

Sequenziamento del genoma dell'HIV su MiSeq™ i100 Series

Rilevamento e caratterizzazione accurati dell'HIV-1



Interrogazione rapida
del gene HIV *pol* con
Illumina Microbial
Amplicon Prep per
il rilevamento virale
e il rilevamento della
resistenza ai farmaci



Sequenziamento completo
del genoma dell'HIV con
Viral Surveillance Panel
v2 per il monitoraggio
dell'evoluzione virale
e il rilevamento di oltre
200 altri patogeni virali



Flusso di lavoro end-
to-end flessibile con
sequenziamento su
MiSeq i100 Series
e analisi secondaria
DRAGEN™

Introduzione

I sintomi della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS, Acquired Immunodeficiency Syndrome) sono stati riconosciuti per la prima volta nel 1981 e negli anni successivi sono stati attribuiti all'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV, Human Immunodeficiency Virus) di tipo 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2).¹⁻⁴ La pandemia di HIV ha visto più di 88 milioni di persone in tutto il mondo infettate dall'HIV e oltre 42 milioni di vite interrotte a causa della malattia.⁵ Nel solo 2023 sono stati segnalati circa 1,3 milioni di nuove infezioni e 630.000 decessi.⁶

I progressi nella prevenzione delle malattie e nello sviluppo di farmaci antiretrovirali efficaci hanno ampiamente trasformato la pandemia di HIV in una malattia cronica gestibile, riducendo significativamente il rischio di trasmissione dell'HIV e di progressione della malattia ad AIDS.⁷⁻⁹ Tuttavia, la continua e diffusa trasmissione dell'HIV tra le popolazioni vulnerabili nelle aree geografiche di tutto il mondo evidenzia la continua necessità di sorveglianza dell'HIV.⁸ La sorveglianza molecolare tramite sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) consente il rilevamento di varianti che conferiscono resistenza ai farmaci antiretrovirali, monitoraggio della trasmissione dell'HIV, compresa la trasmissione di HIV farmacoresistente, il rilevamento di varianti associate al tropismo dell'HIV e il monitoraggio dell'evoluzione virale intra-host.^{10,11} In particolare, mutazioni nel gene HIV *pol* possono conferire resistenza agli inibitori della proteasi (PI, Protease Inhibitor), agli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTI, Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor), agli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI, Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor) e agli inibitori del trasferimento dei filamenti di integrasi (INSTI, Integrase Strand Transfer Inhibitor).¹² Pertanto, il gene HIV *pol* è un importante target per il rilevamento genotipico della resistenza ai farmaci antiretrovirali.

Questa nota sull'applicazione dimostra il rilevamento e la caratterizzazione dell'HIV nel plasma ematico positivo all'HIV e nei campioni artificiali utilizzando un flusso di lavoro NGS che integra la preparazione delle librerie Illumina, il sequenziamento su MiSeq i100 Series e l'analisi secondaria DRAGEN (Figura 1).

Metodi

Campioni

I campioni di plasma positivi all'HIV sono stati ottenuti da [BIOFLUIDS.com](https://www.biofluids.com) e l'RNA è stato estratto utilizzando QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, n. di catalogo 52904), mediante la procedura Mini Spin, omettendo l'aggiunta dell'RNA del portatore al tampone AVL.* I campioni artificiali sono stati formulati per l'analisi utilizzando RNA purificato estratto dal virus propagato nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cell) fornite da SeraCare (Tabella 1). I controlli che rappresentano quattro sottotipi prevalenti di HIV-1 sono stati aggiunti in uno sfondo di 10 ng di RNA di riferimento universale umano (UHRR, Human Universal Reference RNA) per un input totale di 690 copie virali/μl per Illumina Microbial Amplicon Prep e 1.176 copie virali/μl per Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 per valutare le prestazioni tra i diversi sottotipi di HIV-1 appartenenti al gruppo M (Tabella 1).¹³

* Un input sufficiente di acido nucleico virale è fondamentale per buone prestazioni. Considerazioni sul metodo di estrazione come la centrifugazione con saccarosio (gradiente di saccarosio) o l'aggiunta di RNA del portatore potrebbero migliorare la sensibilità, in particolare per i campioni a basso titolo.¹⁴

