

# Secuenciación del genoma del VIH en MiSeq™ i100 Series

Detección y caracterización precisas del VIH-1



Investigación rápida del gen *pol* del VIH con Illumina Microbial Amplicon Prep para la detección de virus y la detección de resistencia a fármacos.



Secuenciación completa del genoma del VIH con Viral Surveillance Panel v2 para el seguimiento de la evolución vírica y la detección de >200 patógenos víricos.



Flujo de trabajo flexible e integral con secuenciación en MiSeq i100 Series y análisis secundario de DRAGEN™.

## Introducción

Los síntomas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se identificaron por primera vez en 1981 y, en los años siguientes, se atribuyeron a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2).<sup>1-4</sup> La pandemia del VIH se tradujo en más de 88 millones de personas infectadas por el VIH en todo el mundo y más de 42 millones de vidas perdidas a causa de la enfermedad.<sup>5</sup> Tan solo en 2023, se notificaron aproximadamente 1,3 millones de infecciones nuevas y 630 000 muertes.<sup>6</sup>

Los avances en la prevención de la enfermedad y el desarrollo de fármacos antirretrovirales eficaces han hecho posible pasar de una pandemia por VIH a una enfermedad crónica manejable, gracias a una reducción significativa del riesgo de transmisión del VIH y de la progresión a SIDA.<sup>7-9</sup> Sin embargo, la actual transmisión sostenida del VIH entre poblaciones vulnerables en regiones de todo el mundo pone de relieve la necesidad continua de vigilancia de este virus.<sup>8</sup> La vigilancia molecular mediante secuenciación de nueva generación (NGS, next-generation sequencing) permite la detección de variantes que confieren resistencia a los fármacos antirretrovirales, el seguimiento de la transmisión del VIH, incluida la transmisión del VIH farmacorresistente, la detección de variantes asociadas al tropismo del VIH y el seguimiento de la evolución vírica intrahospedador.<sup>10,11</sup> En particular, las mutaciones en el gen *pol* del VIH pueden conferir resistencia a los inhibidores de la proteasa (IP), los inhibidores nucleosídicos de la retrotranscriptasa (NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitors), los inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa (NNRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors) y los inhibidores de la transferencia de la cadena de integrasa (INSTI, integrase strand transfer inhibitors).<sup>12</sup> Como tal, el gen *pol* del VIH es una diana importante para la detección genotípica de la resistencia a los fármacos antirretrovirales.

Esta nota de aplicación demuestra la detección y caracterización del VIH en plasma sanguíneo positivo para el VIH y muestras artificiales mediante un flujo de trabajo de NGS que integra la preparación de librerías de Illumina, la secuenciación en MiSeq i100 Series y el análisis secundario de DRAGEN (figura 1).

## Métodos

### Muestras

Las muestras de plasma positivas para el VIH se obtuvieron de [BIOFLUIDS.com](https://www.biofluids.com) y el ARN se extrajo con QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, n.º de catálogo 52904), utilizando el procedimiento Mini Spin, omitiendo la adición de ARN portador al tampón AVL.\* Las muestras artificiales se formularon para su análisis con ARN purificado extraído de virus propagados en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidos de SeraCare (tabla 1). Los controles que representan cuatro subtipos de VIH-1 prevalentes se añadieron a un fondo de 10 ng de ARN de referencia humano universal (UHRR, human universal reference RNA) para un aporte total de 690 copias víricas/µl para Illumina Microbial Amplicon Prep y 1176 copias víricas/µl para Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 para evaluar el rendimiento en diferentes subtipos de VIH-1 pertenecientes al grupo M (tabla 1).<sup>13</sup>

\* Para obtener un buen rendimiento, es fundamental un aporte suficiente de ácido nucleico vírico. Las consideraciones del método de extracción, como la centrifugación con sacarosa (gradiente de sacarosa) o la adición de ARN portador, podrían mejorar la sensibilidad, especialmente en el caso de las muestras con títulos bajos.<sup>14</sup>



**Figura 1: Flujo de trabajo de NGS integral para la vigilancia del VIH**

Combina la preparación de librerías de Illumina con un enfoque basado en amplicones o de enriquecimiento de objetivos con la secuenciación en MiSeq i100 Series y el análisis secundario de DRAGEN para una caracterización genómica precisa del VIH.

