

Sequenciamento do genoma do HIV no MiSeq™ i100 Series

Detecção e caracterização precisas do HIV-1



Interrogação rápida do gene *pol* do HIV com o Illumina Microbial Amplicon Prep para detecção viral e detecção de resistência a medicamentos



Sequenciamento abrangente do genoma do HIV com o Viral Surveillance Panel v2 para rastreamento da evolução viral e detecção de mais de 200 outros patógenos virais



Fluxo de trabalho flexível completo com sequenciamento no MiSeq i100 Series e DRAGEN™ secondary analysis

Introdução

Os sintomas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foram reconhecidos pela primeira vez em 1981 e, nos anos seguintes, foram atribuídos à infecção por vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2).¹⁻⁴ A pandemia do HIV viu mais de 88 milhões de pessoas infectadas pelo HIV em todo o mundo e mais de 42 milhões de pessoas perderam a vida para a doença.⁵ Aproximadamente 1,3 milhão de novas infecções e 630 mil mortes foram relatadas apenas em 2023.⁶

Avanços na prevenção de doenças e no desenvolvimento de medicamentos antirretrovirais eficazes fizeram a transição da pandemia de HIV para uma doença crônica controlável, reduzindo significativamente o risco de transmissão do HIV e progressão da doença para AIDS.⁷⁻⁹ No entanto, em andamento, a transmissão sustentada do HIV entre populações vulneráveis em regiões ao redor do mundo destaca a necessidade contínua de vigilância do HIV.⁸ A vigilância molecular por sequenciamento de última geração (NGS) permite a detecção de variantes que conferem resistência a medicamentos antirretrovirais, rastreamento da transmissão do HIV, incluindo a transmissão de HIV resistente a medicamentos, detecção de variantes associadas ao tropismo pelo HIV, e rastreamento da evolução viral intra-hospedeiro.^{10,11} Em particular, mutações no gene *pol* do HIV podem conferir resistência a inibidores de protease (PIs), inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTIs), inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTIs) e inibidores da transferência de fita da integrase (INSTIs).¹² Assim, o gene *pol* do HIV é um alvo importante para a detecção genotípica de resistência a medicamentos antirretrovirais.

Esta nota de aplicação demonstra a detecção e caracterização do HIV no plasma sanguíneo HIV-positivo e em amostras artificiais usando um fluxo de trabalho NGS que integra a preparação da biblioteca Illumina, sequenciamento no MiSeq i100 Series e DRAGEN secondary analysis (Figura 1).

Métodos

Amostras

As amostras de plasma HIV-positivas foram obtidas do site [BIOFLUIDS.com](https://biofluids.com) e o RNA foi extraído usando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, N.º do catálogo 52904), usando o procedimento Mini Spin, omitindo a adição de RNA carreador à solução tampão AVL.* As amostras concebidas foram formuladas para teste usando RNA purificado extraído de vírus propagados em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) fornecidas pelo SeraCare (Tabela 1). Os controles que representam quatro subtipos prevalentes de HIV-1 foram enriquecidos em um fundo de 10 ng de RNA de Referência Universal Humano (UHRR) para uma entrada total de 690 cópias virais/µl para Illumina Microbial Amplicon Prep e 1176 cópias virais/µl para Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 para avaliar o desempenho em diferentes subtipos de HIV-1 pertencentes ao grupo M (Tabela 1).¹³

* A entrada suficiente de ácido nucleico viral é essencial para um bom desempenho. Considerações sobre o método de extração, como centrifugação com sacarose (gradiente de sacarose) ou adição de RNA carreador, podem melhorar a sensibilidade, particularmente para amostras de baixo título.¹⁴



Figura 1: Fluxo de trabalho NGS abrangente para vigilância do HIV

Combine o preparo de biblioteca Illumina usando uma abordagem baseada em amplicons ou enriquecimento direcionado com sequenciamento no MiSeq i100 Series e DRAGEN secondary analysis para caracterização genômica precisa do HIV.