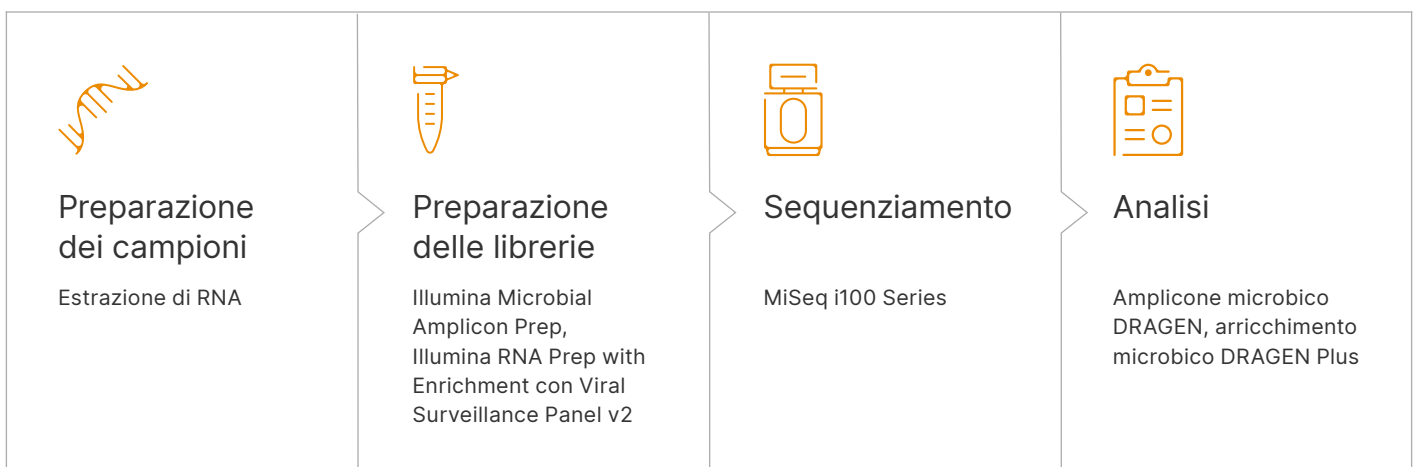


Figura 1: flusso di lavoro NGS end-to-end per la sorveglianza dell'HIV

Combinazione della preparazione delle librerie Illumina utilizzando un approccio di arricchimento basato su ampliconi o target con il sequenziamento su MiSeq i100 Series e l'analisi secondaria DRAGEN per un'accurata caratterizzazione genomica dell'HIV.

Tabella 1: RNA purificati ottenuti per i controlli dei sottotipi

Nome del prodotto SeraCare	N. di materiale	ID isolato
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

Preparazione delle librerie

Il sequenziamento mirato dell'HIV è stato eseguito mediante sequenziamento degli ampliconi utilizzando Illumina Microbial Amplicon Prep (Illumina, n. di catalogo 20097857) e mediante arricchimento del target utilizzando Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 (Illumina, n. di catalogo 20108081).

Sequenziamento di ampliconi

Per Illumina Microbial Amplicon Prep, i primer personalizzati, inclusi i primer pubblicati in precedenza¹⁵ e i primer supplementari progettati dagli scienziati Illumina per garantire l'amplificazione del gene HIV *pol* per più sottotipi di HIV-1, sono stati ottenuti da Integrated DNA Technologies (IDT) e diluiti a 10 µM per pool (Tabella 2). Poiché gli ampliconi mirati al gene *pol* si sovrappongono in posizione rispetto al genoma HIV-1, i primer sono stati raggruppati in due provette separate e utilizzati per la PCR degli ampliconi in due reazioni indipendenti. Questo approccio è necessario per impedire la generazione di ampliconi piccoli e consente schemi di ampliconi in stile ARTIC¹⁶ (Figura 2).

Tabella 2: primer personalizzati utilizzati per l'amplificazione dell'HIV-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep

Nome primer	Sequenza del primer 5'-3'
P1-F v2	AAGGGYTGYTGAAATGYGG
P1-R v2	CTGTADTTCTGCTAYTAAMTCTTTTGATGG
P1-F	TTGAAATGTGAAAGGAAGGAC
P1-R	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG
P5-F	GGAATCATTCAAGCACACCAGA
P5-F v2	TATGCAYTAGGAATYATTCARGCAC
P5-R	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATAT
P5-R v2	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATG
Nome primer	Sequenza del primer 5'-3'
YL1	AGAACCYCCATTCTTYGGATGGG
YL1 v2	AAGCATCAAAGGAACCTCCCTT
YL4	CCTTTGTGTGCTGGTACCCATG
YL4 v2	CCACATGGACAGCAACTATTATG

I primer supplementari progettati dagli scienziati Illumina per una maggiore copertura tassonomica sono indicati con "v2" nel nome del primer, fornito da Integrated DNA Technologies.