Tabla 1: ARN purificados obtenidos para los controles de subtipos

Nombre del producto SeraCare	N.º de material	ID del aislado
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

## Preparación de librerías

La secuenciación selectiva del VIH se realizó mediante secuenciación de amplicones con Illumina Microbial Amplicon Prep (Illumina, n.º de catálogo 20097857) y mediante enriquecimiento de objetivos con Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 (Illumina, n.º de catálogo 20108081).

## Secuenciación de amplicones

Para Illumina Microbial Amplicon Prep, los cebadores personalizados, incluidos los cebadores publicados previamente<sup>15</sup> y los cebadores complementarios diseñados por los científicos de Illumina para garantizar la amplificación del gen *pol* del VIH para múltiples subtipos de VIH-1, se obtuvieron de Integrated DNA Technologies (IDT) y se diluyeron a 10 µM por grupo (tabla 2). Dado que los amplicones que se dirigen al gen *pol* se solapan en su posición en relación con el genoma del VIH-1, los cebadores se agruparon en dos tubos separados y se utilizaron para la PCR de amplicones en dos reacciones independientes. Este enfoque es necesario para evitar la generación de amplicones pequeños y permite esquemas de amplicones de tipo ARTIC<sup>16</sup> (figura 2).

Tabla 2: Cebadores personalizados utilizados para la amplificación del VIH-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep

Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5'–3'
P1-F v2	AAGGGYTGYTGAAATGYGG
P1-R v2	CTGTADTTCTGCTAYTAAMTCTTTTGATGG
P1-F	TTGAAATGTGAAAGGAAGGAC
P1-R	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG
P5-F	GGAATCATTCAAGCACAACCAGA
P5-F v2	TATGCAYTAGGAATYATTCARGCACA
P5-R	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATAT
P5-R v2	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATG
Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5'–3'
YL1	AGAACCYCCATTCTTYGGATGGG
YL1 v2	AAGCATCAAAGGAACCTCCCTT
YL4	CCTTTGTGTGCTGGTACCCATG
YL4 v2	CCACATGGACAGCAACTATTATG

Los cebadores complementarios diseñados por científicos de Illumina para una mayor cobertura taxonómica se indican con «v2» en el nombre del cebador, suministrado por Integrated DNA Technologies.

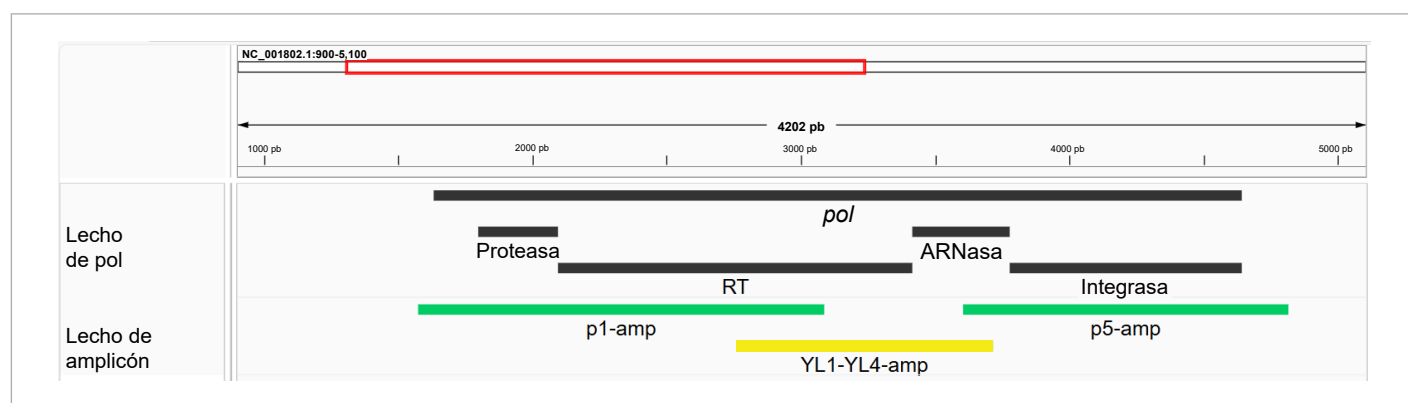


Figura 2: Diseño del cebador de Illumina Microbial Amplicon Prep para el gen *pol* del VIH-1

Los cebadores para los amplicones p1 y p5 (verde) se usaron en una reacción de PCR, mientras que los cebadores para el amplicón YL1-YL4 (amarillo) se usaron en una segunda reacción de PCR para cubrir el gen *pol* (negro).