Tabela 1: RNAs purificados obtidos para controles de subtipos

Nome do produto SeraCare	N.º do material.	ID do isolado
RNA purificado de HIV-1 subtipo C	0400-0079	DJ259
RNA purificado de HIV-1 subtipo B	0400-0078	US1
RNA purificado de HIV-1 subtipo CRF01-AE	0400-0084	POC30506
RNA purificado de HIV-1 subtipo CRF02-AG	0400-0076	POC44951

Preparação da biblioteca

O sequenciamento direcionado do HIV foi realizado por sequenciamento de amplicon usando o Illumina Microbial Amplicon Prep (Illumina, N.º do catálogo 20097857) e por enriquecimento de alvo usando o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 (Illumina, N.º do catálogo 20108081).

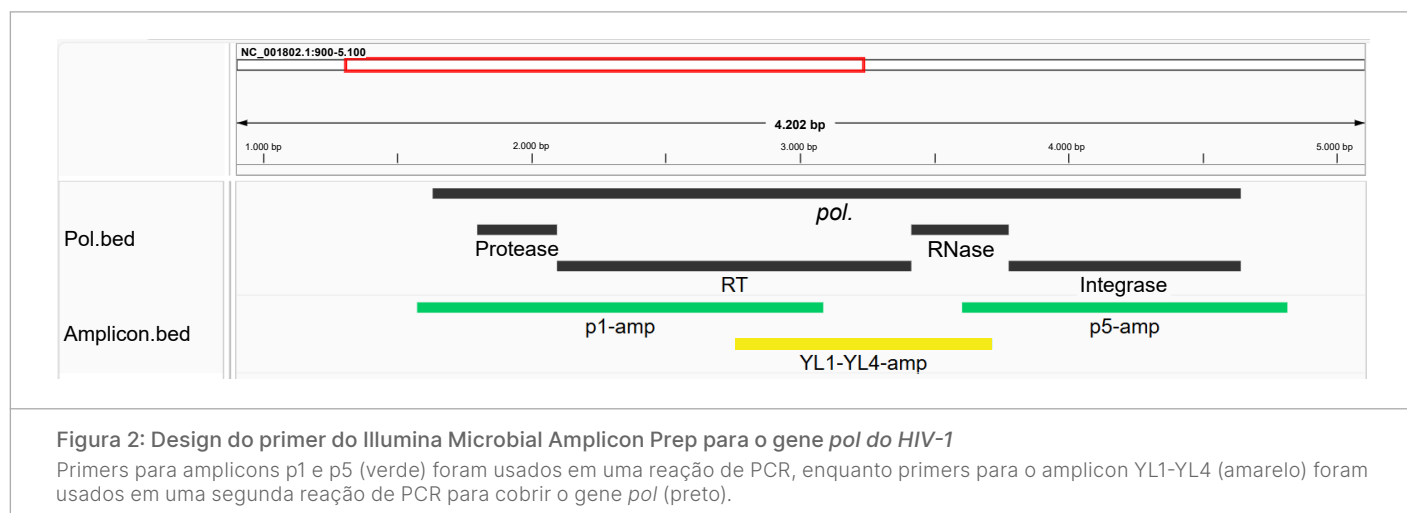
Sequenciamento por amplicon

Para o Illumina Microbial Amplicon Prep, primers personalizados, incluindo primers publicados anteriormente¹⁵ e primers suplementares projetados por cientistas da Illumina para garantir a amplificação do gene *pol* do HIV para vários subtipos de HIV-1, foram obtidos de tecnologias integradas de DNA (IDT) e diluídos a 10 µm por pool (Tabela 2). Como os amplicons direcionados ao gene *pol* se sobrepõem em relação ao genoma do HIV-1, os primers foram agrupados em dois tubos separados e usados em PCR de amplicon em duas reações independentes. Essa abordagem é necessária para evitar a geração de amplicon pequeno e permite esquemas de amplicon estilo ARTIC¹⁶ (Figura 2).

