

# illumina Microbial Amplicon Prep per sorveglianza virale

Prestazioni flessibili per  
una copertura completa  
del genoma virale

**illumina**<sup>®</sup>

## Introduzione

La sorveglianza genomica dei microbi patogeni è uno strumento fondamentale per la salute pubblica. Questa necessità è giustificata da continue epidemie, dall'impatto del cambiamento climatico, dalle invasioni degli habitat e da continui eventi di trasmissione zoonotica.<sup>1</sup>

ILLUMINA Microbial Amplicon Prep fornisce uno strumento di sorveglianza genomica personalizzabile con un flusso di lavoro ottimizzato e consolidato che utilizza la stessa chimica di ILLUMINA COVIDSeq™ Assay (Figura 1). Il flusso di lavoro integra la preparazione dei campioni e delle librerie (inclusa la conversione del DNA complementare (cDNA, complementary DNA) per i target RNA, l'amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR, polymerase chain reaction), la tagmentazione, l'amplificazione delle librerie e i reagenti per la pulizia delle microsferi), il comprovato sequenziamento ILLUMINA e la pluripremiata analisi secondaria DRAGEN™. Per dimostrare l'ampia capacità del sequenziamento dell'intero genoma (WGS, whole-genome sequencing) del virus con ILLUMINA Microbial Amplicon Prep, sono stati analizzati diversi arbovirus (chikungunya, dengue 1 e zika), il virus Mpox e il virus respiratorio sinciziale umano (hRSV, human Respiratory Syncytial Virus) A/B utilizzando gruppi di primer provenienti da strumenti di disegno dei primer open-source o dalla letteratura scientifica consolidata con modifiche minori al protocollo. I risultati mostrano una copertura completa su genomi virali di diverse dimensioni che garantisce una sorveglianza efficace.

## Metodi

### Preparazione dei campioni

#### Arbovirus

Per caratterizzare le prestazioni del saggio ILLUMINA Microbial Amplicon Prep per gli arbovirus, sono stati valutati

i controlli dell'RNA genomico disponibili in commercio dei virus chikungunya, dengue 1 e zika (Tabella 1). I numeri di copie definite di RNA genomico sono stati aggiunti a 10 ng di RNA di riferimento umano universale (Agilent, n. di catalogo 740000) per funzionare come un campione artificiale di virus RNA.

Tabella 1: campioni virali utilizzati per la valutazione

Virus	Fornitore	N. prodotto
Chikungunya	Vircell	MBC099-R
Dengue 1	Vircell	MBC055-R
Zika	ATCC	VR-1843DQ

#### Mpox

Per caratterizzare le prestazioni sui virus a DNA, i campioni di DNA prelevati da lesioni cutanee positive a Mpox sono stati estratti utilizzando QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, n. di catalogo 61104) e utilizzati come input per il saggio ILLUMINA Microbial Amplicon Prep nella fase "Amplificazione del cDNA" del protocollo. La carica virale dei campioni è stata determinata utilizzando la PCR quantitativa (qPCR, quantitative PCR) eseguita da Aegis Sciences Corporation su AB 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, n. di catalogo 4406985/4406984) al fine di ottenere i valori di soglia del ciclo (Ct, cycle threshold).

#### hRSV

Per caratterizzare le prestazioni del saggio per hRSV, i campioni di tamponi nasali (280 µl) conservati in terreni di trasporto per contenuti virali sono stati estratti utilizzando QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, n. di catalogo 52904). L'acido nucleico estratto è stato quindi trattato con DNasi utilizzando Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, n. di catalogo R1050). I campioni sono stati quindi diluiti 1:10 per ottenere un volume aggiuntivo per l'analisi ripetuta



Figura 1: flusso di lavoro di ILLUMINA Microbial Amplicon Prep. ILLUMINA Microbial Amplicon Prep fa parte di un flusso di lavoro semplificato per il WGS virale che integra la preparazione di campioni e librerie con il sequenziamento su qualsiasi sistema di sequenziamento da banco ILLUMINA e l'analisi secondaria DRAGEN.

e/o l'ottimizzazione del saggio. La qPCR è stata eseguita utilizzando il protocollo e le sonde progettate dai Centers for Disease Control (CDC) e iTaq Universal Probes One-Step Kit 500 × 20 µl Kit (Bio-Rad Laboratories, n. di catalogo 1725141). Quando si lavora con campioni di numeri di copie target sconosciuti, si consiglia di includere un campione estratto non diluito nel saggio Illumina Microbial Amplicon Prep, al fine di massimizzare l'amplificazione del target.