Las librerías listas para secuenciación se prepararon con ligeras modificaciones en el protocolo de Illumina Microbial Amplicon Prep, incluida una reducción en los volúmenes de aporte de hexámeros aleatorios (2,5 µl en lugar de 8,5 µl), de aporte de ARN (14,5 µl en lugar de 8,5 µl) y los volúmenes de aporte de amplicones de reacción de tagmentación (10 µl de las reacciones de amplificación p1 y p5, 5 µl de la reacción de amplificación YL1-YL4 y 5 µl de DEPC H<sub>2</sub>O).

### Enriquecimiento de objetivos

Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 es selectivo de todo el genoma del VIH-1 y el VIH-2, lo que proporciona secuenciación del genoma completo (WGS, whole-genome sequencing) del VIH y unos 200 virus adicionales. Las librerías listas para secuenciación se prepararon siguiendo el protocolo del fabricante.

### Secuenciación

Las librerías preparadas se secuenciaron en MiSeq i100 Plus System utilizando una celda de flujo de 25 M con una configuración de experimento de 2 × 150 pb.

### Análisis de datos

Una vez finalizada la secuenciación, los datos se normalizaron a 0,5 millones de grupos/1 millón de lecturas «paired-end (PE)» y 1 millón de grupos/2 millones de lecturas PE para Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment with Viral Surveillance Panel v2, respectivamente, utilizando la aplicación FASTQ Toolkit. Los datos normalizados se analizaron con las aplicaciones DRAGEN Microbial Amplicon y DRAGEN Microbial Enrichment Plus en la nube en BaseSpace™ Sequence Hub. También se puede acceder a estas aplicaciones en MiSeq i100 Plus System. Para determinar la información de resistencia a los fármacos, se utilizaron FASTQ normalizados como entrada en la base de datos de Stanford disponible públicamente.<sup>17</sup>

La aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus realiza un ensamblaje guiado por referencia; por lo tanto, es necesario el panel correcto y el conjunto asociado de secuencias de referencia del genoma de virus a los que se dirige el panel. Por lo tanto, Viral Surveillance Panel v2 debe seleccionarse en el menú desplegable del panel de enriquecimiento de la aplicación. A pesar del amplio y diverso conjunto de genomas de referencia del VIH-1 utilizados en el flujo de trabajo de la aplicación seleccionada para la detección y la alineación, es posible que haya disponible un genoma de referencia más representativo para una muestra determinada y más adecuado para su uso en el análisis. Por lo tanto, se adoptó un enfoque repetitivo, volviendo a ejecutar los flujos de trabajo de DRAGEN Microbial Enrichment Plus o DRAGEN Microbial Amplicon (figura 3).

