

Sequenzierung des HIV-Genoms auf der MiSeq™ i100 Series

Genauer Nachweis und entsprechende Charakterisierung von HIV-1



Schnelle Untersuchung des HIV-Gens *pol* mit Illumina Microbial Amplicon Prep für den Virus- und Wirkstoffresistenznachweis



Umfassende Sequenzierung des HIV-Genoms mit dem Viral Surveillance Panel v2 zur Verfolgung der Virusentwicklung sowie zum Nachweis von über 200 weiteren viralen Pathogenen



Flexibler umfassender Workflow einschließlich Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und DRAGEN™-Sekundäranalyse

Einleitung

Die Symptome von AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome, erworbenes Immunschwächesyndrom) wurden erstmals 1981 beschrieben und in den folgenden Jahren auf eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus vom Typ 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2) zurückgeführt.¹⁻⁴ Die HIV-Pandemie hatte bislang weltweit mehr als 88 Millionen HIV-Infektionen bei Menschen zur Folge, von denen mehr als 42 Millionen tödlich verliefen.⁵ Allein im Jahr 2023 wurden ca. 1,3 Millionen Neuinfektionen und 630.000 Todesfälle gemeldet.⁶

Fortschritte bei der Krankheitsprävention und der Entwicklung wirksamer antiretroviraler Therapien haben die HIV-Pandemie weitgehend zu einer behandelbaren chronischen Erkrankung gemacht sowie das Risiko einer HIV-Übertragung und des Fortschreitens der Erkrankung zu AIDS deutlich reduziert.⁷⁻⁹ Allerdings zeigt sich an der anhaltenden HIV-Übertragung in gefährdeten Populationen weltweit, dass die HIV-Surveillance nach wie vor erforderlich ist.⁸ Die molekulare Surveillance mithilfe von NGS (Next-Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ermöglicht den Nachweis von gegenüber antiretroviralen Wirkstoffen resistenten Varianten, die Verfolgung der HIV-Übertragung (einschließlich der von wirkstoffresistenten HI-Viren), den Nachweis mit HIV-Tropismus assoziierten Varianten und die Nachverfolgung der Virusentwicklung im Wirt.^{10,11} Insbesondere Mutationen im HIV-Gen *pol* können eine Resistenz gegenüber Proteaseinhibitoren (PI), Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs), nichtnukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs) und Integrase-Strangtransfer-Inhibitoren (INSTIs) bewirken.¹² Daher ist das HIV-Gen *pol* ein wichtiges Ziel für den genotypischen Nachweis antiretroviraler Wirkstoffresistenz.

Der vorliegende Anwendungshinweise zeigt den Nachweis und die Charakterisierung von HIV in HIV-positivem Blutplasma und für Forschungszwecke erstellten Proben unter Verwendung eines NGS-Workflows, der die Illumina-Bibliotheksvorbereitung, die Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und die DRAGEN-Sekundäranalyse umfasst (Abbildung 1).

Methoden

Proben

Die HIV-positiven Plasmaproben wurden von [BIOFLUIDS.com](https://www.biofluids.com) bezogen. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 52904), wobei das Mini-Spin-Verfahren unter Auslassung der Zugabe von Träger-RNA zu Buffer AVL zur Anwendung kam.* Bei den für Forschungszwecke erstellten Proben für Tests kam gereinigte RNA zum Einsatz, die aus Viren extrahiert wurde, die in von SeraCare bereitgestellten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, Peripheral Blood Mononuclear Cells) vermehrt wurden (Tabelle 1). Kontrollproben mit vier prävalenten HIV-1-Subtypen wurden per Spike-in in 10 ng Human Universal Reference RNA (UHRR) gegeben, woraus sich eine Gesamtzugabe von 690 Viruskopien/µl für Illumina Microbial Amplicon Prep und 1.176 Viruskopien/µl für Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 ergibt, anhand derer sich die Performance bei unterschiedlichen HIV-1-Subtypen der Gruppe M beurteilen lässt (Tabelle 1).¹³

* Voraussetzung für gute Performance ist die ausreichende Zugabe viraler Nukleinsäure. Ergänzungen der Extraktionsmethode wie die Zentrifugation mit Saccharose (Dichtegradient) oder die Zugabe von Träger-RNA können die Sensitivität erhöhen, insbesondere bei Proben mit niedrigem Titer.¹⁴