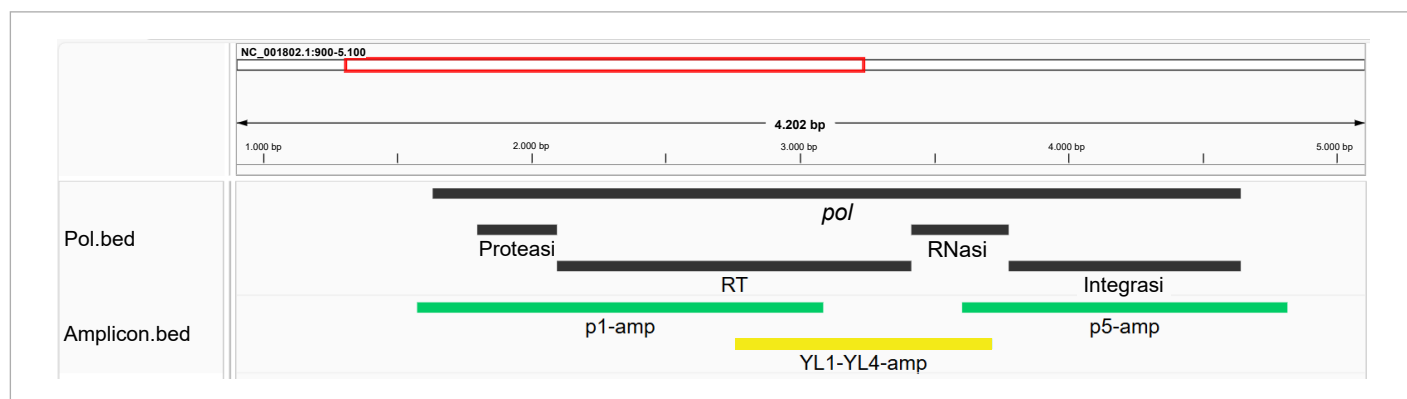


Figura 2: design del primer Microbial Amplicon Prep Illumina per il gene HIV-1 *pol*

I primer per gli ampliconi p1 e p5 (verde) sono stati utilizzati in una reazione PCR mentre i primer per l'amplicone YL1-YL4 (giallo) sono stati utilizzati in una seconda reazione PCR per coprire il gene *pol* (nero).

Le librerie pronte per il sequenziamento sono state preparate con lievi modifiche al protocollo Illumina Microbial Amplicon Prep, inclusa una riduzione dei volumi di input di esamero casuale (2,5 µl invece di 8,5 µl), input di RNA (14,5 µl invece di 8,5 µl) e input di amplicone di reazione di tagmentazione (10 µl da reazioni di amplificazione p1 e p5, 5 µl dalla reazione di amplificazione YL1-YL4 e 5 µl di DEPC H₂O).

Arricchimento dei target

Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 mira all'intero genoma di HIV-1 e HIV-2, fornendo il sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) di HIV e circa 200 virus aggiuntivi. Le librerie pronte per il sequenziamento sono state preparate seguendo il protocollo del produttore.

Sequenziamento

Le librerie preparate sono state sequenziate su MiSeq i100 Plus System utilizzando una cella a flusso 25M con configurazione della corsa di 2 × 150 bp.

Analisi dei dati

Al termine del sequenziamento, i dati sono stati normalizzati rispettivamente a 0,5 milioni di cluster/1 milione di letture paired-end (PE) e a 1 milione/2 milioni di PE per Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2, utilizzando l'app FASTQ Toolkit. I dati normalizzati sono stati analizzati utilizzando le applicazioni DRAGEN Microbial Amplicon e DRAGEN Microbial Enrichment Plus nel cloud in BaseSpace™ Sequence Hub. È inoltre possibile accedere a queste applicazioni su MiSeq i100 Plus System. Per determinare le informazioni sulla resistenza ai farmaci, sono stati utilizzati FASTQ normalizzati come input nel database di Stanford disponibile pubblicamente.¹⁷

L'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus esegue un gruppo guidato dal riferimento; pertanto, è necessario il pannello corretto con il set associato di sequenze di riferimento genomico di virus target dal pannello. Pertanto, è necessario selezionare Viral Surveillance Panel v2 dal menu a discesa del pannello di arricchimento nell'app. Nonostante l'ampio e diversificato set di genomi di riferimento HIV-1 utilizzati nel flusso di lavoro dell'applicazione selezionata per il rilevamento e l'allineamento, è possibile che sia disponibile un genoma di riferimento più rappresentativo per un determinato campione e più appropriato da utilizzare per l'analisi. È stato quindi adottato un approccio iterativo, eseguendo nuovamente i flussi di lavoro DRAGEN Microbial Enrichment Plus o DRAGEN Microbial Amplicon (Figura 3).