Tabela 2: Primers personalizados usados para amplificação do HIV-1 com o Illumina Microbial Amplicon Prep

Nome do primer	Sequência do primer 5'–3'
P1-F v2	AGGGYTG YTGAAATGYGG
P1-R v2	CTGTADTTCTGCTAYTAAMTTTTGATGG
P1-F	TTGAAATGTGAAAGGAAGGAC
P1-R	CTGTATTTCTGCTATTAAGTTTTGATGGG
P5-F	GGAATCATTCAAGCACAACCAGA
P5-F v2	TATGCAYTAGGAATYATTCARGCACA
P5-R	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATAT
P5-R v2	TCTCCTGTATGCAGACCCCAATATG
Nome do primer	Sequência do primer 5'–3'
YL1	AGAACCYCCATTCTTYGGATGGG
YL1 v2	AAGCATCAAAGGAACCTCCCTT
YL4	CCTTTGTGCTGGTACCCATG
YL4 v2	CCACATGGACAGCAACTATTATG

Os primers suplementares projetados pelos cientistas da Illumina para maior cobertura taxonômica são indicados por "v2" no nome do primer, fornecido pela Integrated DNA Technologies.



As bibliotecas prontas para sequenciamento foram preparadas com pequenas modificações no protocolo Illumina Microbial Amplicon Prep, incluindo uma redução na entrada aleatória de hexâmero (2,5 µl em vez de 8,5 µl), entrada de RNA (14,5 µl em vez de 8,5 µl) e volumes de entrada de amplicon de reação de tagmentação (10 µl de reações de amplificação p1 e p5, 5 µl da reação de amplificação YL1-YL4 e 5 µl de DEPC H₂O).

Enriquecimento-alvo

O Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 cobre todo o genoma do HIV-1 e HIV-2, fornecendo sequenciamento de genoma completo (WGS) do HIV e de cerca de 200 vírus adicionais. As bibliotecas prontas para sequenciamento foram preparadas conforme o protocolo do fabricante.

Sequenciamento

As bibliotecas preparadas foram sequenciadas no MiSeq i100 Plus System usando uma lâmina de fluxo de 25M com configuração de corrida de 2 × 150 bp.

Análise de dados

Após a conclusão do sequenciamento, os dados foram normalizados para 0,5 M de clusters/1 M de leituras tipo paired-end (PE) e 1 M de clusters/2 M de leituras paired-end (PE) para Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment com Viral Surveillance Panel v2, respectivamente, usando a aplicação FASTQ Toolkit. Os dados normalizados foram analisados usando as aplicações DRAGEN Microbial Amplicon e DRAGEN Microbial Enrichment Plus na nuvem no BaseSpace™ Sequence Hub. Essas aplicações também podem ser acessadas diretamente no MiSeq i100 Plus System. Para determinar as informações de resistência ao medicamento, FASTQs normalizados foram usados como entrada no banco de dados de Stanford disponível publicamente.¹⁷

A aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus realiza uma montagem guiada por referência; portanto, é necessário o painel correto e o conjunto associado de seqüências de referências do genoma dos vírus-alvo do painel. Portanto, o Viral Surveillance Panel v2 deve ser selecionado no menu suspenso do painel de enriquecimento na aplicação. Apesar do grande e diversificado conjunto de genomas de referência do HIV-1 usados no fluxo de trabalho da aplicação selecionada para detecção e alinhamento, é possível que um genoma de referência mais representativo para determinada amostra esteja disponível e seja mais apropriado para a análise. Assim, foi adotada uma abordagem iterativa, reexecutando os fluxos de trabalho DRAGEN Microbial Enrichment Plus ou DRAGEN Microbial Amplicon (Figura 3).