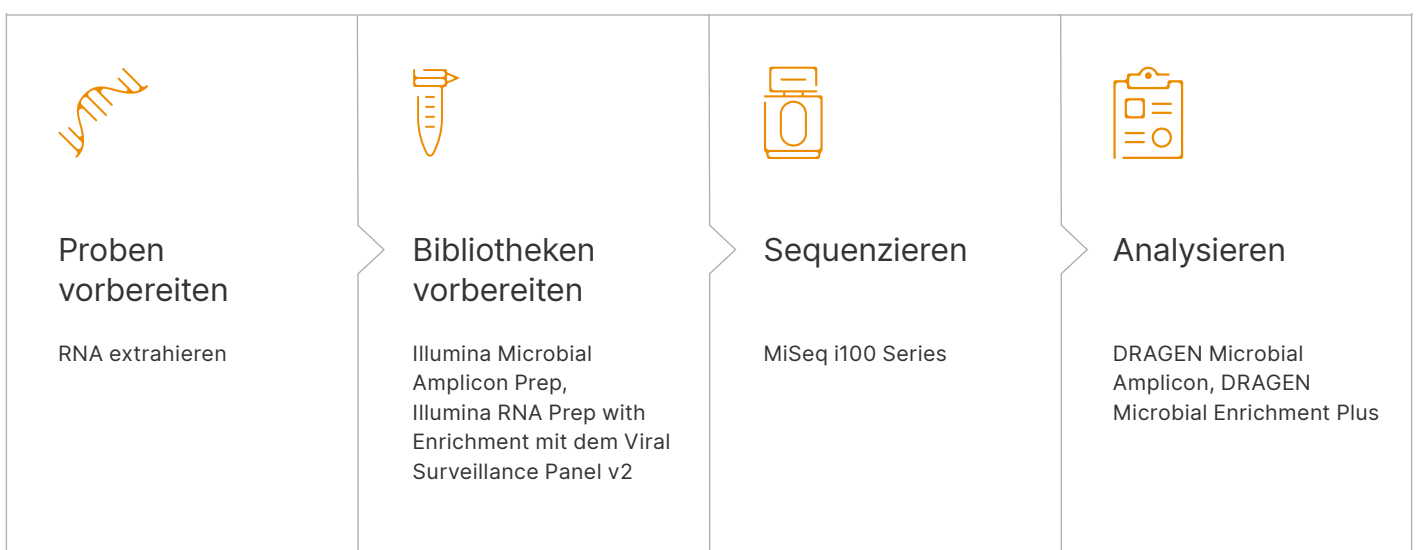


Abbildung 1: Umfassender NGS-Workflow für die HIV-Surveillance

Die Kombination der Illumina-Bibliotheksvorbereitung auf Basis eines ampliconbasierten oder Target-Anreicherungsverfahrens mit der Sequenzierung auf der MiSeq i100 Series und der DRAGEN-Sekundäranalyse ermöglicht die genaue Genomcharakterisierung von HIV.

Tabelle 1: Gereinigte RNAs für Subtypkontrollproben

SeraCare-Produktname	Material-Nr.	Isolat-ID
HIV-1 Purified RNA subtype C	0400-0079	DJ259
HIV-1 Purified RNA subtype B	0400-0078	US1
HIV-1 Purified RNA subtype CRF01-AE	0400-0084	POC30506
HIV-1 Purified RNA subtype CRF02-AG	0400-0076	POC44951

Bibliotheksvorbereitung

Die gezielte Sequenzierung von HIV wurde per Amplicon-Sequenzierung mit Illumina Microbial Amplicon Prep (Illumina, Katalog-Nr. 20097857) und per Target-Anreicherung mit Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 (Illumina, Katalog-Nr. 20108081) durchgeführt.