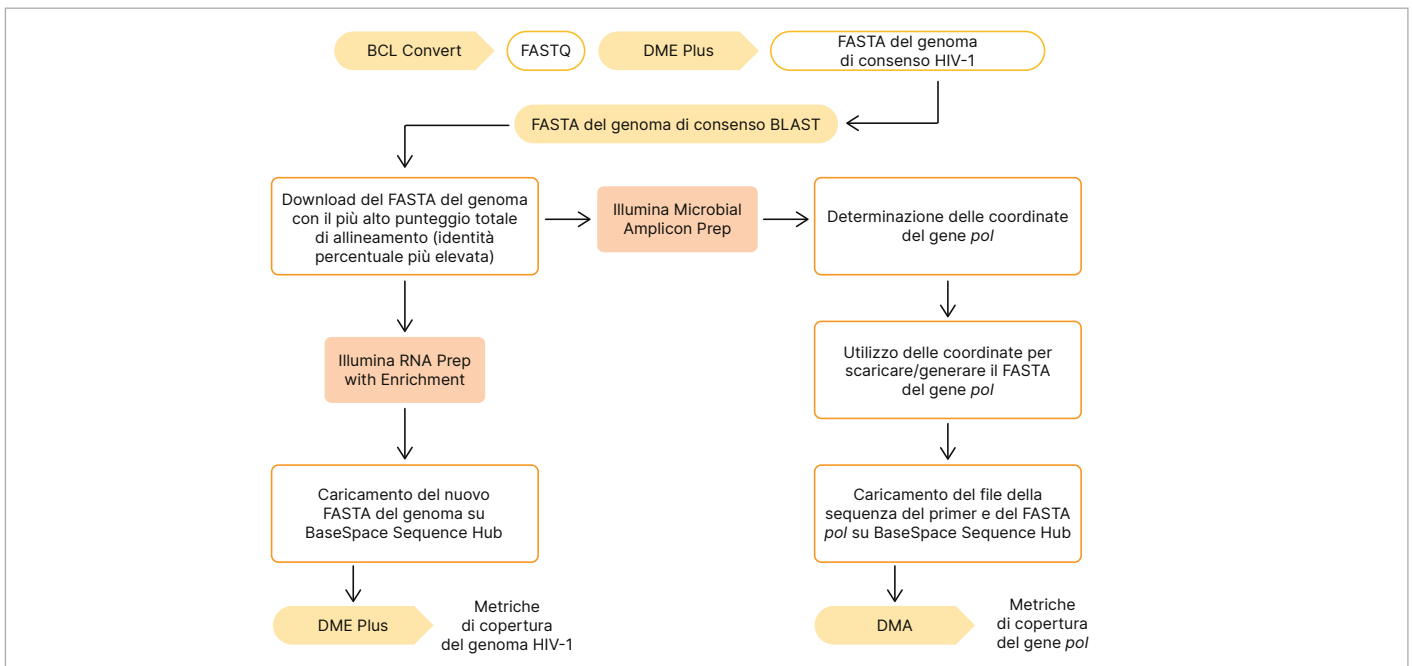


Figura 3: flusso di lavoro per l'analisi iterativa degli ampliconi microbici DRAGEN Microbial Enrichment Plus/DRAGEN Microbial Amplicon

Oltre alle metriche di copertura, l'identificazione delle varianti e la generazione di sequenze di consenso sono anche generate nei flussi di lavoro DRAGEN Microbial Amplicon (DMA) e DRAGEN Microbial Enrichment Plus (DME plus).

Risultati

Copertura del gene HIV-1 *pol* con Illumina Microbial Amplicon Prep

L'analisi dei dati di sequenziamento di Illumina Microbial Amplicon Prep da un campione di plasma ematico utilizzando l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus ha determinato il rilevamento di HIV-1 e la generazione di un file FASTA HIV-1 consensuale che è stato successivamente utilizzato per l'analisi BLAST per determinare un file FASTA di accesso rappresentativo. Per ottenere metriche specifiche per il gene *pol*, lo strumento Gene Cutter del [Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Database](#) è stato utilizzato per analizzare la sequenza del genoma HIV-1 solo alla regione del gene *pol*. L'allineamento dell'output *pol* a una sequenza di riferimento utilizzando l'app DRAGEN Microbial Amplicon ha mostrato una copertura del 100% sul gene *pol* (Figura 4).