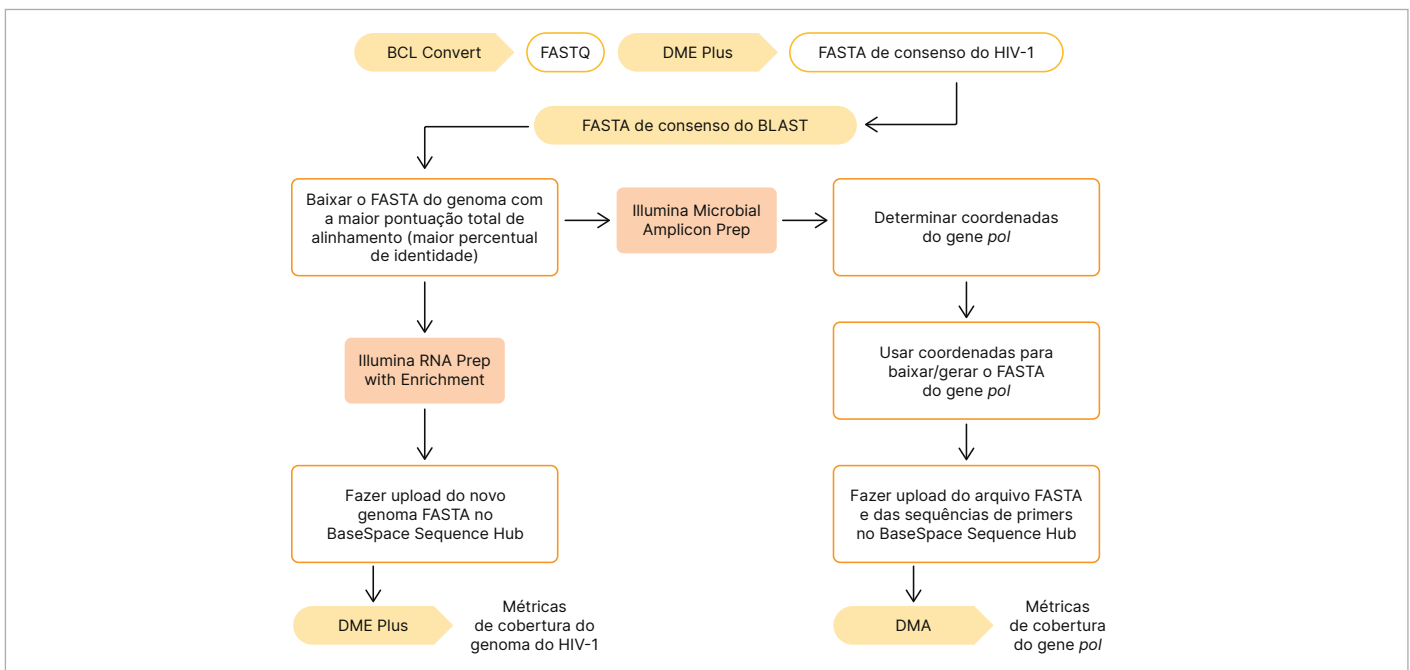


Figura 3: Fluxo de trabalho de análise iterativa DRAGEN Microbial Enrichment Plus/DRAGEN Microbial Amplicon

Além das métricas de cobertura, a identificação de variantes e a geração de seqüências consenso também são produzidas nos fluxos de trabalho DRAGEN Microbial Amplicon (DMA) e DRAGEN Microbial Enrichment Plus (DME plus).

Resultados

Cobertura do gene *pol* do HIV-1 com o Illumina Microbial Amplicon Prep

A análise dos dados de sequenciamento do Illumina Microbial Amplicon Prep de uma amostra de plasma sanguíneo usando a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus resultou na detecção do HIV-1 e na geração de um arquivo FASTA de consenso do HIV-1, que foi posteriormente utilizado na análise BLAST para determinar um arquivo FASTA de acesso representativo. Para obter métricas específicas do gene *pol*, a ferramenta Gene Cutter do banco de dados de sequências de HIV do [Los Alamos National Laboratory](#) foi usada para extrair da sequência do genoma do HIV-1 apenas a região do gene *pol*. O alinhamento da saída de *pol* com uma sequência de referência usando a aplicação DRAGEN Microbial Amplicon mostrou 100% de cobertura em todo o gene *pol* (Figura 4).

Para amostras artificiais, a análise DRAGEN Microbial Enrichment Plus detectou HIV-1 em todas as réplicas técnicas da biblioteca Illumina Microbial Amplicon Prep. A reanálise com o DRAGEN Microbial Amplicon foi realizada para todas as amostras usando o fluxo de trabalho de análise iterativa. A análise DRAGEN Microbial Amplicon demonstra a cobertura completa do gene *pol* para cada amostra artificial testada (Figura 5).