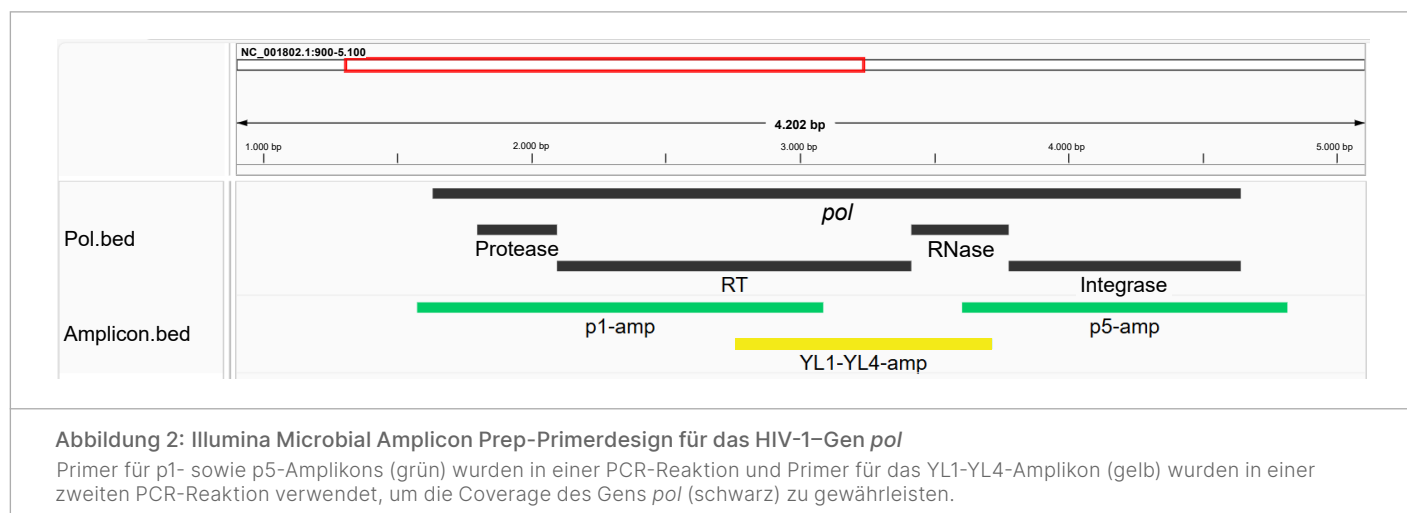
Amplicon-Sequenzierung

Für Illumina Microbial Amplicon Prep wurden von Integrated DNA Technologies (IDT) anwendungsspezifische Primer bezogen, einschließlich zuvor veröffentlichter Primer¹⁵ und ergänzender Primer, die von Illumina-Wissenschaftlern zur Gewährleistung der Amplifikation des HIV-Gens *pol* für mehrere HIV-1-Subtypen entwickelt wurden. Die Primer wurden auf 10 µM pro Pool verdünnt (Tabelle 2). Da sich die Positionen der auf das Gen *pol* abzielenden Amplicons relativ zum HIV-1-Genom überlappen, wurden Primer in zwei separaten Röhrcen gepoolt und in zwei unabhängigen Reaktionen für die Amplicon-PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) verwendet. Dieser Ansatz ist erforderlich, um die Bildung kleiner Amplicons zu verhindern, und ermöglicht Ampliconschemata, die jenen von ARTIC entsprechen¹⁶ (Abbildung 2).

Tabelle 2: Anwendungsspezifische Primer zur Amplifikation von HIV-1 mit Illumina Microbial Amplicon Prep

Primer-Name	Primersequenz 5'–3'
P1-F v2	AAGGGYTGTTGGAAATGYGG
P1-R v2	CTGTADTTCTGCTAYTAAMTTTTTGATGG
P1-F	TTGAAATGTGGAAAGGAAGGAC
P1-R	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG
P5-F	GGAATCATTCAAGCACACCAGA
P5-F v2	TATGCAYTAGGAATYATTCARGCAC
P5-R	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATAT
P5-R v2	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATG
Primer-Name	Primersequenz 5'–3'
YL1	AGAACCYCCATTCTTYGGATGGG
YL1 v2	AAGCATCAAAGGAACCTCCCTT
YL4	CCTTTGTGTGCTGGTACCCATG
YL4 v2	CCACATGGACAGCAACTATTATG

Die von Illumina-Wissenschaftlern zur Steigerung der taxonomischen Coverage entwickelten ergänzenden Primer werden im Namen mit „v2“ gekennzeichnet (von Integrated DNA Technologies bereitgestellt).



Sequenzierungsfertige Bibliotheken wurden mit dem geringfügig abgeänderten Illumina Microbial Amplicon Prep-Protokoll vorbereitet, einschließlich der Verringerung der Random-Hexamer-Zugabe (2,5 µl statt 8,5 µl), der RNA-Zugabe (14,5 µl statt 8,5 µl) sowie des Amplikon-Zugabevolumens für die Tagmentierungsreaktion (10 µl aus p1- und p5-Amplifikationsreaktionen, 5 µl aus der YL1-YL4-Amplifikationsreaktion und 5 µl aus DEPC H₂O).

Target-Anreicherung

Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 zielt auf das gesamte HIV-1- bzw. HIV-2-Genom ab und ermöglicht die Genomsequenzierung (WGS, Whole-Genome Sequencing) bei HIV und ca. 200 zusätzlichen Viren. Sequenzierungsfertige Bibliotheken wurden gemäß dem Herstellerprotokoll vorbereitet.

Sequenzierung

Die vorbereiteten Bibliotheken wurden auf dem MiSeq i100 Plus System mit einer 25M-Fließzelle und einer Laufkonfiguration von 2 × 150 bp sequenziert.

Datenanalyse

Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die Daten mithilfe der FASTQ Toolkit App auf 0,5 Mio. Cluster/1 Mio. Paired-End(PE)-Reads bzw. 1 Mio. Cluster/2 Mio. PE-Reads für Illumina Microbial Amplicon Prep und Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 normalisiert. Normalisierte Daten wurden mit den Apps DRAGEN Microbial Amplicon und DRAGEN Microbial Enrichment Plus in der Cloud in BaseSpace™ Sequence Hub analysiert. Diese Apps sind auch auf dem MiSeq i100 Plus System verfügbar. Informationen zu Wirkstoffresistenzen wurden durch Eingabe normalisierter FASTQs in die öffentlich verfügbare Stanford-Datenbank gewonnen.¹⁷

Die DRAGEN Microbial Enrichment Plus App führt eine referenzgesteuerte Assemblierung durch. Daher sind das richtige Panel und der zugehörige Satz von Genomreferenzsequenzen zu Viren erforderlich, auf die das Panel abzielt. Daher muss das Viral Surveillance Panel v2 in der App aus dem Drop-down-Menü des Anreicherungspanels ausgewählt werden. Trotz des großen und vielfältigen Satzes an HIV-1-Referenzgenomen, die im ausgewählten Anwendungsworkflow für den Nachweis und das Alignment verwendet werden, ist es möglich, dass ein repräsentativeres Referenzgenom für eine bestimmte Probe verfügbar und für die Analyse geeigneter ist. Daher wurde ein iterativer Ansatz gewählt, bei dem entweder der DRAGEN Microbial Enrichment Plus- oder der DRAGEN Microbial Amplicon-Workflow erneut ausgeführt wurden ([Abbildung 3](#)).

