra artificial de vírus de RNA.

Tabela 1: Amostras virais usadas para avaliação.

Vírus	Fornecedor	N.º do produto
Chikungunya	Vircell	MBC099-R
Dengue 1	Vircell	MBC055-R
Zika	ATCC	VR-1843DQ

Mpox

Para caracterizar o desempenho do vírus de DNA, amostras de DNA de lesões cutâneas positivas para Mpox foram extraídas usando o QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 61104) e usadas como entrada para o ensaio Illumina Microbial Amplicon Prep na etapa Amplificar cDNA do protocolo. A carga viral das amostras foi determinada usando qPCR e realizada pela Aegis Sciences Corporation no AB 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, n.º de catálogo 4406985/4406984) para a obtenção de valores de limite de ciclo (Ct).

hRSV

Para caracterizar o desempenho do ensaio de hRSV, amostras de swab nasal (280 µl), armazenadas em meio de transporte viral, foram extraídas através do QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN, n.º de catálogo 52904). O ácido nucleico extraído foi então tratado com DNase usando o Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, n.º de catálogo R1050). As amostras foram diluídas na proporção 1:10 a fim de obter volume adicional para testes repetidos e/ou



Figura 1: fluxo de trabalho do Illumina Microbial Amplicon Prep. O Illumina Microbial Amplicon Prep faz parte de um fluxo de trabalho simplificado para WGS viral que integra a preparação de amostras e bibliotecas com sequenciamento em qualquer sistema de sequenciamento de bancada da Illumina e do DRAGEN secondary analysis.

otimização de ensaio. O qPCR foi realizado conforme o protocolo, as sondas projetadas pelos Centros de Controle de Doenças (CDC) e o kit de 500 × 20 µl do iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories, n.º de catálogo 1725141). Foi sugerida a inclusão de uma amostra não diluída extraída do ensaio Illumina Microbial Amplicon Prep durante o trabalho com amostras de números de cópias-alvo desconhecidos para maximizar a amplificação do alvo.

Design do primer

Todos os primers foram solicitados pela Integrated DNA Technologies (normalizados para 100 µM) e agrupados com concentrações equimolares. Os primers foram montados em dois pools para gerar dois conjuntos sobrepostos de amplicons.

Arbovírus

Embora designs de amplicon de 400 bp sejam recomendados como o tamanho padrão do amplicon no design de primers, amplicons mais longos são possíveis com alvos de RNA e de DNA. Amplicons mais longos reduzem o número de primers necessários, o risco de interações de heterodímeros, as interações de ligação fora do alvo e podem ser necessários para cobrir regiões com alta variabilidade. Amplicons mais curtos podem ser vantajosos, pois seu desempenho pode ser mais robusto com amostras degradadas e regiões difíceis de amplificar (estrutura secundária do genoma viral).

Para o vírus da Chikungunya, a sequência do genoma NC_004162.2 foi processada pela [ferramenta de software PrimalScheme](#), visando um tamanho de amplicon de 400 bp, para gerar o design do pool de primers CHIK-PP. Esse pool de primers (CHIK-PP) foi usado para testar o Amplirun Chikungunya Virus RNA Control (Vircell, n.º de catálogo MBC099-R). Para o vírus da Dengue 1, a sequência genômica KM204119.1 foi processada pela ferramenta de software PrimalScheme, visando um tamanho de amplicon de 400 bp. Esse pool de primers (DENV1- PP) foi usado para testar o Amplirun Dengue 1 Virus RNA Control (Vircell, n.º de catálogo MBC055-R). Em relação ao vírus da Zika, foi usado um design de primer existente visando um tamanho de amplicon de 400 bp, gerado por meio do PrimalScheme.² Os primers foram agrupados de maneira equimolar e testados no ensaio usando o Zika Virus RNA Control (ATCC, n.º de catálogo VR-1843DQ).



Saiba mais sobre a ferramenta PrimalScheme em www.primalscheme.com.