## Disegno dei primer

Tutti i primer sono stati ordinati da Integrated DNA Technologies (normalizzati a 100 µM) e raggruppati in pool con concentrazioni equimolari. I primer sono stati assemblati in due pool per generare due set sovrapposti di ampliconi.

### Arbovirus

Sebbene i disegni degli ampliconi da 400 bp siano raccomandati come dimensione predefinita degli ampliconi per il disegno dei primer, con i target sia di RNA sia di DNA sono possibili ampliconi più lunghi. Ampliconi più lunghi riducono il numero di primer necessari, il rischio di interazioni eterodimeriche, interazioni del legame fuori target e possono essere necessari per coprire regioni con elevata variabilità. Gli ampliconi più brevi possono essere vantaggiosi in quanto le loro prestazioni possono essere più affidabili con campioni degradati e regioni difficili da amplificare (struttura secondaria del genoma virale).

Per il virus chikungunya, la sequenza genomica NC\_004162.2 è stata elaborata dallo [strumento software PrimalScheme](#), che ha come target una dimensione dell'amplicone di 400 bp, per generare il disegno del pool di primer CHIK-PP. Questo pool di primer (CHIK-PP) è stato utilizzato per analizzare l'Amplirun Chikungunya Virus RNA Control (Vircell, n. di catalogo MBC099-R). Per il virus dengue 1, la sequenza genomica KM204119.1 è stata elaborata dallo strumento software PrimalScheme, con target una dimensione dell'amplicone di 400 bp. Questo pool di primer (DENV1-PP) è stato utilizzato per analizzare l'Amplirun Dengue 1 Virus RNA Control (Vircell, n. di catalogo MBC055-R). Per il virus zika, è stato utilizzato un disegno del primer esistente con target una dimensione dell'amplicone di 400 bp generata tramite PrimalScheme.<sup>2</sup> I primer sono stati raggruppati in pool in modo equimolare e analizzati nel saggio mediante Zika Virus RNA Control (ATCC, n. di catalogo VR-1843DQ).



Ulteriori informazioni sullo strumento PrimalScheme sono disponibili alla pagina [www.primalscheme.com](http://www.primalscheme.com)

### Mpox

Per il virus Mpox, il DNA genomico (gDNA, genomic DNA) è stato analizzato utilizzando un pool di primer ottimizzato disegnato utilizzando PrimalScheme, con target una dimensione dell'amplicone di circa 2.000 bp.<sup>3</sup> Il pool di primer Mpox iniziale contiene 326 primer ottimizzati mediante l'inserimento di cinque primer aggiuntivi per risolvere i dropout osservati negli ampliconi 11, 75 e 118 al fine di creare il pool di primer MPX-GL-Yv2.

### hRSV

Un disegno di primer del CDC<sup>4</sup> e un disegno di primer del WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (WCCRR)<sup>5</sup> sono stati analizzati con campioni di tamponi nasofaringei positivi all'hRSV acquisiti da Discovery Life Sciences. Il disegno del primer CDC (hRSV-A/B-CDC20) consisteva in un disegno del primer per hRSVA e in un altro disegno del primer per hRSVB. I disegni dei primer hRSV-A/B-CDC20 hanno generato un totale di 19 ampliconi (hRSVA) o 20 ampliconi (hRSVB) con target una dimensione degli ampliconi di circa 925 bp. Se si utilizza il disegno del primer CDC, gli utenti devono determinare il sottotipo di hRSV (A/B) utilizzando la qPCR con gruppi di sonde stabiliti per decidere quale disegno del primer utilizzare.<sup>6</sup> Il disegno del primer WCCRR (hRSV-WCCRR16) è progettato per generare sei ampliconi per hRSVA o per hRSVB, con target dimensioni variabili degli ampliconi da circa 2.000 a 4.400 bp. Con il disegno del primer WCCRR, la determinazione del sottotipo di hRSV non è richiesta.