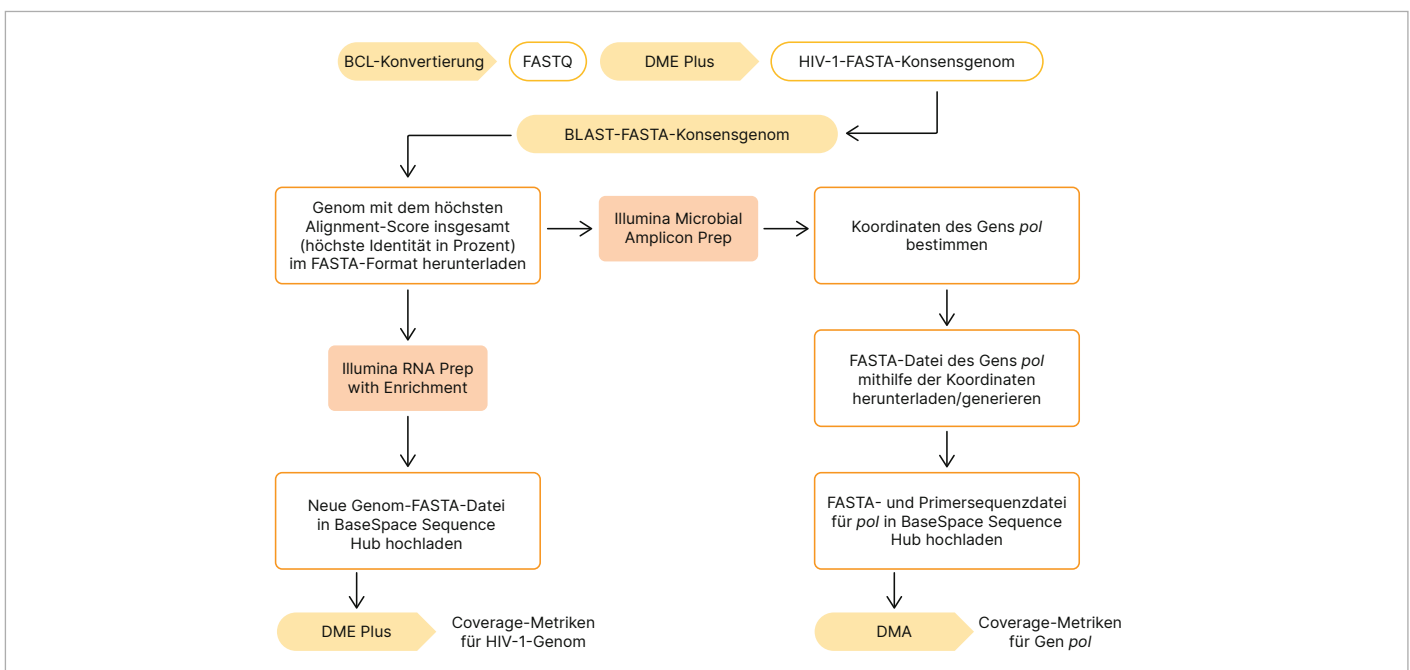


Abbildung 3: Iterativer Analyseworkflow von DRAGEN Microbial Enrichment Plus/DRAGEN Microbial Amplicon

Zusätzlich zu den Coverage-Metriken werden das Varianten-Calling und die Konsenssequenzgenerierung ebenfalls als Ausgabe für die Workflows DRAGEN Microbial Amplicon (DMA) und DRAGEN Microbial Enrichment Plus (DME plus) verwendet.

Ergebnisse

Coverage des HIV-1-Gens *pol* mit Illumina Microbial Amplicon Prep

Die Analyse der anhand von Blutplasmaproben gewonnenen Illumina Microbial Amplicon Prep-Sequenzierungsdaten mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App lieferte den Nachweis von HIV-1 und eine FASTA-Konsensdatei für HIV-1, die anschließend für die BLAST-Analyse verwendet wurde, bei der eine FASTA-Datei mit repräsentativer Akzession generiert wurde. Zum Erhalt von für das Gen *pol* spezifischen Metriken wurde die HIV-1-Genomsequenz mithilfe des Gene Cutter-Tools aus der [Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database](#) ausschließlich auf die Region des Gens *pol* geparkt. Das Alignment der Ausgabe für *pol* auf eine Referenzsequenz mit der DRAGEN Microbial Amplicon App zeigte eine Coverage von 100 % des Gens *pol* ([Abbildung 4](#)).

Bei für Forschungszecke erstellten Proben konnte die DRAGEN Microbial Enrichment Plus-Analyse HIV-1 in allen technischen Replikaten der Illumina Microbial Amplicon Prep-Bibliothek nachweisen. Für alle Proben wurde eine erneute Analyse mit DRAGEN Microbial Amplicon unter Verwendung des iterativen Analyseworkflows durchgeführt. Die DRAGEN Microbial Amplicon-Analyse zeigt bei allen für Forschungszwecke erstellen Proben eine vollständige Coverage des Gens *pol* ([Abbildung 5](#)).