Mpox

Em relação ao vírus da Mpox, o gDNA foi testado usando um pool de primers otimizado, para uso no PrimalScheme, visando um tamanho de amplicon de aproximadamente 2.000 bp.³ O pool de primers de Mpox inicial contém 326 primers otimizados por meio da adição de cinco primers adicionais para tratar falhas observadas nos amplicons 11, 75 e 118, com a finalidade de criar o pool de primers MPX-GL-Yv2.

hRSV

Um design de primer do CDC⁴ e um design de primer do centro colaborador relacionado à referência e à pesquisa sobre Influenza da OMS (WCCRR1)⁵ foram testados com amostras de swab nasofaríngeo positivas para hRSV adquiridas da Discovery Life Sciences. O design de primer do CDC (hRSV-A/B-CDC20) consistiu em um design de primer para hRSVA e outro para hRSVB. Os designs de primer hRSV-A/B-CDC20 geraram 19 (hRSVA) ou 20 (hRSVB) amplicons totais visando um tamanho de amplicon de aproximadamente 925 bp. Caso o design de primer do CDC seja usado, os usuários devem determinar o subtipo de hRSV (A/B) através do qPCR com conjuntos de sondas estabelecidos para decidir qual design de primer usar.⁶ O design de primer do WCCRR1 (hRSV-WCCRR16) foi desenvolvido para gerar seis amplicons para hRSVA ou hRSVB, visando tamanhos variáveis de amplicon de aproximadamente 2.000 a 4.400 bp. Com o design de primer do WCCRR1, a determinação do subtipo de hRSV não é necessária.

Preparação da biblioteca

O [protocolo do Illumina Microbial Amplicon Prep](#) foi seguido para preparar bibliotecas para os vírus da Chikungunya, da Dengue 1 e da Zika sem modificações. Em relação ao vírus da Mpox, o DNA extraído de amostras positivas para a doença foi processado a partir da etapa Amplificar cDNA do protocolo, uma vez que a etapa de transcrição reversa não é necessária para amostras de vírus de DNA. Em relação ao hRSV, o RNA extraído foi processado seguindo o protocolo do Illumina Microbial Amplicon Prep, com as seguintes modificações:

- A etapa Recozer RNA foi modificada para a adição de 2,5 µl de EPH3 e 6 µl de água de grau molecular em vez da entrada padrão de 8,5 µl de EPH3. Testes anteriores mostraram que a redução da entrada de EPH3 melhora o desempenho com amplicons maiores que 400 bp (dados não exibidos).
- O programa de PCR da etapa Amplificar cDNA foi alterado para reduzir a temperatura de hibridização para facilitar o recozimento adequado do primer ([tabela 2](#)).

Essa temperatura foi determinada através de sequências de primers dos designs de primer do CDC20 e do WCCRRI e uma [calculadora de temperatura de melting \(Tm\)](#) on-line.

Tabela 2: Alterações no programa de PCR da etapa Amplificar cDNA.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo(s)	N.º de ciclos
1	98	180	1
2	98	15	
3	56/59 ^a	30	35
4	72	180	
5	4	retenção	—

a. A temperatura de recozimento foi reduzida de 63 °C para 56 °C e 59 °C para conjuntos de primers CDC20-RSV-A/B e WCCRRI, respectivamente. O programa de PCR foi executado por 35 ciclos.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram desnaturadas e diluídas a partir de uma biblioteca agrupada de acordo com o Guia de desnaturação e diluição de bibliotecas dos sistemas de sequenciamento NextSeq™ 500 e 550. As bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 550 System com tamanho de leitura de 2 × 149 bp e normalizadas para profundidade de leitura tipo paired-end de 1 milhão com base nas recomendações de sequenciamento atuais para o ensaio COVIDSeq.

Análise de dados

Os dados de sequenciamento foram analisados usando o aplicativo DRAGEN Targeted Microbial, disponível no BaseSpace™ Sequence Hub. O aplicativo de fácil uso alinha leituras a genomas de referência, variantes de identificações e gera uma sequência do genoma em consenso que representa a população de espécies de ácido nucleico na amostra. Quando disponíveis, bancos de dados externos selecionados foram acessados para análise de linhagem adicional.

Resultados

Sequenciamento de arbovírus

O sequenciamento de bibliotecas de arbovírus resultou em uma mediana de réplica técnica de 80% e 96% com 10 vezes ou mais a cobertura genômica a 500 e 5.000 entradas de cópia viral, respectivamente, para o vírus da Chikungunya ([figura 2A, 2B](#)); uma mediana de 94% e 98,5% do genoma com cobertura genômica de 10 vezes ou mais

a 500 e 5.000 entradas de cópia viral, respectivamente, para o vírus da Dengue 1 ([figura 2C, 2D](#)); e uma mediana de 97,2% e 98,5% com cobertura genômica de 10 vezes ou mais a 500 e 5.000 entradas de cópia viral, respectivamente, para o vírus da Zika ([figura 2E, 2F](#)).