## Preparazione delle librerie

Per preparare le librerie per il virus chikungunya, dengue 1 e zika è stato seguito il [protocollo Illumina Microbial Amplicon Prep](#) senza modifiche. Per il virus Mpox, il DNA estratto da campioni positivi a Mpox è stato elaborato a partire dalla fase "Amplificazione del cDNA" del protocollo, poiché la fase di trascrizione inversa non è richiesta per i campioni di virus a DNA. Per l'hRSV, l'RNA estratto è stato elaborato seguendo il protocollo Illumina Microbial Amplicon Prep, con le seguenti modifiche:

- La fase "Appaiamento dell'RNA" è stata modificata per aggiungere 2,5 µl di EPH3 e 6 µl di acqua di grado molecolare anziché l'input predefinito di 8,5 µl di EPH3. Test precedenti hanno dimostrato che la riduzione dell'input di EPH3 migliora le prestazioni con ampliconi più grandi di 400 bp (dati non mostrati).
- Il programma PCR "Amplificazione del cDNA" è stato modificato per ridurre la temperatura di appaiamento e facilitare il corretto appaiamento dei primer ([Tabella 2](#)). Questa temperatura è stata determinata utilizzando le sequenze di primer dei disegni dei primer CDC20 e WCCRR e un [Tm Calculator](#) online.

Tabella 2: modifiche al programma PCR  
"Amplificazione del cDNA"

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (s)	N. di cicli
1	98	180	1
2	98	15	
3	56/59 <sup>a</sup>	30	35
4	72	180	
5	4	sospeso	—

a. La temperatura di appaiamento è stata ridotta da 63 °C a 56 °C e a 59 °C rispettivamente per i gruppi di primer CDC20-RSV-A/B e WCCRR1. Il programma PCR è stato eseguito per 35 cicli.

## Sequenziamento

Le librerie preparate sono state denaturate e diluite da una libreria raggruppata in pool secondo la Guida alla denaturazione e alla diluizione delle librerie di NextSeq™ 500 Sequencing System e NextSeq 550 Sequencing System. Le librerie sono state sequenziate su NextSeq 550 System a una lunghezza di lettura di 2 × 149 bp e normalizzate a una profondità di lettura paired-end pari a un milione in base alle attuali raccomandazioni di sequenziamento per il saggio COVIDSeq.

### Analisi dei dati

I dati di sequenziamento sono stati analizzati utilizzando la DRAGEN Targeted Microbial App, disponibile in BaseSpace™ Sequence Hub. L'app di facile utilizzo allinea le letture ai genomi di riferimento, identifica le varianti e genera una sequenza di genomi con consenso che rappresenta la popolazione delle specie di acido nucleico nel campione. Quando disponibili, per un'ulteriore analisi dei lignaggi, è stato possibile accedere a database esterni selezionati.

## Risultati

### Sequenziamento dell'arbovirus

Il sequenziamento delle librerie di arbovirus ha determinato una mediana di replicati tecnici dell'80% e del 96% della copertura del genoma pari ad almeno 10 volte rispettivamente a 500 e 5.000 input di copie virali per il virus chikungunya (Figura 2A, 2B), una mediana del 94% e del 98,5% della copertura del genoma pari ad almeno 10 volte rispettivamente a 500 e 5.000 input di copie virali per il virus dengue 1 (Figura 2C, 2D) e una mediana del 97,2% e del 98,5% della copertura del genoma pari ad almeno 10 volte rispettivamente a 500 e 5.000 input di copie virali per il virus zika (Figura 2E, 2F).

Per tutti gli arbovirus sequenziati, la copertura è aumentata con un maggiore input di copie virali, dimostrando la variabilità delle prestazioni per titolo virale. L'allineamento delle letture di sequenziamento ha prodotto il rilevamento di sostituzioni multiple sul genoma di riferimento virale utilizzato per l'analisi e il disegno dei primer. Queste sostituzioni potrebbero causare una copertura ridotta o un dropout dell'amplicone se si verificano nei siti di legame del primer, specialmente verso l'estremità 3' dei primer. È stata osservata una discrepanza di sostituzione tra le librerie che analizzavano lo stesso campione virale o il controllo (Figura 2E, 2F). I replicati tecnici possono essere utili per gli ampliconi con amplificazione incoerente e sono raccomandati per confermare l'identificazione di varianti nella DRAGEN Targeted Microbial App.