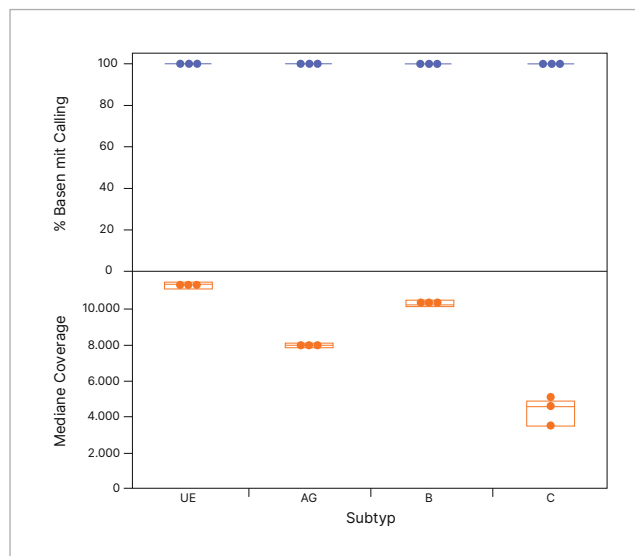


Abbildung 5: Coverage-Metriken für HIV-1-Subtypen mit Illumina Microbial Amplicon Prep

Prozent der callfähigen Basen und mediane Coverage-Tiefe für das Gen *pol*. Die Ergebnisse zeigen, dass der ausgewählte Primer-Pool HIV-1-Stämme amplifiziert, die unterschiedliche Subtypen repräsentieren.

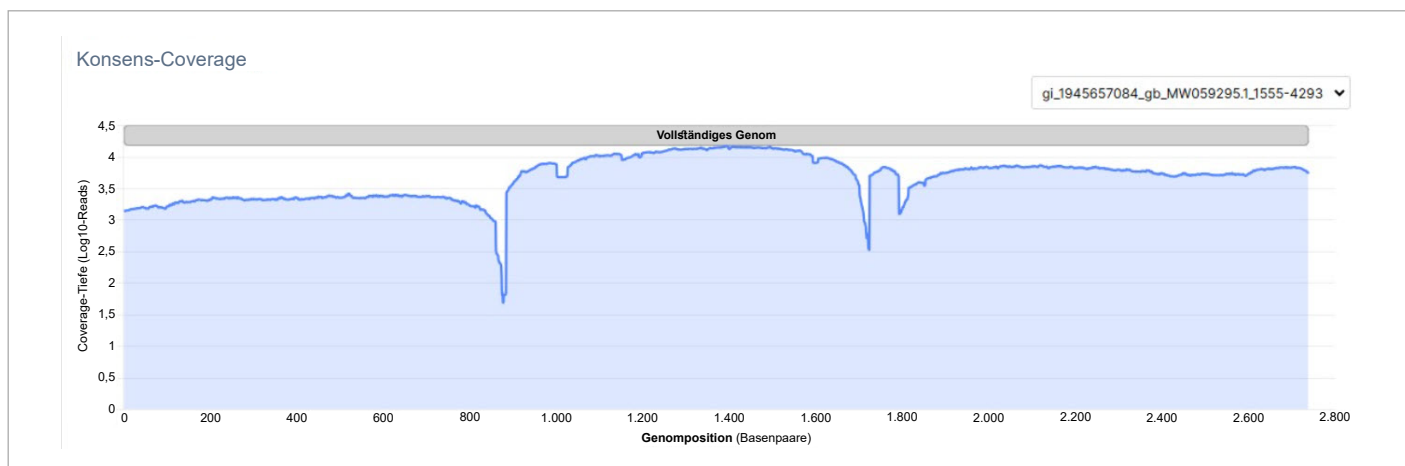


Abbildung 4: Coverage der *pol*-Region des HIV-1-Genoms mit Illumina Microbial Amplicon Prep

Plot der Genom-Coverage für eine repräsentative Plasmaprobe, die mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App analysiert wurde. Die Ergebnisse zeigen eine vollständige Coverage (100 %) des Gens *pol*.

Coverage des HIV-1-Genoms mit Illumina RNA Prep with Enrichment

Die DRAGEN Microbial Enrichment Plus-Analyse lieferte bei bestimmten nicht angereicherten und allen mit dem Viral Surveillance Panel v2 angereicherten Bibliotheken mit unterschiedlicher Viruskopienzugabe den Nachweis von HIV-1 (Abbildung 6). Die Erstanalyse mit DRAGEN Microbial Enrichment Plus lieferte Coverage-Plots für Proben, in denen HIV-1 nachgewiesen wurde. Bei einer repräsentativen Plasmaprobe betrug die Coverage 95,27 % des HIV-1-Genoms (≥ 1 -fache Tiefe) mit einer medianen Tiefe von 757,5-fach und 114.150 alignierten Reads (Abbildung 7A). Die Konsensgenomsequenz aus dieser Analyse wurde mithilfe von BLAST und der Nucleotide-Datenbank analysiert. Das HIV-1-Genom mit dem höchsten Score wurde als Zugabe für den iterativen Analyseworkflow von DRAGEN Microbial Enrichment Plus verwendet. Hieraus ergaben sich höhere Metriken mit einer Genom-Coverage von 99,11 % (≥ 1 -fache Tiefe) (Abbildung 7B).

