

Illumina Microbial Amplicon Prep pour la surveillance virale

Des performances
adaptables pour une
couverture complète
du génome viral

Introduction

La surveillance génomique des microbes pathogènes est un outil essentiel pour la santé publique. Ce besoin est justifié par des épidémies continues, l'impact du changement climatique, la perte d'habitat par empiètement et la poursuite des événements de transmission zoonotique¹.

Illumina Microbial Amplicon Prep fournit un outil de surveillance génomique personnalisable avec un flux de travail rationalisé et établi utilisant la même chimie que le test Illumina COVIDSeq^{MC} Assay (figure 1). Le flux de travail intègre la préparation des échantillons et des bibliothèques (y compris la conversion de l'ADNc pour les cibles d'ARN, l'amplification par PCR, la tagmentation, l'amplification des bibliothèques et les réactifs de nettoyage des billes), le séquençage éprouvé d'Illumina et l'analyse secondaire primée de la plateforme DRAGEN^{MC}. Pour démontrer la grande capacité du séquençage du génome entier (WGS, Whole-Genome Sequencing) de virus avec Illumina Microbial Amplicon Prep, plusieurs arbovirus (chikungunya, dengue 1 et Zika), le virus Mpox et le virus respiratoire syncytial humain (VRSh) A/B ont été testés à l'aide d'ensembles de primers provenant d'outils de conception de primers libres ou de la littérature scientifique établie avec des modifications mineures du protocole. Les résultats montrent une couverture complète des génomes viraux de diverses tailles pour une surveillance efficace.

Méthodes

Préparation des échantillons

Arbovirus

Pour caractériser la performance du test Illumina Microbial Amplicon Prep pour les arbovirus, les contrôles d'ARN génomique des virus du chikungunya, de la dengue 1 et Zika disponibles sur le marché ont été évalués (tableau 1).

Les nombres de copies définis d'ARN génomique ont été ajoutés à 10 ng d'ARN de référence humaine universelle (Agilent, référence n° 740000) pour fonctionner comme un échantillon artificiel de virus à ARN.

Tableau 1 : Échantillons viraux utilisés pour l'évaluation

Virus	Fournisseur	N° de produit
Chikungunya	Vircell	MBC099-R
Dengue 1	Vircell	MBC055-R
Zika	ATCC	VR-1843DQ

Mpox

Pour caractériser la performance du virus à ADN, des échantillons d'ADN provenant de lésions cutanées positives au virus Mpox ont été extraits à l'aide de la trousse QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, référence n° 61104) et utilisés comme entrée pour le test Illumina Microbial Amplicon Prep à l'étape « Amplification de l'ADNc » du protocole. La charge virale des échantillons a été déterminée à l'aide de la qPCR effectuée par Aegis Sciences Corporation sur l'instrument AB 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, référence n° 4406985/4406984) pour obtenir les valeurs de cycle seuil (Ct, Cycle Threshold).

VRSh

Pour caractériser la performance du test pour le VRSh, des échantillons de prélèvement nasal (280 µl) stockés dans des milieux de transport viral ont été extraits à l'aide de la trousse QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, référence n° 52904). L'acide nucléique extrait a ensuite été traité par DNase à l'aide de la trousse Quick-RNA MicroPrep Kit (Zymo Research, référence n° R1050). Les échantillons ont ensuite été dilués à 1:10 pour obtenir un volume supplémentaire pour effectuer des tests répétés et/ou optimiser les tests.

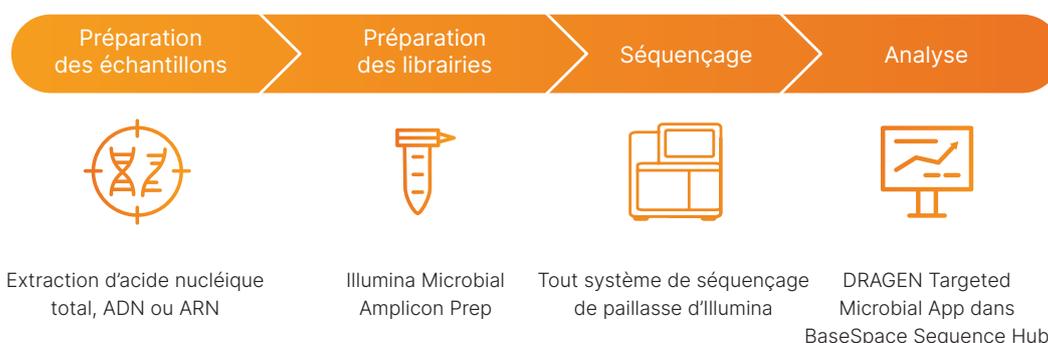


Figure 1 : Flux de travail d'Illumina Microbial Amplicon Prep : Illumina Microbial Amplicon Prep fait partie d'un flux de travail rationalisé pour le WGS viral qui intègre la préparation des échantillons et des bibliothèques au séquençage sur n'importe quel système de séquençage de paillasse d'Illumina et l'analyse secondaire DRAGEN.