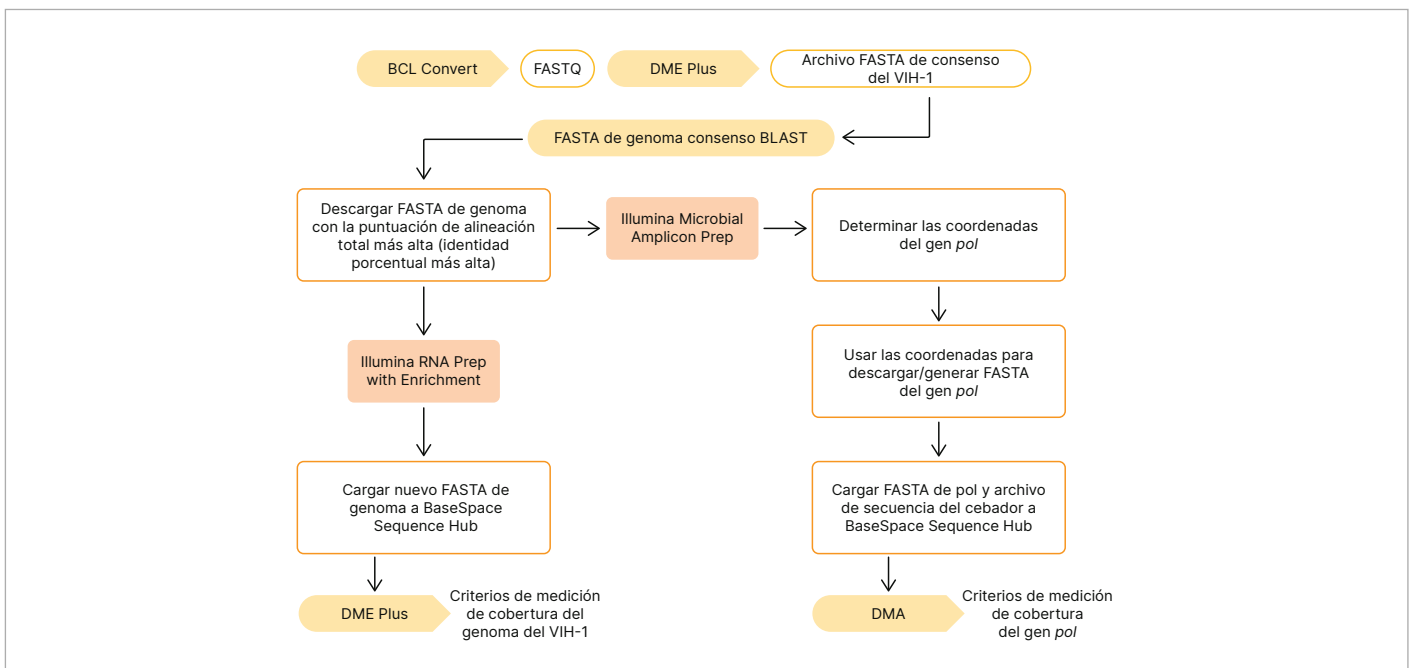


Figura 3: Flujo de trabajo de análisis repetitivo de DRAGEN Microbial Enrichment Plus/DRAGEN Microbial Amplicon

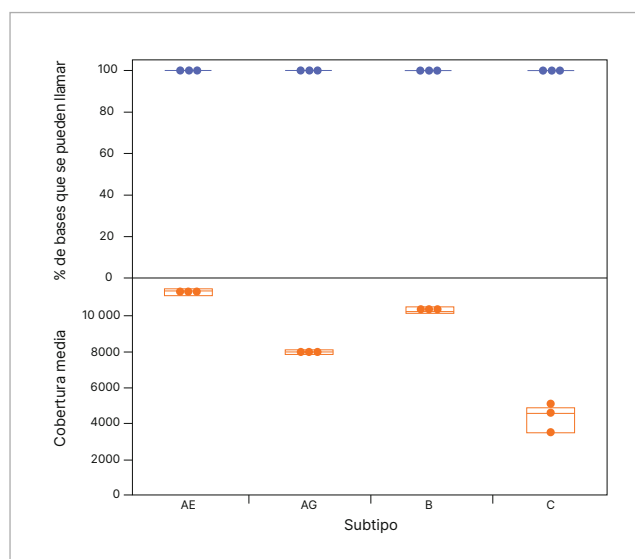
Además de los criterios de medición de cobertura, la llamada de variantes y la generación de secuencias de consenso también se generan en los flujos de trabajo de DRAGEN Microbial Amplicon (DMA) y DRAGEN Microbial Enrichment Plus (DME plus).