Per i campioni artificiali, l'analisi DRAGEN Microbial Enrichment Plus ha rilevato l'HIV-1 in tutti i replicati tecnici della libreria Illumina Microbial Amplicon Prep. La rianalisi con DRAGEN Microbial Amplicon è stata eseguita per tutti i campioni utilizzando il flusso di lavoro di analisi iterativa. L'analisi DRAGEN Microbial Amplicon dimostra la copertura completa del gene *pol* per ciascun campione artificiale analizzato (Figura 5).

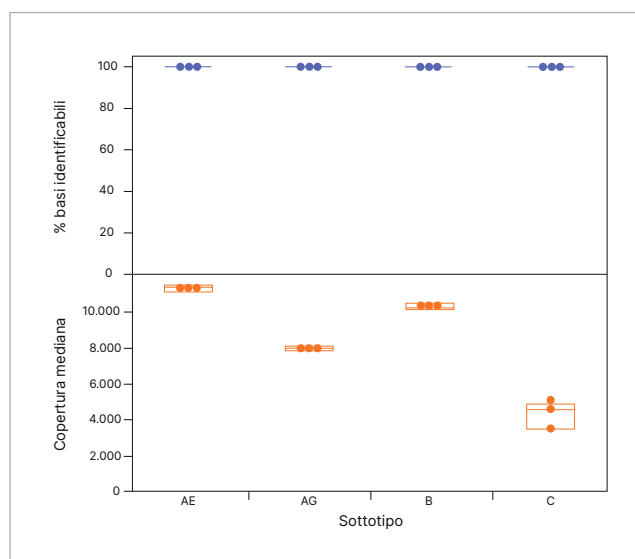


Figura 5: metriche di copertura per i sottotipi di HIV-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep

Percentuale di basi identificabili e profondità mediana di copertura per il gene *pol*. I risultati mostrano che il pool di primer selezionato amplifica i ceppi di HIV-1 che rappresentano diversi sottotipi.

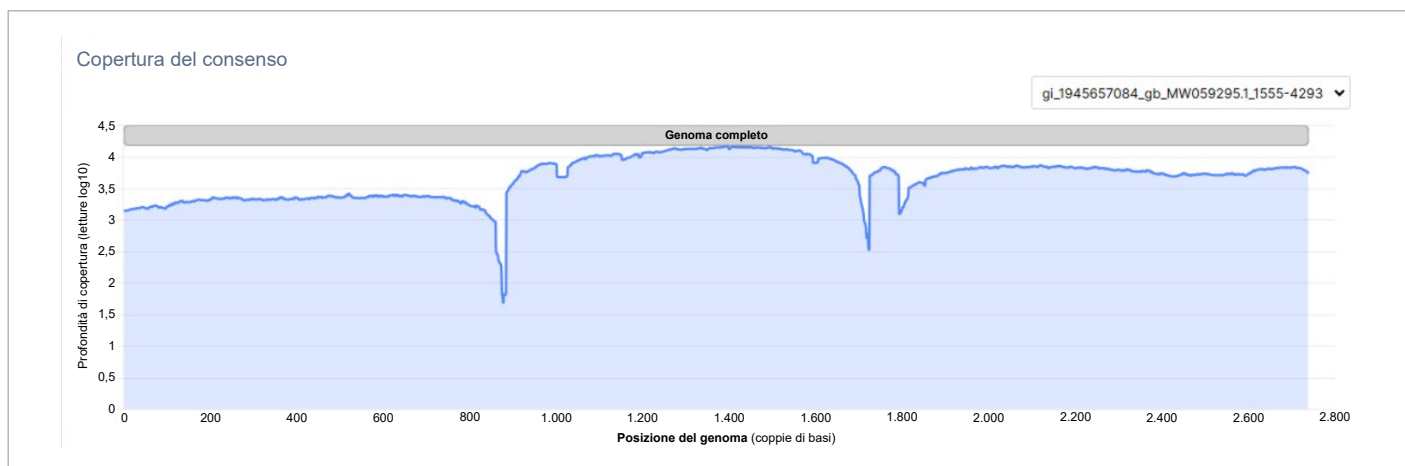


Figura 4: copertura del genoma della regione *pol* di HIV-1 con Illumina Microbial Amplicon Prep

Diagramma di copertura del genoma per un campione di plasma rappresentativo analizzato con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus. I risultati mostrano una copertura completa (100%) sul gene *pol*.