La qPCR a été effectuée à l'aide du protocole et des sondes conçus par les Centers for Disease Control (CDC, Centres pour le contrôle des maladies) et de la trousse iTaq Universal Probes One-Step Kit 500 × 20 µl (Bio-Rad Laboratories, référence n° 1725141). L'inclusion d'un échantillon extrait non dilué dans le test Illumina Microbial Amplicon Prep est suggérée en cas d'utilisation d'échantillons dont le nombre de copies cibles est inconnu pour maximiser l'amplification de la cible.

Conception des primers

Tous les primers ont été commandés auprès d'Integrated DNA Technologies (normalisés à 100 µM) et regroupés avec des concentrations équimolaires. Les primers ont été assemblés en deux regroupements pour générer deux ensembles d'amplicons qui se chevauchent.

Arbovirus

Bien que les conceptions d'amplicons de 400 pb soient recommandées comme taille d'amplicons par défaut pour la conception de primers, des amplicons plus longs sont possibles avec les cibles d'ARN et d'ADN. Les amplicons plus longs réduisent le nombre de primers nécessaires, le risque d'interactions avec les hétérodimères, les interactions de liaison hors cible et peuvent être nécessaires pour couvrir les régions présentant une variabilité élevée. Les amplicons plus courts peuvent être avantageux, car leur performance peut être plus fiable en cas d'échantillons dégradés et de régions difficiles à amplifier (structure secondaire du génome viral).

Pour le virus du chikungunya, la séquence génomique NC_004162.2 a été traitée par l'[outil logiciel PrimalScheme](#), ciblant une taille d'amplicon de 400 pb, pour générer la conception de regroupement de primers CHIK-PP. Ce regroupement de primers (CHIK-PP) a été utilisé pour tester le contrôle Amplirun Chikungunya Virus RNA Control (Vircell, référence n° MBC099-R). Pour le virus de la dengue 1, la séquence génomique KM204119.1 a été traitée par l'outil logiciel PrimalScheme, ciblant une taille d'amplicon de 400 pb. Ce regroupement de primers (DENV1-PP) a été utilisé pour tester le contrôle Amplirun Dengue 1 Virus RNA Control (Vircell, référence n° MBC055-R). Pour le virus Zika, une conception de primers existante ciblant une taille d'amplicon de 400 pb générée par PrimalScheme a été utilisée². Les primers ont été regroupés de manière équimolaire et testés à l'aide du contrôle Zika Virus RNA Control (ATCC, référence n° VR-1843DQ).



Pour en savoir plus sur l'outil PrimalScheme, rendez-vous sur www.primalscheme.com

Mpox

Pour le virus Mpox, l'ADNg a été testé à l'aide d'un regroupement de primers optimisé conçu à l'aide de PrimalScheme ciblant une taille d'amplicon d'environ 2 000 pb³. Le regroupement de primers Mpox initial contient 326 primers optimisés par l'ajout de cinq primers supplémentaires pour compenser les pertes observées dans les amplicons 11, 75 et 118 afin de créer le regroupement de primers MPX-GL-Yv2.

VRSh

Une conception de primers des CDC⁴ et une conception de primers du Centre de collaboration de l'OMS pour la référence et la recherche sur la grippe (WCCRRRI, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza)⁵ ont été testées avec des échantillons nasopharyngés positifs au VRSh acquis auprès de Discovery Life Sciences. La conception des primers des CDC (hRSV-A/B-CDC20) comprenait une conception de primers pour VRShA et une autre conception de primers pour VRShB. Les conceptions de primers hRSV-A/B-CDC20 ont généré 19 (VRShA) ou 20 (VRShB) amplicons au total, ciblant une taille d'amplicon d'environ 925 pb. En cas d'utilisation de la conception de primers des CDC, les utilisateurs doivent déterminer le sous-type de VRSh (A/B) à l'aide de la qPCR avec des ensembles de sondes établis pour déterminer quelle conception de primers utiliser⁶. La conception de primers du WCCRRRI (hRSV-WCCRRRI6) a pour objectif de générer six amplicons pour VRShA ou VRShB, ciblant diverses tailles d'amplicons d'environ 2 000 à 4 400 pb. Avec la conception de primers du WCCRRRI, la détermination du sous-type de VRSh n'est pas requise.

Préparation des bibliothèques

Le [protocole Illumina Microbial Amplicon Prep](#) a été suivi, sans modifications, pour préparer des bibliothèques pour le chikungunya, la dengue 1 et le virus Zika. Pour le virus Mpox, l'ADN extrait d'échantillons positifs au virus Mpox a été traité à partir de l'étape « Amplification de l'ADNc » du protocole, car l'étape de transcription inverse n'est pas requise pour les échantillons de virus à ADN. Pour le VRSh, l'ARN extrait a été traité conformément au protocole Illumina Microbial Amplicon Prep, avec les modifications suivantes :

- L'étape « Fixation de l'ARN par anelage » a été modifiée pour ajouter 2,5 µl d'EPH3 et 6 µl d'eau de qualité moléculaire au lieu de l'entrée par défaut de 8,5 µl d'EPH3. Des tests antérieurs ont montré que la réduction de l'entrée d'EPH3 améliore les performances avec des amplicons supérieurs à 400 pb (données non présentées).
- Le programme PCR « Amplification de l'ADNc » a été modifié pour réduire la température d'anelage afin de faciliter un anelage approprié des primers ([tableau 2](#)).