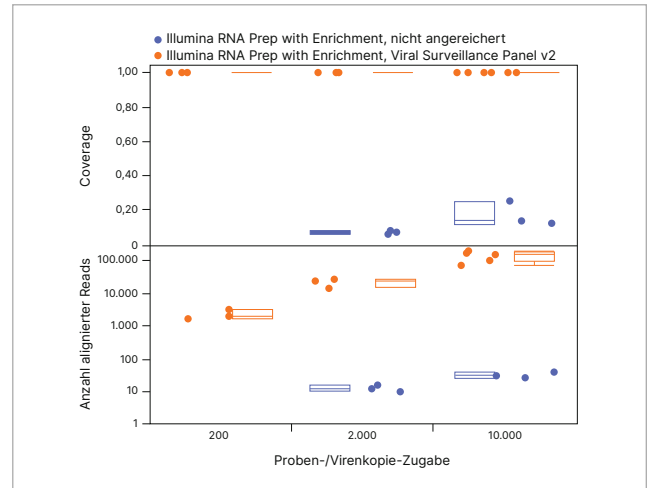


Abbildung 6: Erhöhte Coverage mit Illumina RNA Prep with Enrichment im Vergleich zu nicht angereicherten Bibliotheken

Coverage des HIV-1-Genoms für eine Probe des Subtyps B. Die geringe Anzahl von Virus-Reads in nicht angereicherten Bibliotheken unterstreicht die Bedeutung der Verwendung von Amplifikation oder Anreicherung.