## Resultados

### Cobertura del gen *pol* del VIH-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep

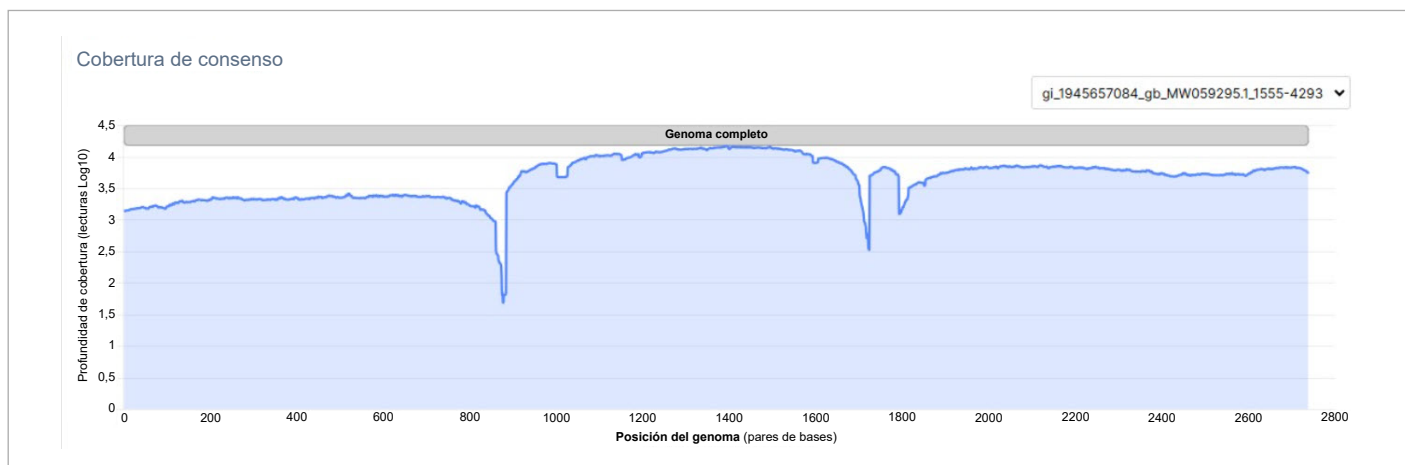
El análisis de los datos de secuenciación de Illumina Microbial Amplicon Prep a partir de una muestra de plasma sanguíneo utilizando la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus dio como resultado la detección del VIH-1 y la generación de un archivo FASTA de consenso del VIH-1 que posteriormente se utilizó para el análisis BLAST para determinar un archivo FASTA de identificación representativo. Para alcanzar los criterios de medición específicos del gen *pol*, se utilizó la herramienta Gene Cutter de la [base de datos de secuencias del VIH del Los Alamos National Laboratory](#) para diseccionar la secuencia del genoma del VIH-1 solamente en la región del gen *pol*. La alineación del resultado de *pol* con una secuencia de referencia mediante la aplicación DRAGEN Microbial Amplicon mostró una cobertura del 100 % en todo el gen *pol* (figura 4).

En el caso de las muestras artificiales, el análisis de DRAGEN Microbial Enrichment Plus detectó el VIH-1 en todas las réplicas técnicas de la librería de Illumina Microbial Amplicon Prep. Se realizó un nuevo análisis con DRAGEN Microbial Amplicon para todas las muestras utilizando el flujo de trabajo de análisis repetitivo. El análisis de DRAGEN Microbial Amplicon demuestra una cobertura completa del gen *pol* para cada muestra artificial analizada (figura 5).



**Figura 5: Criterios de medición de cobertura para subtipos del VIH-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep**

Porcentaje de bases llamables y mediana de la profundidad de cobertura para el gen *pol*. Los resultados muestran que el grupo de cebadores seleccionado amplifica cepas del VIH-1 que representan diversos subtipos.

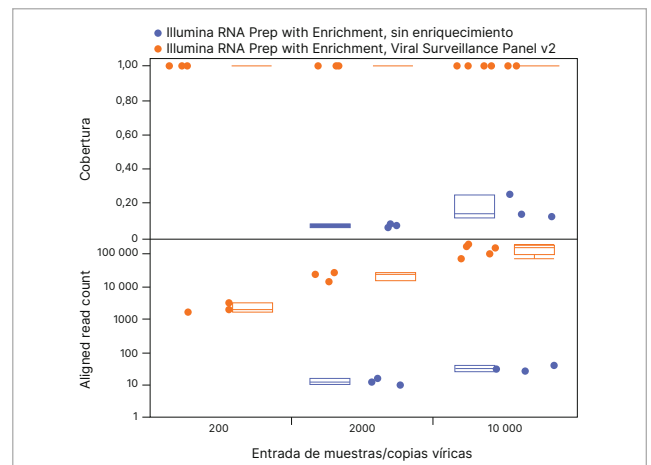


**Figura 4: Cobertura del genoma de la región del gen *pol* del VIH-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep**

Gráfico de cobertura del genoma para una muestra de plasma representativa analizada con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Los resultados muestran una cobertura completa (100 %) en todo el gen *pol*.