Para todos os arbovírus sequenciados, a cobertura aumentou, elevando a entrada de cópias virais e demonstrando variabilidade de desempenho por título viral. O alinhamento da leitura de sequenciamento produziu a detecção de múltiplas substituições no genoma de referência viral usado para análise e design do primer. Essas substituições podem causar redução na cobertura ou falha de amplicon se ocorrerem em locais de ligação do primer, especialmente em direção à ponta 3' dos primers. Foi observada uma discrepância de substituição entre bibliotecas que realizaram o ensaio da mesma amostra viral ou controle ([figura 2E, 2F](#)). As réplicas técnicas podem ser úteis para amplicons que se amplificam de forma inconsistente e são recomendadas para confirmar a identificação da variante no aplicativo DRAGEN Targeted Microbial.

Sequenciamento de Mpox

O sequenciamento do vírus Mpox resultou em uma cobertura robusta do genoma em 1 milhão de leituras tipo paired-end, apesar de ter sido testado um genoma aproximadamente 20 vezes maior do que o arbovírus ([figura 3A](#)). Embora a cobertura de repetições terminais invertidas (ITR) não esteja representada (devido ao pipeline de análise omitir leituras com vários alinhamentos), a análise subsequente dos alinhamentos suplementares de arquivos BAM mostrou que essas regiões foram amplificadas com êxito (dados não exibidos). A avaliação do efeito da entrada viral no desempenho demonstrou que as leituras mapeadas podem não se traduzir em cobertura genômica completa em amostras de baixa titulação ([figura 3B](#)).

Sequenciamento de hRSV

Os resultados do sequenciamento mostraram que ambos os pools de primer avaliados foram capazes de amplificar genomas de hRSV-A/B ([figura 4](#)). Análises adicionais mostraram que a profundidade de cobertura reduzida observada no hRSV-A/B amplificado com o pool de primers do WCCRRI correspondeu ao amplicon mais longo (aproximadamente 4300 bp, [figura 4A, 4C](#)).⁵ Embora o PrimalScheme seja recomendado para o projeto do amplicon, esses resultados mostram que outros projetos de primers podem fornecer cobertura genômica abrangente com modificações do protocolo. A otimização adicional pode incorporar os genomas de hRSV mais recentes enviados à GISAID no projeto do primer para direcionar as cepas de hRSV mais prevalentes e atuais.