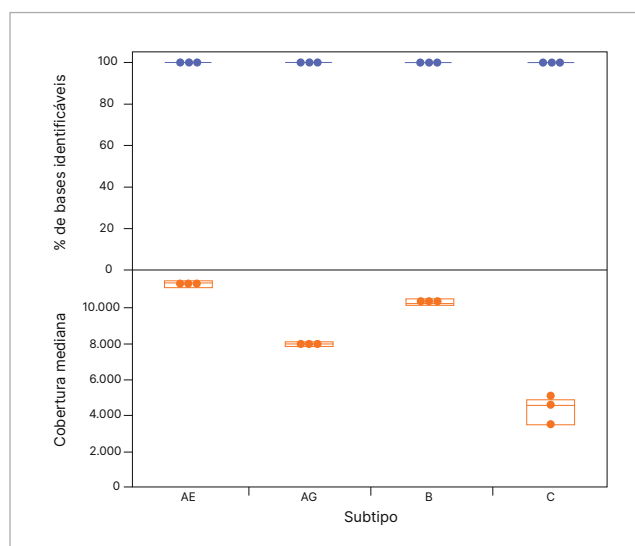


Figura 5: Métricas de cobertura para subtipos de HIV-1 com Illumina Microbial Amplicon Prep

Porcentagem de bases identificáveis e profundidade mediana de cobertura para o gene *pol*. Os resultados indicam que o pool de primers selecionados amplifica cepas de HIV-1 de diferentes subtipos.

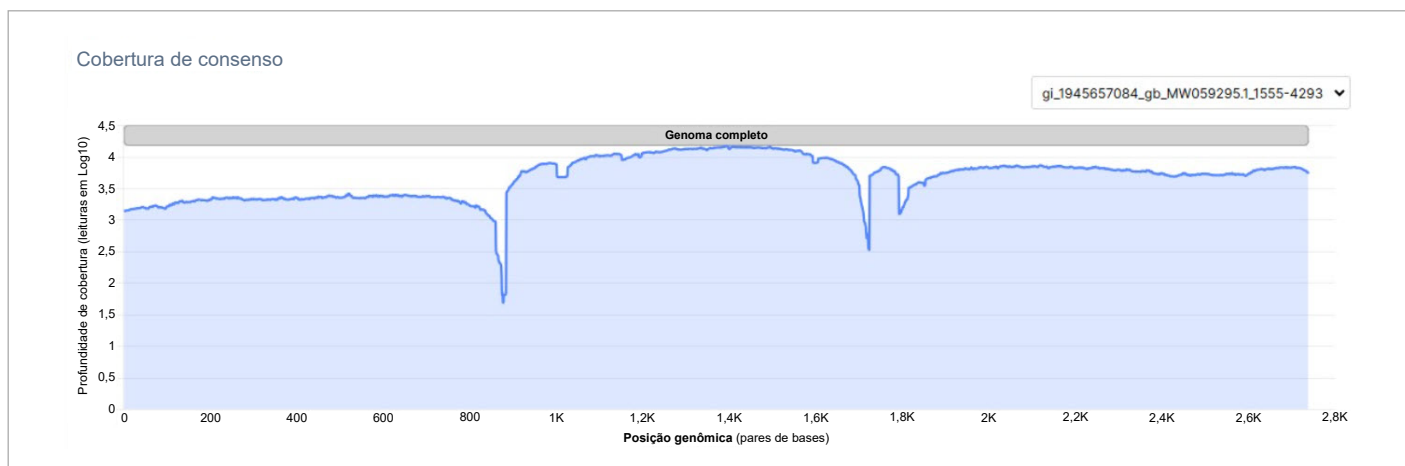


Figura 4: Cobertura do genoma da região *pol* do HIV-1 com o Illumina Microbial Amplicon Prep

Gráfico de cobertura do genoma de uma amostra representativa de plasma analisada com a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Os resultados mostram cobertura completa (100%) em todo o gene *pol*.

Cobertura do genoma do HIV-1 com Illumina RNA Prep with Enrichment

A análise DRAGEN Microbial Enrichment Plus detectou HIV-1 em algumas bibliotecas não enriquecidas e todas as bibliotecas enriquecidas com Viral Surveillance Panel v2 em várias entradas de cópia viral (Figura 6). A análise inicial do DRAGEN Microbial Enrichment Plus gerou gráficos de cobertura para as amostras com nas quais HIV-1 foi detectado. Para uma amostra de plasma representativa, 95,27% do genoma do HIV-1 foi coberto ($\geq 1\times$ de profundidade) com profundidade mediana de 757,5 \times e 114 150 leituras alinhadas (Figura 7A). A sequência do genoma consenso dessa análise foi analisada usando BLAST e o banco de dados Nucleotide. O genoma do HIV-1 com pontuação mais alta foi usado como entrada no fluxo de trabalho de análise iterativa do DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Isso resultou em métricas de cobertura maiores, com 99,11% do genoma coberto ($\geq 1\times$ de profundidade) (Figura 7B).