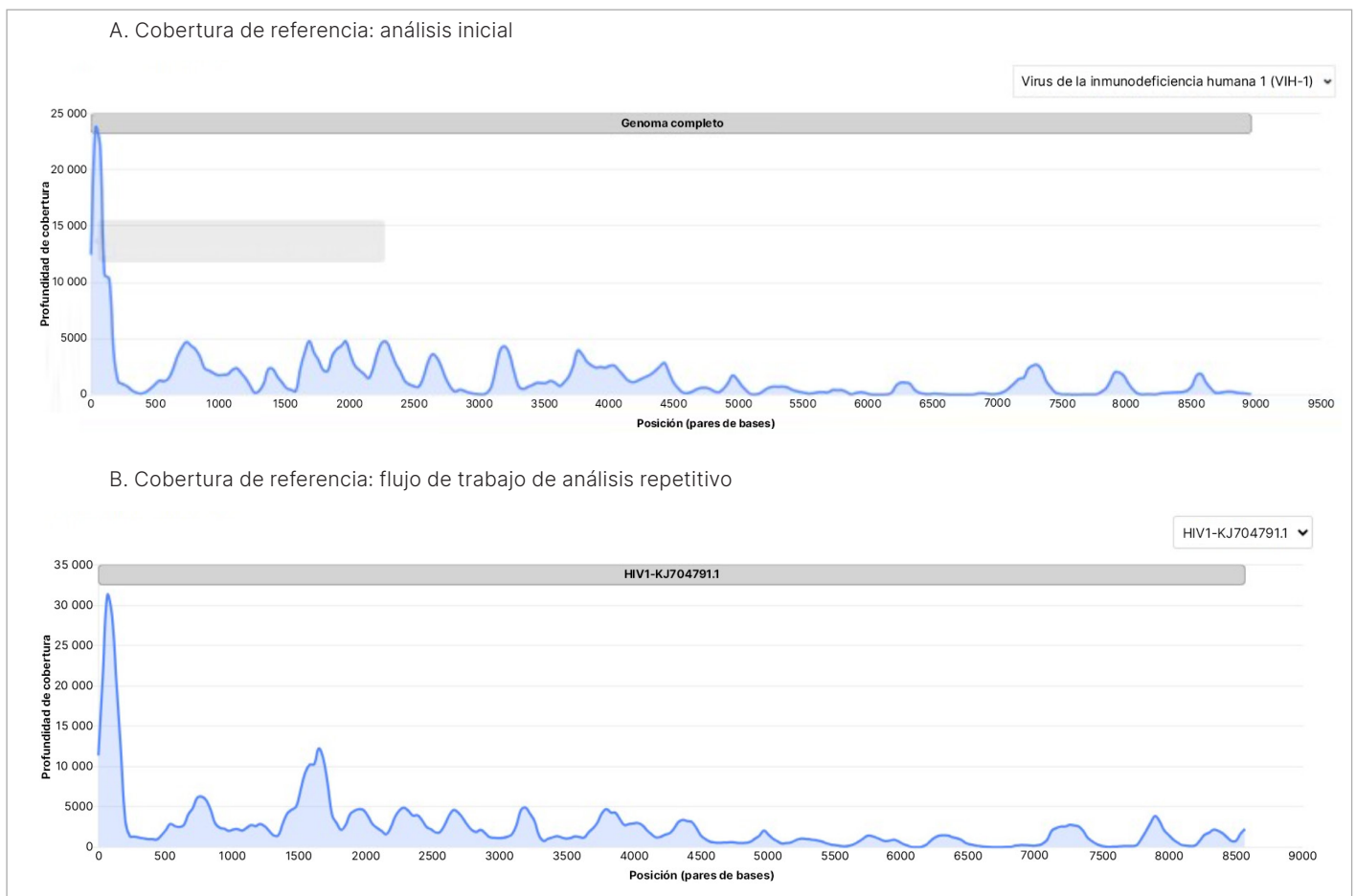
## Cobertura del genoma del VIH-1 con Illumina RNA Prep with Enrichment