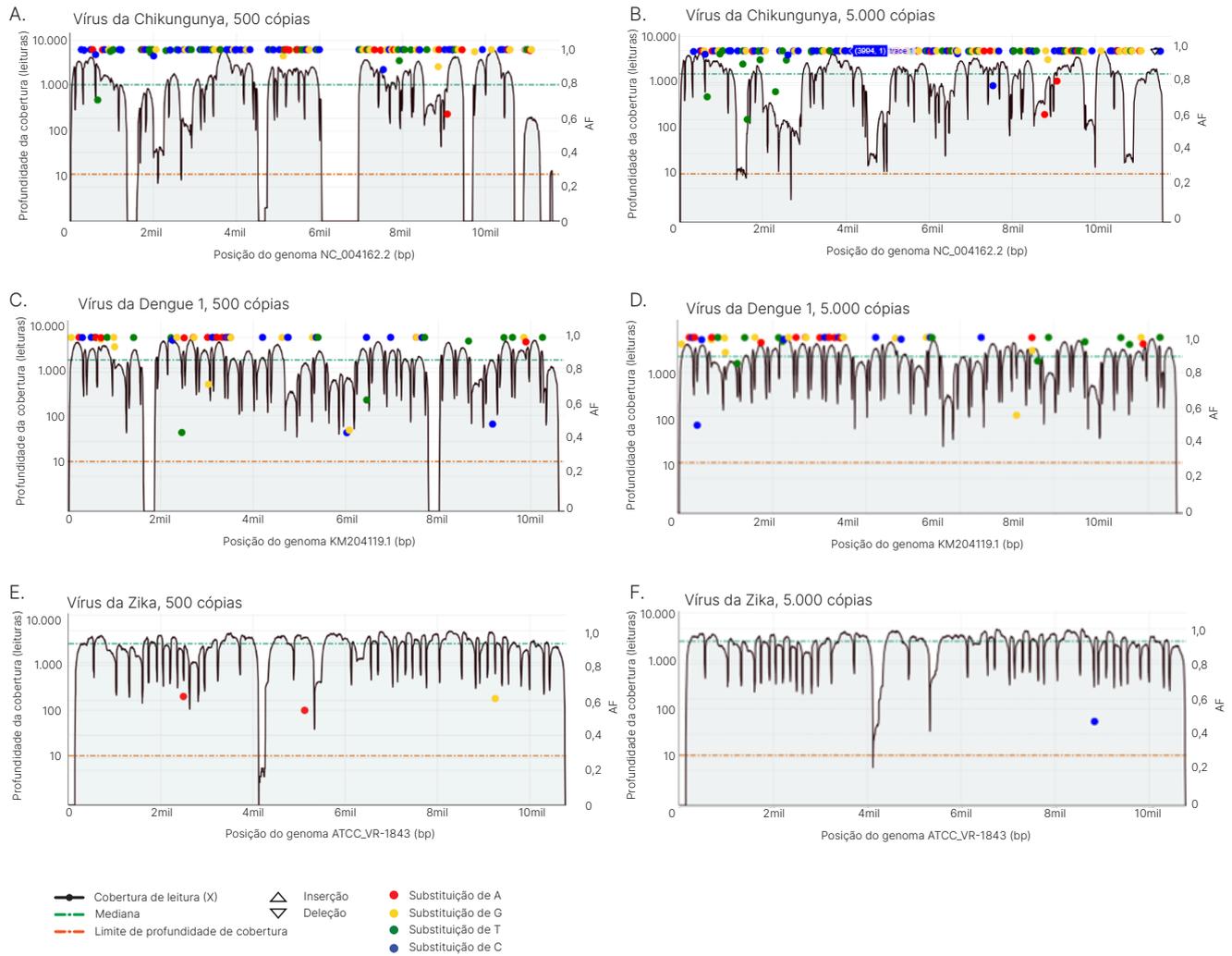


Figura 2: cobertura do genoma do arbovírus oriunda do aplicativo DRAGEN Targeted Microbial. Os resultados do sequenciamento de arbovírus, incluindo (A, B) vírus da Chikungunya, (C, D) vírus da Dengue 1 e (E, F) vírus da Zika mostraram alta cobertura mediana em 500 cópias de entrada e maior cobertura com 5.000 cópias.