### Sequenziamento Mpox

Il sequenziamento del virus Mpox ha prodotto un'efficace copertura del genoma a un milione di letture paired-end, nonostante un genoma circa 20 volte più grande rispetto agli arbovirus analizzati (Figura 3A). Sebbene la copertura delle ripetizioni terminali invertite (ITR, inverted terminal repeat) non sia rappresentata (a causa dell'omissione da parte della pipeline di analisi delle letture con più allineamenti), la successiva analisi degli allineamenti supplementari del file BAM ha mostrato che queste regioni sono state amplificate correttamente (dati non mostrati). La valutazione dell'effetto dell'input virale sulle prestazioni ha dimostrato che le letture mappate potrebbero non tradursi in una copertura completa del genoma per i campioni a bassa titolazione (Figura 3B).

### Sequenziamento hRSV

I risultati del sequenziamento hanno mostrato che entrambi i pool di primer valutati erano in grado di amplificare i genomi hRSV-A/B (Figura 4). Un'ulteriore analisi ha mostrato che la profondità di copertura ridotta osservata in hRSV-A/B amplificato con il pool di primer WCCRR1 corrispondeva all'amplicone più lungo (circa 4.300 bp, Figura 4A, 4C).<sup>5</sup> Sebbene PrimalScheme sia raccomandato per il disegno dell'amplicone, questi risultati mostrano che altri disegni dei primer possono fornire una copertura genomica completa con modifiche al protocollo. Un'ulteriore ottimizzazione potrebbe incorporare gli ultimi genomi di hRSV inviati a GISAID nel disegno dei primer per mirare ai ceppi di hRSV più frequenti e attuali.