El análisis de DRAGEN Microbial Enrichment Plus detectó el VIH-1 en algunas librerías no enriquecidas y en todas las librerías enriquecidas con Viral Surveillance Panel v2 con diferentes aportes de copias víricas (figura 6). El análisis inicial de DRAGEN Microbial Enrichment Plus produjo gráficos de cobertura para las muestras con detección del VIH-1. Para una muestra de plasma representativa, se cubrió el 95,27 % del genoma del VIH-1 ( $\geq 1\times$  de profundidad) con una mediana de profundidad de 757,5 $\times$  y 114 150 lecturas alineadas (figura 7A). La secuencia del genoma de consenso de este análisis se analizó utilizando BLAST y la base de datos de nucleótidos. El genoma del VIH-1 de mayor puntuación se utilizó como aporte en el flujo de trabajo de análisis repetitivo de DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Esto dio como resultado un mayor criterio de medición de cobertura con el 99,11 % del genoma cubierto ( $\geq 1\times$  de profundidad) (figura 7B).



**Figura 6: Mayor cobertura con Illumina RNA Prep with Enrichment en comparación con librerías no enriquecidas**

Cobertura del genoma del VIH-1 para la muestra artificial del subtipo B. Las lecturas víricas bajas detectadas en librerías no enriquecidas demuestran el uso de amplificación o enriquecimiento.



**Figura 7: Cobertura del genoma del VIH-1 con Illumina RNA Prep with Enrichment**

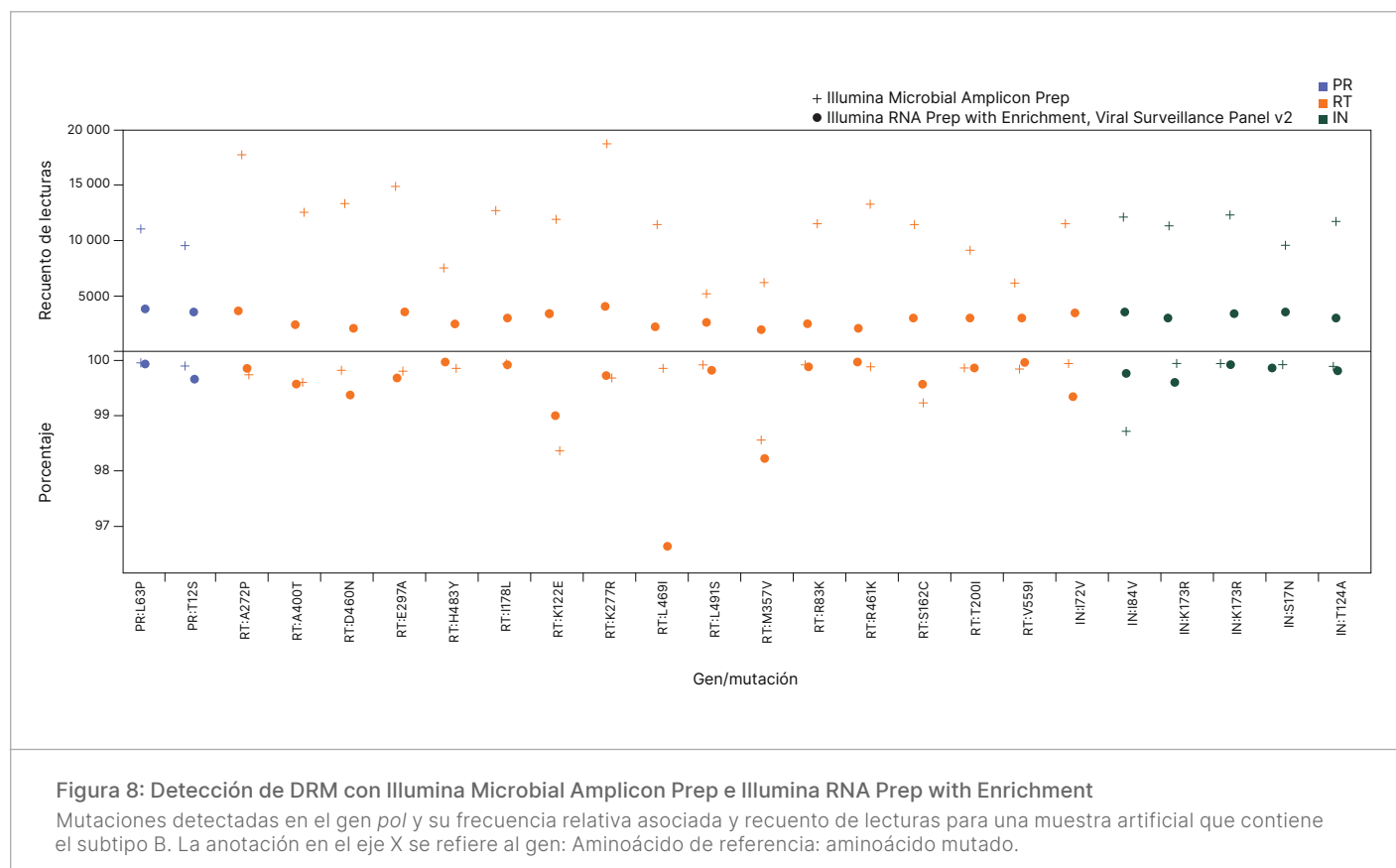
Gráficos de cobertura del genoma para una muestra representativa de plasma sanguíneo (A) analizada con la aplicación DRAGEN Microbial Enrichment Plus y (B) analizada con el flujo de trabajo iterativo de DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Los resultados muestran que el flujo de trabajo repetitivo mejoró la cobertura del genoma del VIH-1 del 95,27 % al 99,11 %.