Copertura del genoma HIV-1 con Illumina RNA Prep with Enrichment

L'analisi DRAGEN Microbial Enrichment Plus ha rilevato l'HIV-1 in alcune librerie non arricchite e in tutte le librerie arricchite con Viral Surveillance Panel v2 a diversi input di copie virali (Figura 6). L'analisi iniziale DRAGEN Microbial Enrichment Plus ha prodotto grafici di copertura per i campioni rilevati da HIV-1. Per un campione di plasma rappresentativo, è stato coperto il 95,27% del genoma HIV-1 (profondità maggiore o uguale a 1x) con una profondità mediana di 757,5x e 114.150 letture allineate (Figura 7A). La sequenza consenso del genoma da questa analisi è stata analizzata utilizzando BLAST e il database dei nucleotidi. Il genoma HIV-1 con il punteggio più alto è stato utilizzato come input nel flusso di lavoro di analisi iterativo DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Ciò ha portato a maggiori metriche di copertura con il 99,11% del genoma coperto (profondità maggiore o uguale a 1x) (Figura 7B).

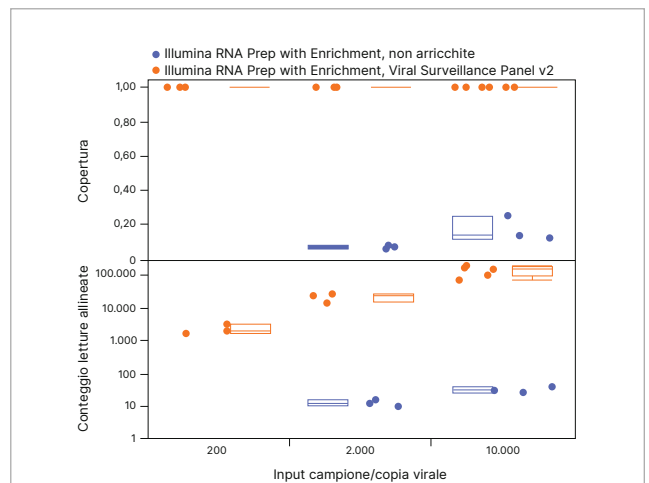


Figura 6: maggiore copertura con Illumina RNA Prep with Enrichment rispetto alle librerie non arricchite

Copertura del genoma HIV-1 per il campione artificiale di sottotipo B. Le letture virali basse rilevate in librerie non arricchite dimostrano l'uso dell'amplificazione o dell'arricchimento.