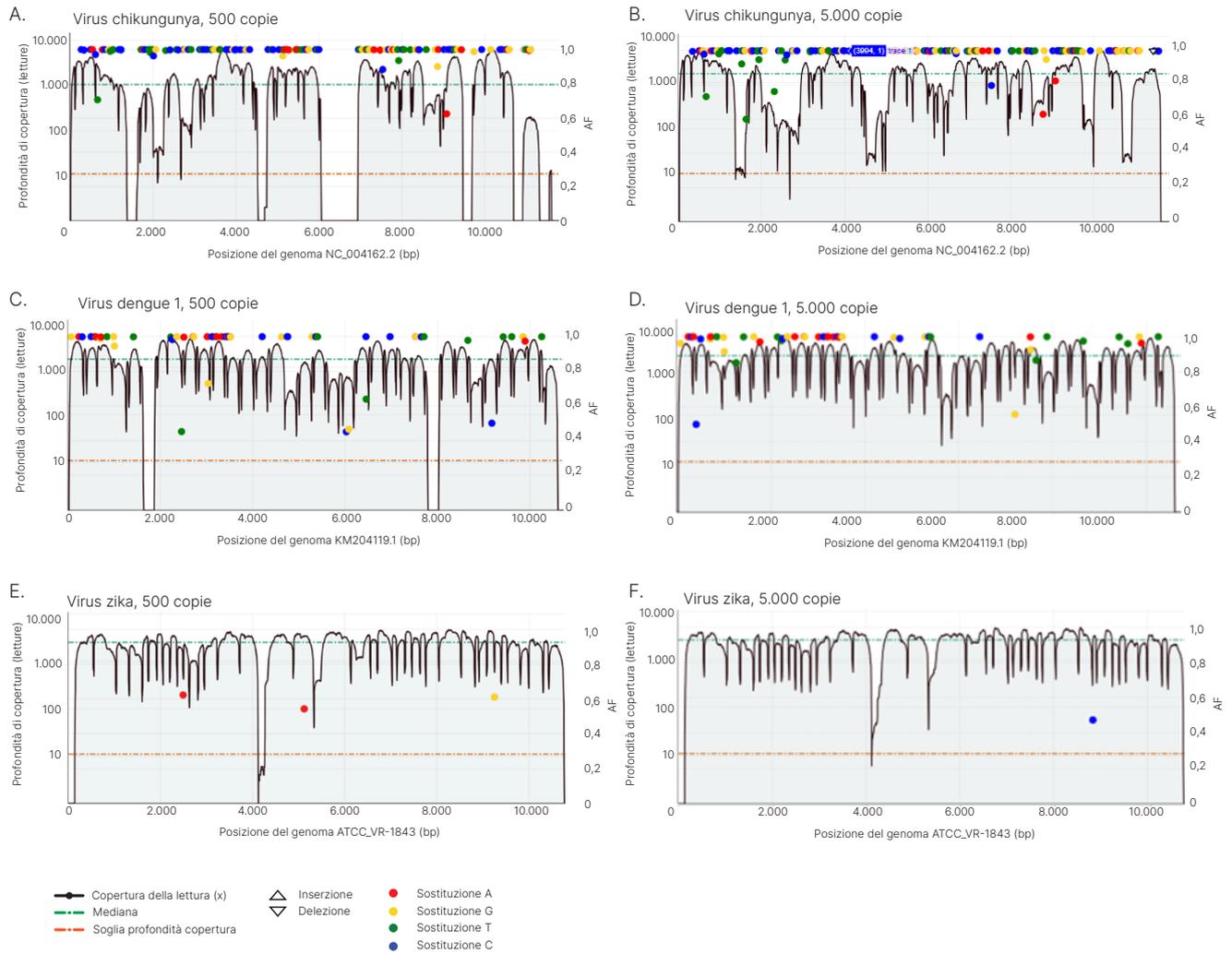


Figura 2: copertura del genoma dell'arbovirus da DRAGEN Targeted Microbial App. I risultati del sequenziamento degli arbovirus, inclusi il virus chikungunya (A, B), il virus dengue 1 (C, D) e il virus zika (E, F) hanno mostrato un'elevata copertura mediana a 500 copie di input e una maggiore copertura con 5.000 copie.