## Ensayo de mutaciones de resistencia farmacológica

Los FASTQ normalizados de los ensayos Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment para el subtipo B, con aporte de 10 000 copias víricas, se analizaron utilizando la [base de datos de resistencia farmacológica del VIH de Stanford](#) para evaluar la presencia de mutaciones de resistencia farmacológica (DRM, drug resistance mutations) con parámetros predeterminados (umbral de profundidad de lectura mínima  $\geq 50$ , umbral de mezcla de nucleótidos  $\leq 2\%$ , umbral de detección de mutaciones  $\geq 10\%$ ). No se detectaron mutaciones mayores o menores en relación con la resistencia a IP, NRTI/NNRTI o INSTI en los datos generados a partir de ninguno de los ensayos. Se detectaron otras mutaciones ( $n = 24$ ) previstas por la secuencia del genoma del VIH-1 proporcionada por SeraCare utilizando ambos ensayos ([figura 8](#)).

## Resumen

MiSeq i100 Series, en combinación con la preparación de librerías de alta calidad utilizando Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2, demostró capacidades de secuenciación selectiva para la detección del VIH-1 y la creación de perfiles de resistencia a fármacos. Aunque Illumina Microbial Amplicon Prep proporcionó una cobertura más profunda del gen *pol* del VIH con un flujo de trabajo más sencillo, Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 Enrichment proporcionó una cobertura completa del genoma de las cepas del VIH. Esta nota de aplicación demuestra que MiSeq i100 Series forma parte de un flujo de trabajo de NGS flexible e integral para la caracterización del VIH que se puede adaptar a las necesidades del usuario.



**Más información →**[MiSeq i100 Series](#)[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)[Viral Surveillance Panel v2](#)**Bibliografía**

- Greene WC. [A history of AIDS: looking back to see ahead](#) [la corrección publicada aparece en *Eur J Immunol*. 2008 Jan;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
- Organización Mundial de la Salud. The Global Health Observatory HIV. [who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids](#). Fecha de publicación: julio de 2024. Fecha de consulta: 20 de mayo de 2025.
- Organización Mundial de la Salud. HIV data and statistics. [who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics](#). Fecha de publicación: julio de 2024. Fecha de consulta: 20 de mayo de 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](#). *Cebadores Nat Rev Dis*. 2015;1:15035. Fecha de publicación: 1 de octubre de 2015. doi:10.1038/nrdp.2015.35
- Swinkels HM, Nguyen AD, Gulick PG. [HIV and AIDS](#). [Actualizado el 27 de julio de 2024]. En: 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. Fecha de publicación: 23 de enero de 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. Fecha de publicación: 2 de febrero de 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](#) [la corrección publicada aparece en *Lancet Infect Dis*. 2020 Mar;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

**illumina**<sup>®</sup>1 800 809 4566 (llamada gratuita, EE. UU.) | tel.: +1 858 202 4566  
techsupport@illumina.com | www.illumina.com© 2025 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-03571 ESP v1.0