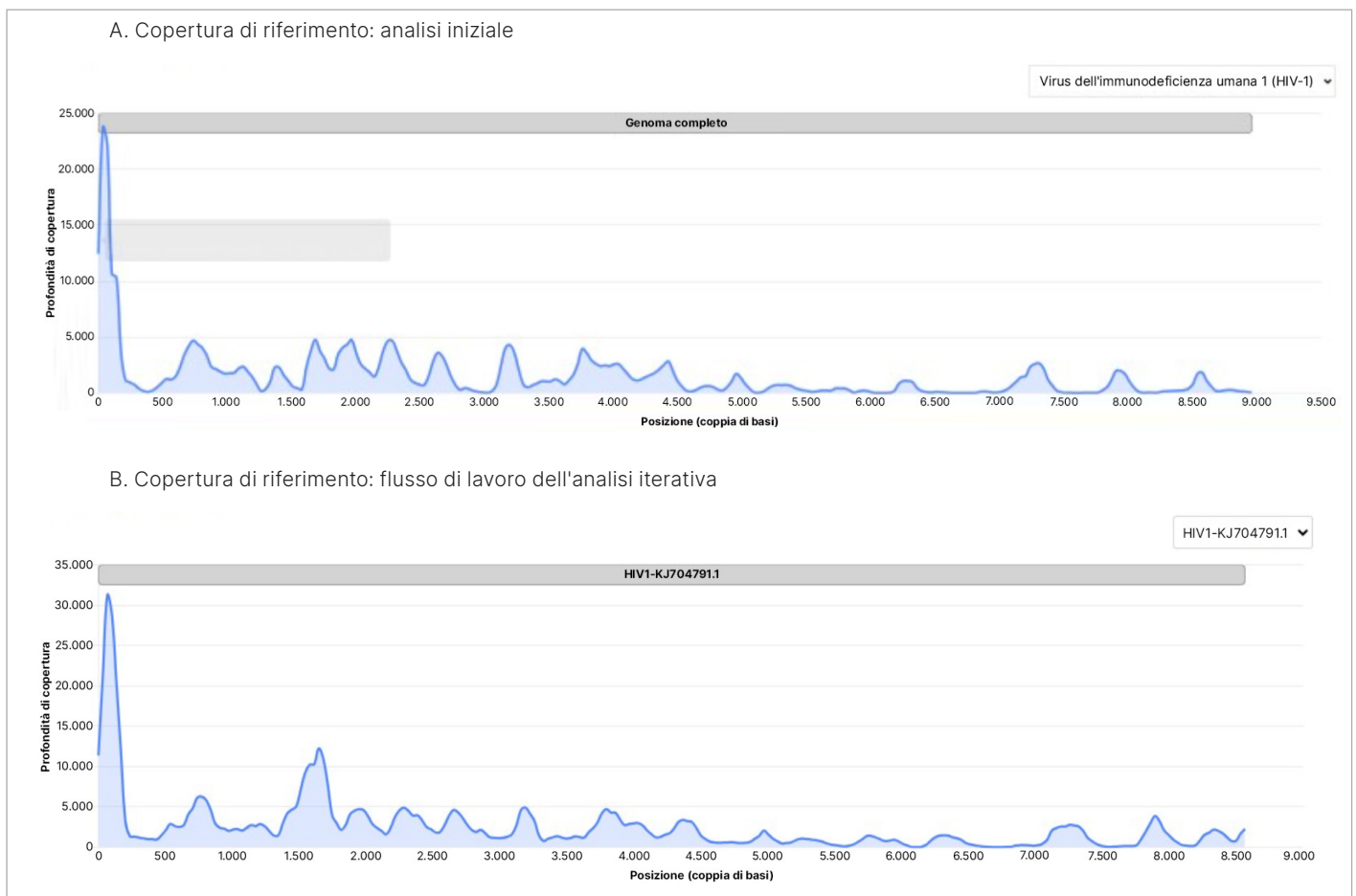


Figura 7: copertura del genoma HIV-1 con Illumina RNA Prep with Enrichment

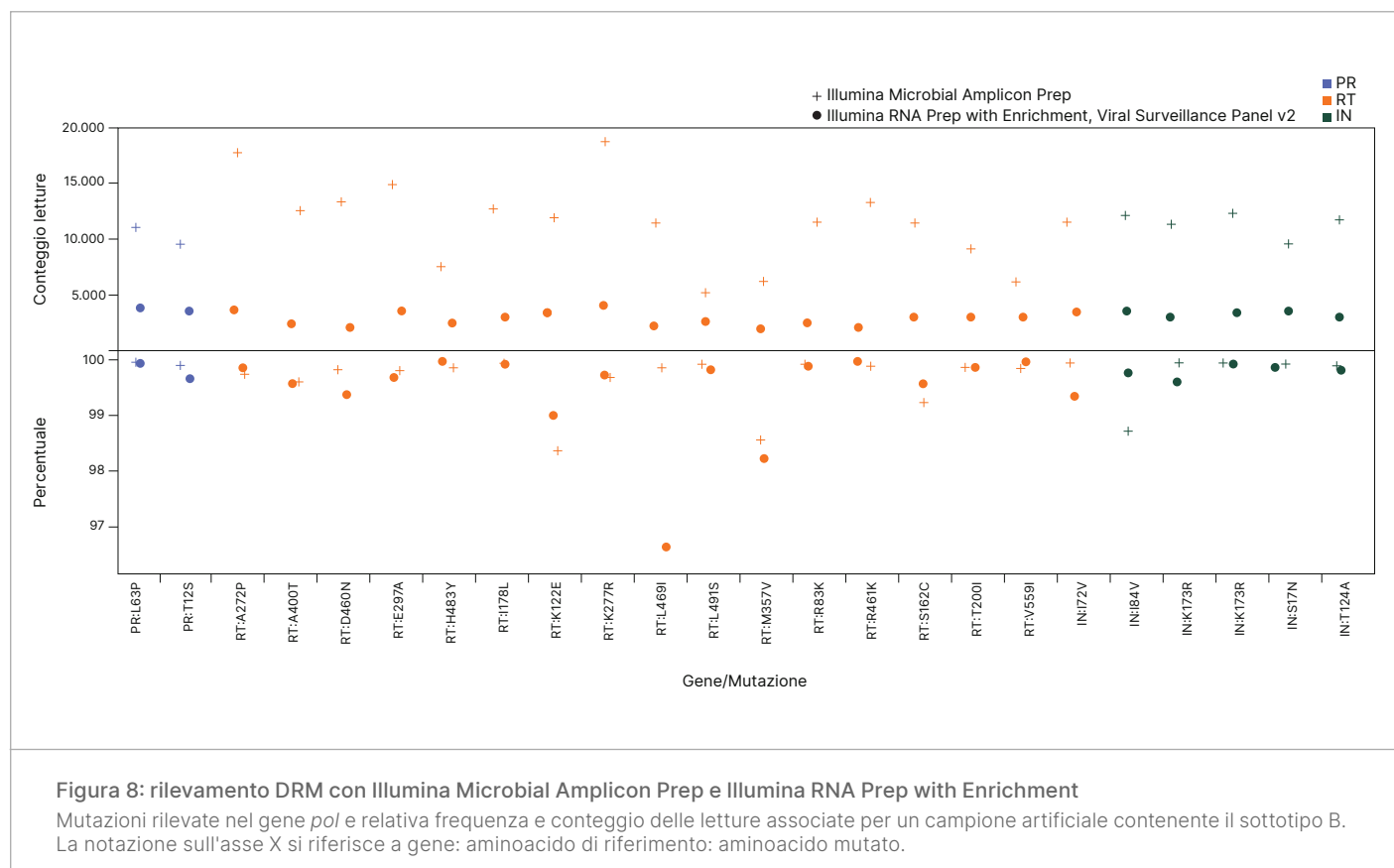
Diagrammi di copertura del genoma per un campione di plasma rappresentativo (A) analizzato con l'app DRAGEN Microbial Enrichment Plus e (B) analizzato con il flusso di lavoro iterativo DRAGEN Microbial Enrichment Plus. I risultati mostrano che il flusso di lavoro iterativo ha migliorato la copertura del genoma HIV-1 dal 95,27% al 99,11%.