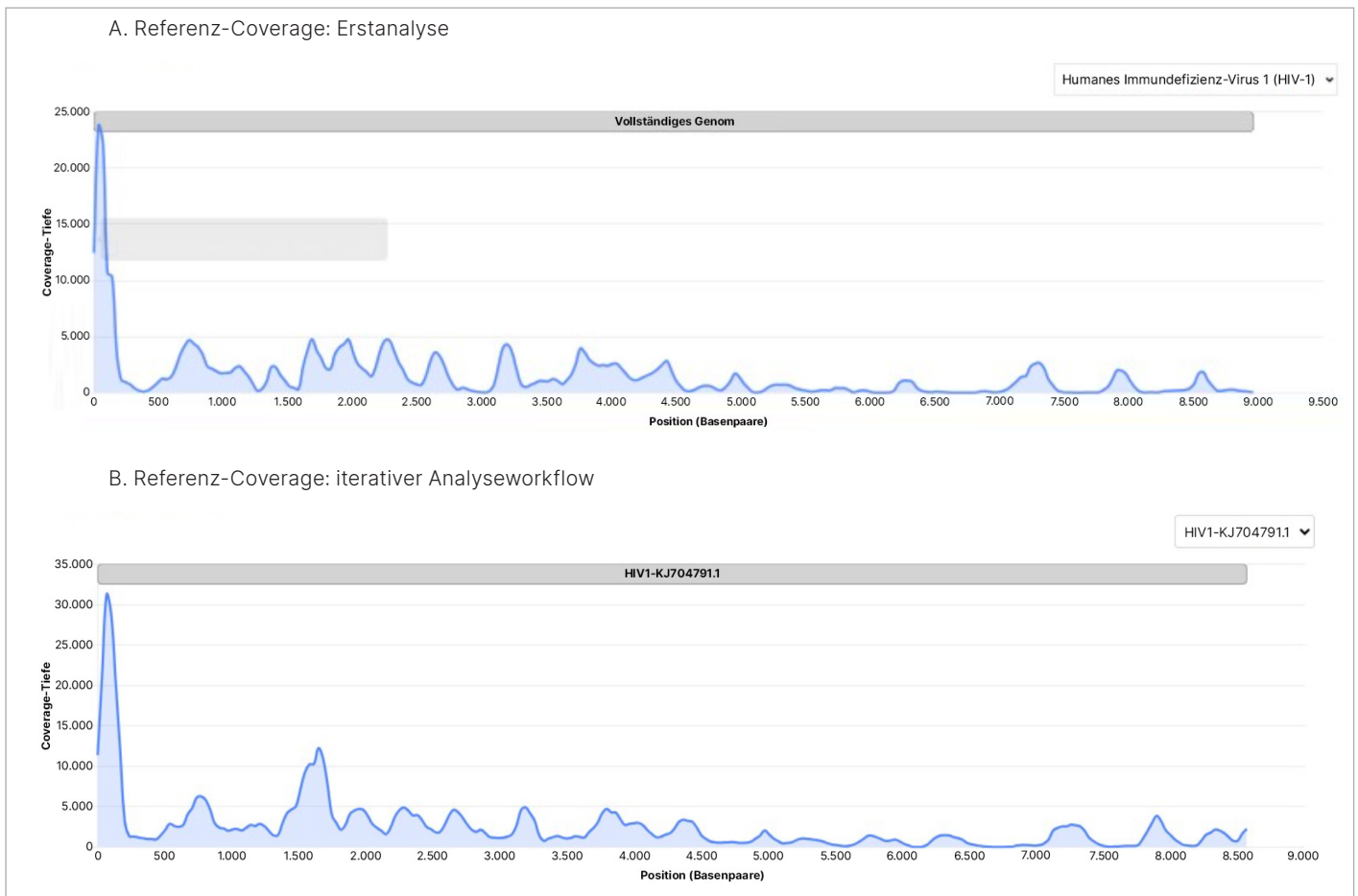


Abbildung 7: Coverage des HIV-1-Genoms mit Illumina RNA Prep with Enrichment

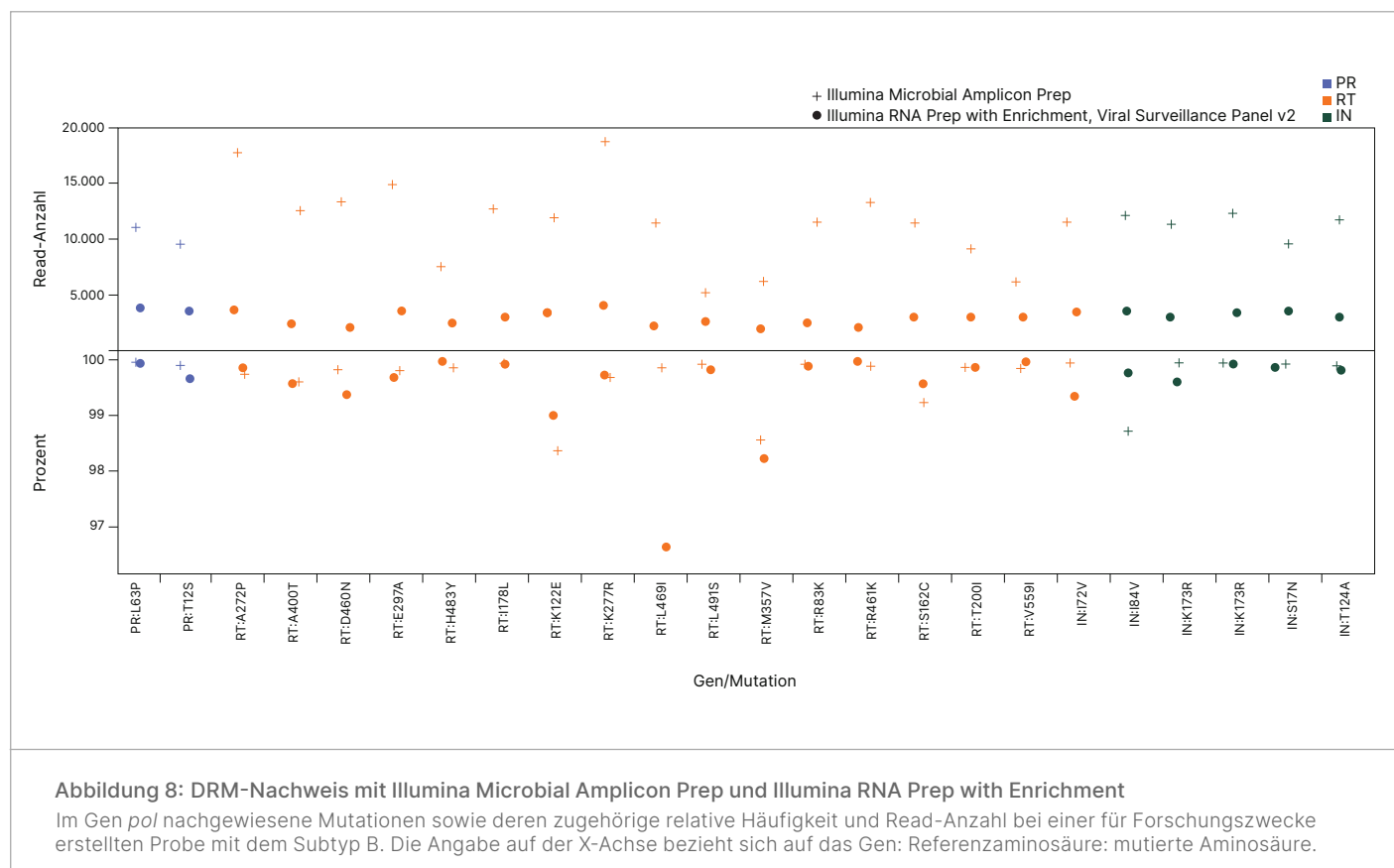
Plots der Genom-Coverage für eine repräsentative Blutplasmaprobe (A), die mit der DRAGEN Microbial Enrichment Plus App analysiert und (B) mit dem iterativen DRAGEN Microbial Enrichment Plus-Workflow analysiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass der iterative Workflow die Coverage des HIV-1-Genoms von 95,27 % auf 99,11 % verbessert.