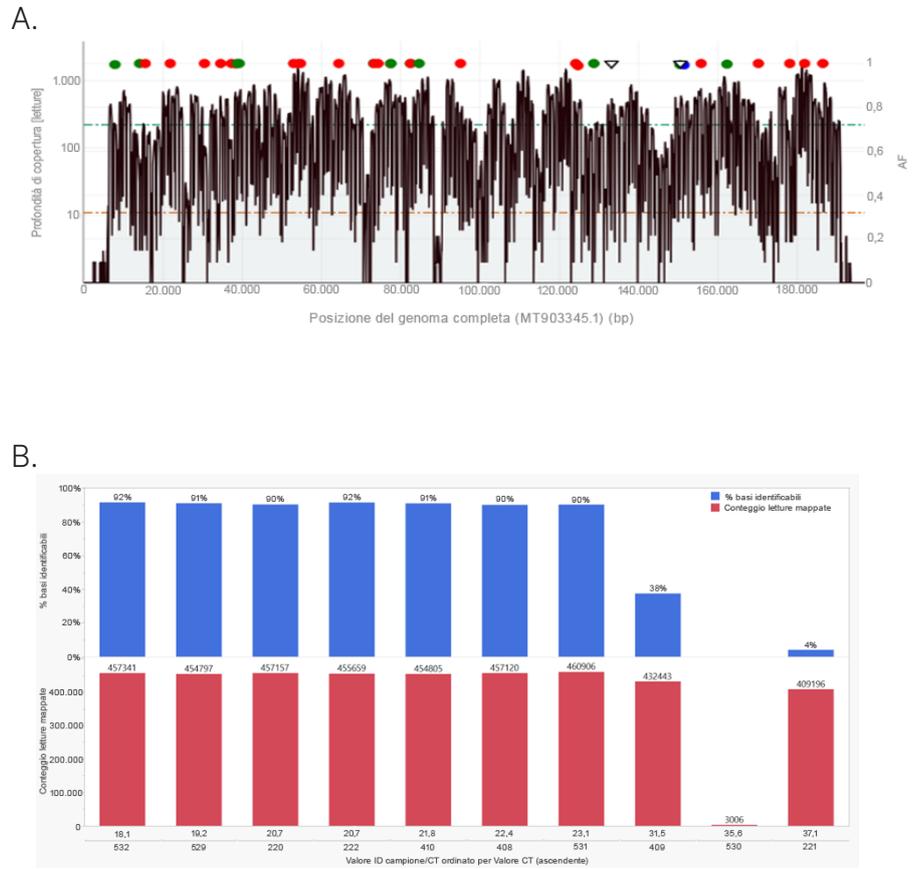


Figura 3: copertura del genoma Mpox. I risultati del sequenziamento con (A) un campione rappresentativo del virus Mpox hanno mostrato una copertura su tutto il genoma; (B) campioni a bassa titolazione virale hanno mostrato una copertura ridotta.

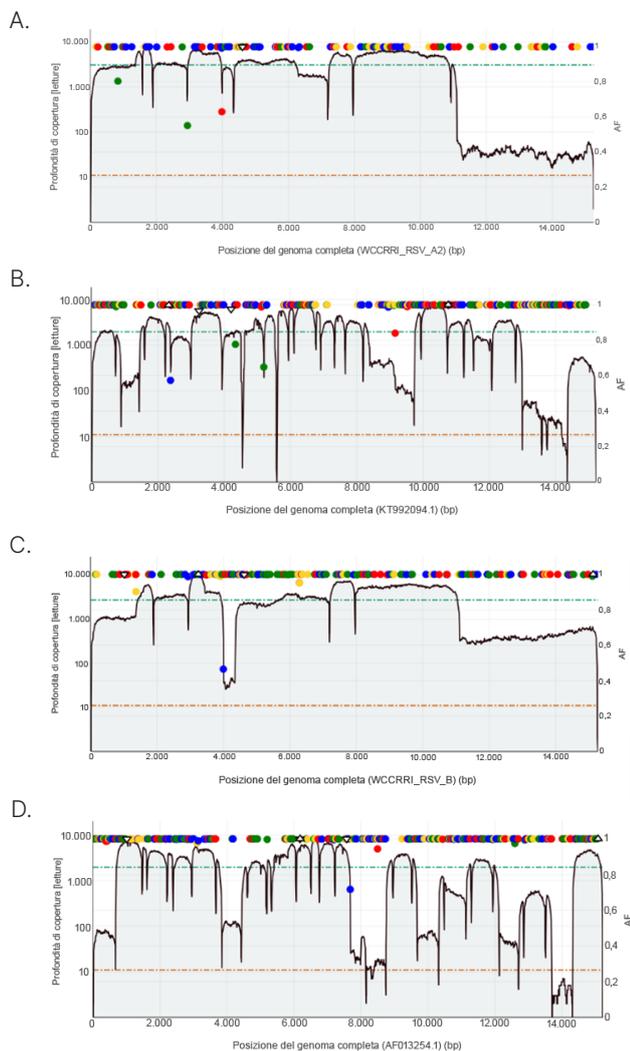


Figura 4: copertura del genoma di hRSV A/B. I risultati del sequenziamento con campioni rappresentativi di hRSV-A (A, B) e hRSV-B (C, D) hanno mostrato che, sebbene entrambi i disegni dei primer abbiano amplificato i genomi virali, la copertura ridotta osservata con il pool di primer WCCRR1 (A, C) corrispondeva all'amplicone più lungo (circa 4.300 bp).

**illumina**<sup>®</sup>

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).  
M-GL-02215 ITA v1.0

## Riepilogo

Illumina Microbial Amplicon Prep fornisce una soluzione di sorveglianza genomica con prestazioni comprovate su una gamma di famiglie virali a RNA e DNA e dimensioni del genoma. Come mostrato in questa nota sull'applicazione, Illumina Microbial Amplicon Prep fornisce una copertura completa del genoma (definita qui come più del 90% del genoma virale con una copertura di almeno 10 volte) per tutti i virus valutati. Questo kit fornisce un flusso di lavoro universale con la flessibilità di personalizzare praticamente qualsiasi target microbico di interesse.

## Maggiori informazioni

[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)

## Bibliografia

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. Pubblicato il 26 luglio 2022. Consultato il 28 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.