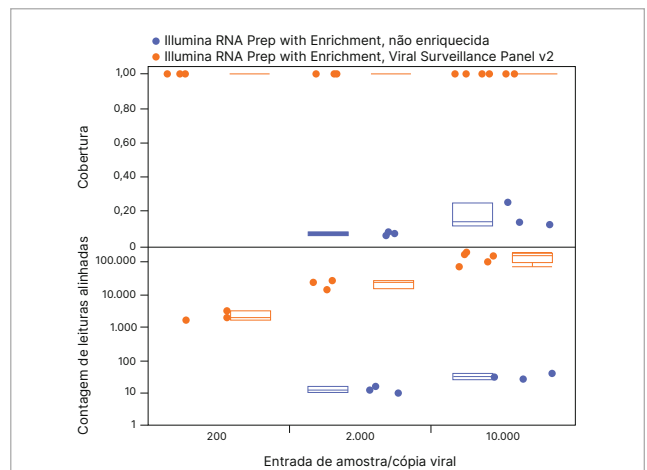


Figura 6: Maior cobertura com Illumina RNA Prep with Enrichment em relação a bibliotecas não enriquecidas

Cobertura do genoma do HIV-1 para amostra artificial do subtipo B. A baixa quantidade de leituras virais em bibliotecas não enriquecidas demonstra a necessidade de amplificação ou enriquecimento.