Assay für Wirkstoffresistenzmutationen

Normalisierte FASTQs sowohl vom Illumina Microbial Amplicon Prep- als auch vom Illumina RNA Prep with Enrichment-Assay für Subtyp B (Zugabe von 10.000 Viruskopien) wurden mithilfe der [Stanford HIV Drug Resistance Database](#) zur Beurteilung des Vorhandenseins von DRMs (Drug Resistance Mutations, Wirkstoffresistenzmutationen) mit Standardparametern analysiert (minimaler Read-Tiefeschwellenwert ≥ 50 , Nukleotidmischungsschwellenwert $\leq 2\%$, Mutationsnachweisschwellenwert $\geq 10\%$). In den von den Assays generierten Daten wurden keine großen oder kleinen PI-, NRTI/NNRTI- oder INSTI-Mutationen nachgewiesen. Andere bei der von SeraCare bereitgestellten HIV-1-Genomsequenz zu erwartenden Mutationen (n = 24) wurden mit beiden Assays nachgewiesen ([Abbildung 8](#)).

Zusammenfassung

Die MiSeq i100 Series eignet sich in Kombination mit hochwertiger Bibliotheksvorbereitung sowohl mit Illumina Microbial Amplicon Prep als auch mit Illumina RNA Prep with Enrichment mit dem Viral Surveillance Panel v2 für die gezielte Sequenzierung zum Nachweis von HIV-1 und für das Wirkstoffresistenz-Profilings. Während Illumina Microbial Amplicon Prep eine tiefere Coverage des HIV-Gens *pol* bei einem einfacheren Workflow bot, wurde bei Illumina RNA Prep with Enrichment mit der Viral Surveillance Panel v2-Anreicherung eine vollständige Coverage von Stämmen des HIV-Genoms erzielt. Der vorliegende Anwendungshinweis zeigt, dass die MiSeq i100 Series einen flexiblen, umfassenden NGS-Workflow für die HIV-Charakterisierung ermöglicht, der sich anwendungsspezifisch anpassen lässt.



Weitere Informationen →[MiSeq i100 Series](#)[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)[Viral Surveillance Panel v2](#)**Quellen**

- Greene WC. [A history of AIDS: looking back to see ahead](#) [Überarbeitung veröffentlicht in *Eur J Immunol.* Jan. 2008;38(1):309]. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S94-S102. doi:10.1002/eji.200737441
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. [Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome \(AIDS\).](#) *Science.* 1983;220(4599):868-871. doi:10.1126/science.6189183
- Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. [Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses \(HTLV-III\) from patients with AIDS and at risk for AIDS.](#) *Science.* 1984;224(4648):500-503. doi:10.1126/science.6200936
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. [Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses \(HTLV-III\) from patients with AIDS and pre-AIDS.](#) *Science.* 1984;224(4648):497-500. doi:10.1126/science.6200935
- World Health Organization. The Global Health Observatory HIV. [who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids.](#) Veröffentlicht im Juli 2024. Abgerufen am 20. Mai 2025.
- World Health Organization. HIV data and statistics. [who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics.](#) Veröffentlicht im Juli 2024. Abgerufen am 20. Mai 2025.
- Sharp PM, Hahn BH. [Origins of HIV and the AIDS pandemic.](#) *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;1(1):a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841
- Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. [HIV infection.](#) *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15035. Veröffentlicht am 1. Oktober 2015. doi:10.1038/nrdp.2015.35
- Swinkels HM, Nguyen AD, Gulick PG. [HIV and AIDS.](#) [Aktualisiert am 27. Juli 2024]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-.
- Yu F, Wen Y, Wang J, et al. [The Transmission and Evolution of HIV-1 Quasispecies within One Couple: a Follow-up Study based on Next-Generation Sequencing.](#) *Sci Rep.* 2018;8(1):1404. Veröffentlicht am 23. Januar 2018. doi:10.1038/s41598-018-19783-3
- Ouyang F, Yuan D, Zhai W, Liu S, Zhou Y, Yang H. [HIV-1 Drug Resistance Detected by Next-Generation Sequencing among ART-Naïve Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis.](#) *Viruses.* 2024;16(2):239. Veröffentlicht am 2. Februar 2024. doi:10.3390/v16020239
- Jones LR, Moretti F, Calvo AY, et al. [Drug resistance mutations in HIV pol sequences from Argentinean patients under antiretroviral treatment: subtype, gender, and age issues.](#) *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012;28(8):949-955. doi:10.1089/AID.2011.0287
- Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, et al. [Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis](#) [Überarbeitung veröffentlicht in *Lancet Infect Dis.* März 2020;20(3):e27. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30747-9.]. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(2):143-155. doi:10.1016/S1473-3099(18)30647-9
- Chaillon A, Gianella S, Dellicour S, et al. [HIV persists throughout deep tissues with repopulation from multiple anatomical sources.](#) *J Clin Invest.* 2020;130(4):1699-1712. doi:10.1172/JCI134815
- Winters MA, Coolley KL, Girard YA, et al. [A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors.](#) *J Clin Invest.* 1998;102(10):1769-1775. doi:10.1172/JCI4948
- 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
- Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. [Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database.](#) *Nucleic Acids Res.* 2003;31(1):298-303. doi:10.1093/nar/gkg100



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2025 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-03571 DEU v1.0