Saggio per le mutazioni farmaco-resistenza

I FASTQ normalizzati dei saggi Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment per il sottotipo B, input di 10.000 copie virali, sono stati analizzati utilizzando lo [Stanford HIV Drug Resistance Database](#) per valutare la presenza di DRM con parametri predefiniti (soglia di profondità di lettura minima maggiore o uguale a 50, soglia di miscela nucleotidica minore o uguale al 2%, soglia di rilevamento delle mutazioni maggiore o uguale al 10%). Nei dati generati da entrambi i saggi non sono state rilevate mutazioni maggiori o minori di PI, NRTI/NNRTI o INSTI. Altre mutazioni (n = 24) previste dalla sequenza genomica dell'HIV-1 fornita da SeraCare sono state rilevate utilizzando entrambi i saggi (Figura 8).

Riepilogo

MiSeq i100 Series, combinato con una preparazione delle librerie di alta qualità utilizzando sia Illumina Microbial Amplicon Prep sia Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2, ha dimostrato capacità di sequenziamento mirate per il rilevamento dell'HIV-1 e il profilo di resistenza ai farmaci. Sebbene Illumina Microbial Amplicon Prep abbia fornito una copertura più profonda del gene HIV *pol* con un flusso di lavoro più semplice, Illumina RNA Prep with Enrichment con Viral Surveillance Panel v2 ha fornito una copertura genomica completa dei ceppi di HIV. Questa nota sull'applicazione dimostra che MiSeq i100 Series fa parte di un flusso di lavoro NGS end-to-end flessibile per la caratterizzazione dell'HIV che può essere personalizzato in base alle esigenze dell'utente.



Ulteriori informazioni →

[MiSeq i100 Series](#)[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)[Viral Surveillance Panel v2](#)

Bibliografia

- Greene WC. [A history of AIDS: looking back to see ahead](#) [una correzione pubblicata appare in *Eur J Immunol*. Gennaio 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](#). Pubblicato a luglio 2024. Consultato il 20 maggio 2025.
- World Health Organization. HIV data and statistics. [who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics](#). Pubblicato a luglio 2024. Consultato il 20 maggio 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. Pubblicato il 1° ottobre 2015. doi:10.1038/nrdp.2015.35
- Swinkels HM, Nguyen AD, Gulick PG. [HIV and AIDS](#). [Aggiornato il 27 luglio 2024]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Pubblicazione di StatPearls; gennaio 2025.
- 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. Pubblicato il 23 gennaio 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. Pubblicato il 2 febbraio 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](#) [una correzione pubblicata appare in *Lancet Infect Dis*. Marzo 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



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

© 2025 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](#). M-GL-03571 ITA v1.0