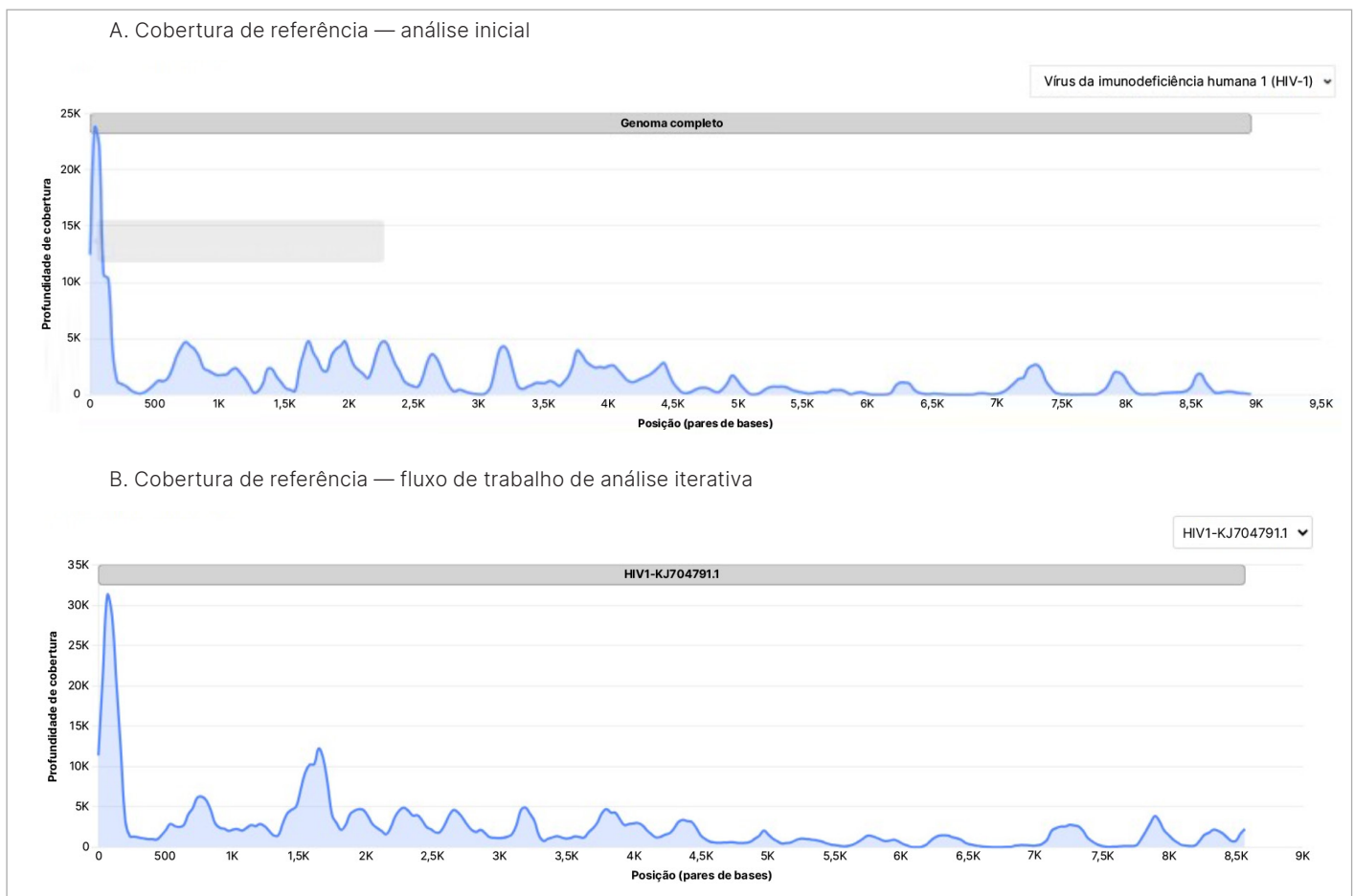


Figura 7: Cobertura genômica do HIV-1 com Illumina RNA Prep with Enrichment

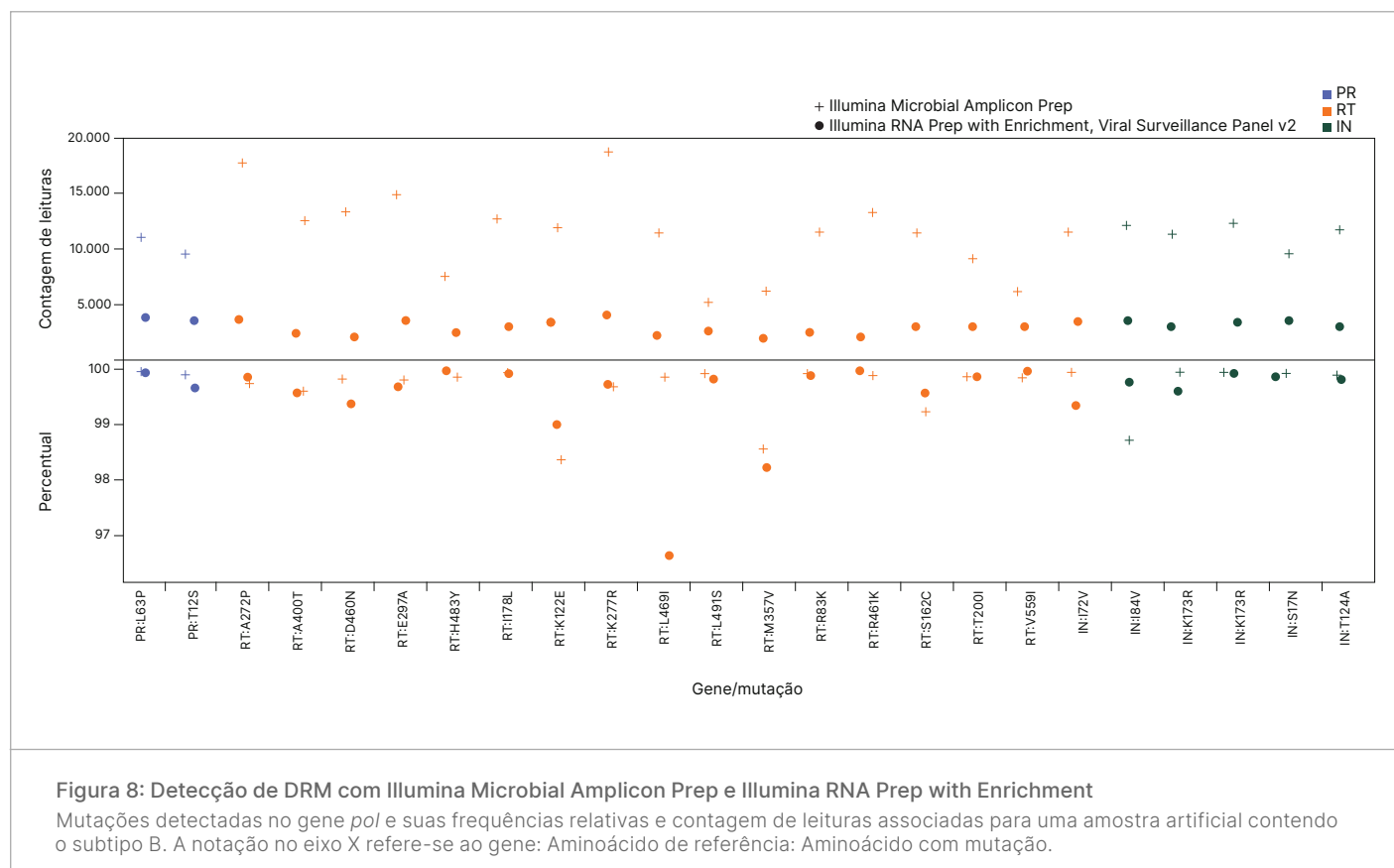
Gráficos de cobertura do genoma de uma amostra representativa de plasma sanguíneo (A) analisada com a aplicação DRAGEN Microbial Enrichment Plus e (B) analisada com o fluxo de trabalho iterativo do DRAGEN Microbial Enrichment Plus. Os resultados mostram que o fluxo de trabalho iterativo melhorou a cobertura do genoma do HIV-1 de 95,27% para 99,11%.