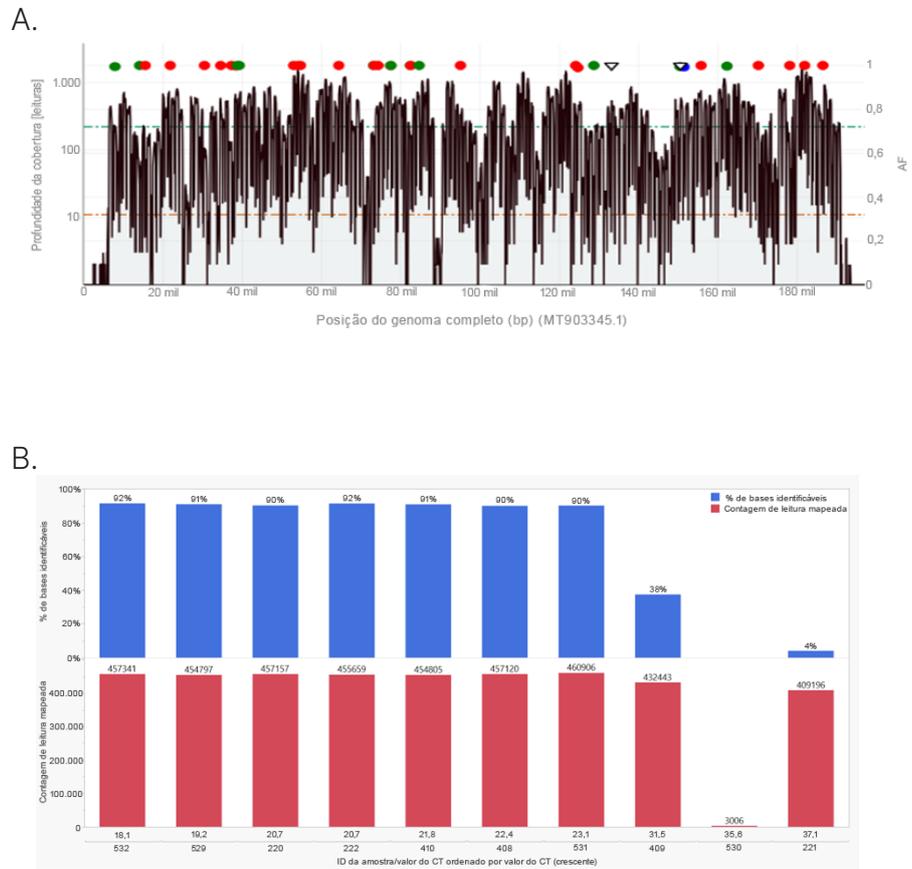


Figura 3: cobertura do genoma da Mpx: os resultados do sequenciamento com (A) uma amostra representativa do vírus da Mpx mostraram cobertura em todo o genoma; (B) amostras com baixa titulação viral demonstraram cobertura reduzida.

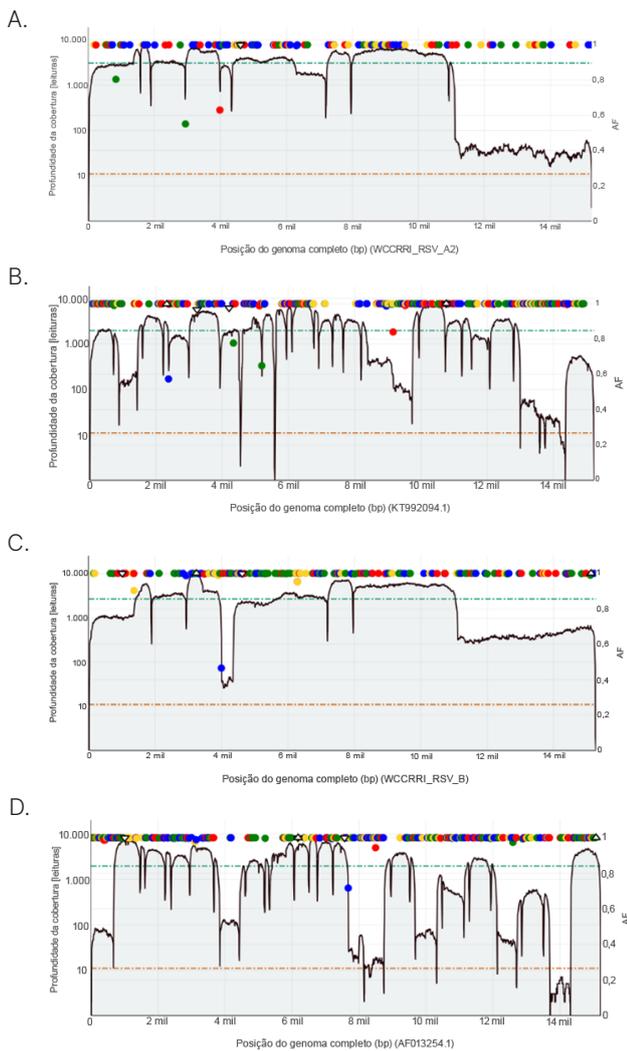


Figura 4: cobertura genômica de hRSV A/B. Os resultados do sequenciamento com amostras representativas de (A, B) hRSV-A e (C, D) hRSV-B mostraram que, embora ambos os designs de primers amplificassem genomas virais, a cobertura reduzida observada com o pool de primers (A, C) WCCRRI correspondeu ao amplicon mais longo (aproximadamente 4.300 bp).

illumina[®]

+1 (800) 809-4566, ligação gratuita (EUA) | tel. +1 (858) 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados. Todas as marcas comerciais pertencem à Illumina, Inc. ou aos respectivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02215 PTB v1.0

Resumo

O Illumina Microbial Amplicon Prep fornece uma solução de vigilância genômica com desempenho demonstrado em uma variedade de famílias virais de RNA e DNA e de tamanhos de genoma. Conforme mostrado nesta nota de aplicação, o Illumina Microbial Amplicon Prep fornece cobertura abrangente do genoma (definida aqui como > 90% do genoma viral coberto com cobertura $\geq 10\times$) para todos os vírus avaliados. Este kit oferece um fluxo de trabalho universal com a flexibilidade de personalização de praticamente qualquer alvo microbiano de interesse.

Saiba mais

[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)

Referências

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. Publicado em 26 de julho de 2022. Acessado em 28 de agosto, 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.