Ensaio para mutações de resistência a medicamentos

FASTQs normalizados de ambos os ensaios Illumina Microbial Amplicon Prep e Illumina RNA Prep with Enrichment para o subtipo B, com entrada de 10 000 cópias virais, foram analisados usando o [Stanford HIV Drug Resistance Database](#) para avaliar a presença de DRMs com parâmetros padrão (limite mínimo de profundidade de leitura ≥ 50 , limite de mistura de nucleotídeos $\leq 2\%$, limite de detecção de mutação $\geq 10\%$). Não foram detectadas mutações principais ou secundárias de IP, NRTI/NNRTI ou INSTI nos dados gerados a partir de qualquer ensaio. Outras mutações (n = 24) previstas pela sequência do genoma do HIV-1 fornecida pelo SeraCare foram detectadas usando ambos os ensaios (Figura 8).

Resumo

O MiSeq i100 Series combinado com a preparação de bibliotecas de alta qualidade usando o Illumina Microbial Amplicon Prep e o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2, mostrou capacidade de sequenciamento direcionado para a detecção de HIV-1 e análise do perfil de resistência a medicamentos. Embora o Illumina Microbial Amplicon Prep tenha proporcionado cobertura mais profunda do gene *pol* do HIV com um fluxo de trabalho mais simples, o Illumina RNA Prep with Enrichment com o Viral Surveillance Panel v2 enrichment produziu cobertura genômica completa de cepas de HIV. Esta nota de aplicação demonstra que o MiSeq i100 Series faz parte de um fluxo de trabalho NGS flexível e completo para caracterização do HIV que pode ser adaptado às necessidades do usuário.



Saiba mais →

[MiSeq i100 Series](#)

[Illumina Microbial Amplicon Prep](#)

[Viral Surveillance Panel v2](#)

Referências

- Greene WC. [A history of AIDS: looking back to see ahead](#) [published correction appears in *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
- World Health Organization. The Global Health Observatory HIV. [who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids](https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids). Publicado em julho de 2024. Acessado em 20 de maio de 2025.
- World Health Organization. HIV data and statistics. [who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics](https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics). Publicado em julho de 2024. Acessado em 20 de maio 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](#). *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15035. Published 2015 Oct 1. doi:10.1038/nrdp.2015.35
- Swinkels HM, Nguyen AD, Gulick PG. [HIV and AIDS](#). [Atualizado em 27 de julho de 2024]. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; janeiro de 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. Publicado em 23 de janeiro 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. Publicado em 2 de fevereiro 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](#) [published correction appears in *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



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

© 2025 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-03571 PTB v1.0