Cette température a été déterminée à l'aide des séquences de primers des conceptions de primers CDC20 et WCCRR1 et d'un [Tm Calculator](#) (Calculateur de température de fusion) en ligne.

Tableau 2 : Modifications apportées au programme PCR « Amplification de l'ADNc »

Étape	Température (°C)	Durée (s)	Nbre de cycles
1	98	180	1
2	98	15	
3	56/59 ^a	30	35
4	72	180	
5	4	maintien	—

a. La température d'anneau a été abaissée de 63 °C à 56 °C et 59 °C pour les ensembles de primers CDC20-RSV-A/B et WCCRR1, respectivement. Le programme PCR a été exécuté pendant 35 cycles.

Séquençage

Les librairies préparées ont été dénaturées et diluées à partir d'une librairie regroupée conformément au Guide de dénaturation et de dilution de librairies des systèmes de séquençage NextSeq^{MC} 500 et 550. Les librairies ont été séquencées sur NextSeq 550 System à une longueur de lecture de 2 × 149 pb et normalisées à une profondeur d'un million de lectures appariées selon les recommandations de séquençage actuelles pour le test COVIDSeq.

Analyse des données

Les données de séquençage ont été analysées à l'aide de l'application DRAGEN Targeted Microbial App, disponible dans BaseSpace^{MC} Sequence Hub. Cette application facile à utiliser permet d'aligner les lectures sur les génomes de référence, de réaliser des appels de variants et de générer une séquence de consensus génomique représentant la population des espèces d'acide nucléique dans l'échantillon. Lorsqu'elles étaient disponibles, les bases de données externes conservées étaient accessibles pour d'autres analyses de lignées.

Résultats

Séquençage des arbovirus

Le séquençage des librairies d'arbovirus a entraîné une médiane de réplicats techniques de 80 % et 96 % de $\geq 10\times$ la couverture du génome à un apport de 500 et 5 000 copies virales, respectivement pour le virus chikungunya ([figure 2A, 2B](#)); une médiane de 94 % et 98,5 % du génome couvert à $\geq 10\times$ la couverture du génome à

un apport de 500 et 5 000 copies virales, respectivement pour le virus de la dengue 1 ([figure 2C, 2D](#)); et une médiane de 97,2 % et 98,5 % de $\geq 10\times$ la couverture du génome à un apport de 500 et 5 000 copies virales, respectivement pour le virus Zika ([figure 2E, 2F](#)).

Pour tous les arbovirus séquencés, l'apport d'un plus grand nombre de copies virales augmentait la couverture, démontrant une variabilité des performances par titre viral. L'alignement des lectures de séquençage a permis de détecter plusieurs substitutions dans le génome de référence viral utilisé pour l'analyse et la conception des primers. Ces substitutions pourraient entraîner une diminution de la couverture ou une perte des amplicons si elles se produisent au niveau des sites de liaison des primers, en particulier vers l'extrémité 3' des primers. Un écart de substitution a été observé entre les librairies testant le même échantillon viral ou le même contrôle ([figure 2E, 2F](#)). Les réplicats techniques peuvent être utiles pour les amplicons qui s'amplifient de manière inégale et sont recommandés pour confirmer l'appel des variants dans l'application DRAGEN Targeted Microbial App.

Séquençage du virus Mpox

Le séquençage du virus Mpox a entraîné une couverture génomique fiable à un million de lectures appariées, malgré un génome environ 20× plus grand que les arbovirus testés ([figure 3A](#)). Bien que la couverture des répétitions terminales inversées (ITR, Inverted Terminal Repeat) ne soit pas représentée (en raison de l'omission par le pipeline d'analyse des lectures avec plusieurs alignements), l'analyse ultérieure des alignements supplémentaires du fichier BAM a montré que ces régions ont été amplifiées avec succès (données non présentées). L'évaluation de l'effet de l'apport de copies virales sur la performance a démontré que les lectures cartographiées peuvent ne pas se traduire par une couverture génomique complète pour les échantillons à titre faible ([figure 3B](#)).

Séquençage du VRSh

Les résultats du séquençage ont montré que les deux regroupements de primers évalués étaient capables d'amplifier les génomes VRSh-A/B ([figure 4](#)). Une analyse plus approfondie a montré que la profondeur de couverture réduite observée dans les génomes VRSh-A/B amplifiés avec le regroupement de primers WCCRR1 correspondait à l'amplicon le plus long (environ 4 300 pb, [figure 4A, 4C](#))⁵. Bien que PrimalScheme soit recommandé pour la conception d'amplicons, ces résultats montrent que d'autres conceptions de primers peuvent fournir une couverture génomique complète avec des modifications du protocole. Une optimisation supplémentaire pourrait consister à intégrer les derniers génomes du VRSh soumis à la plateforme GISAID dans la conception de primers pour cibler les souches de VRSh les plus répandues et actuelles.

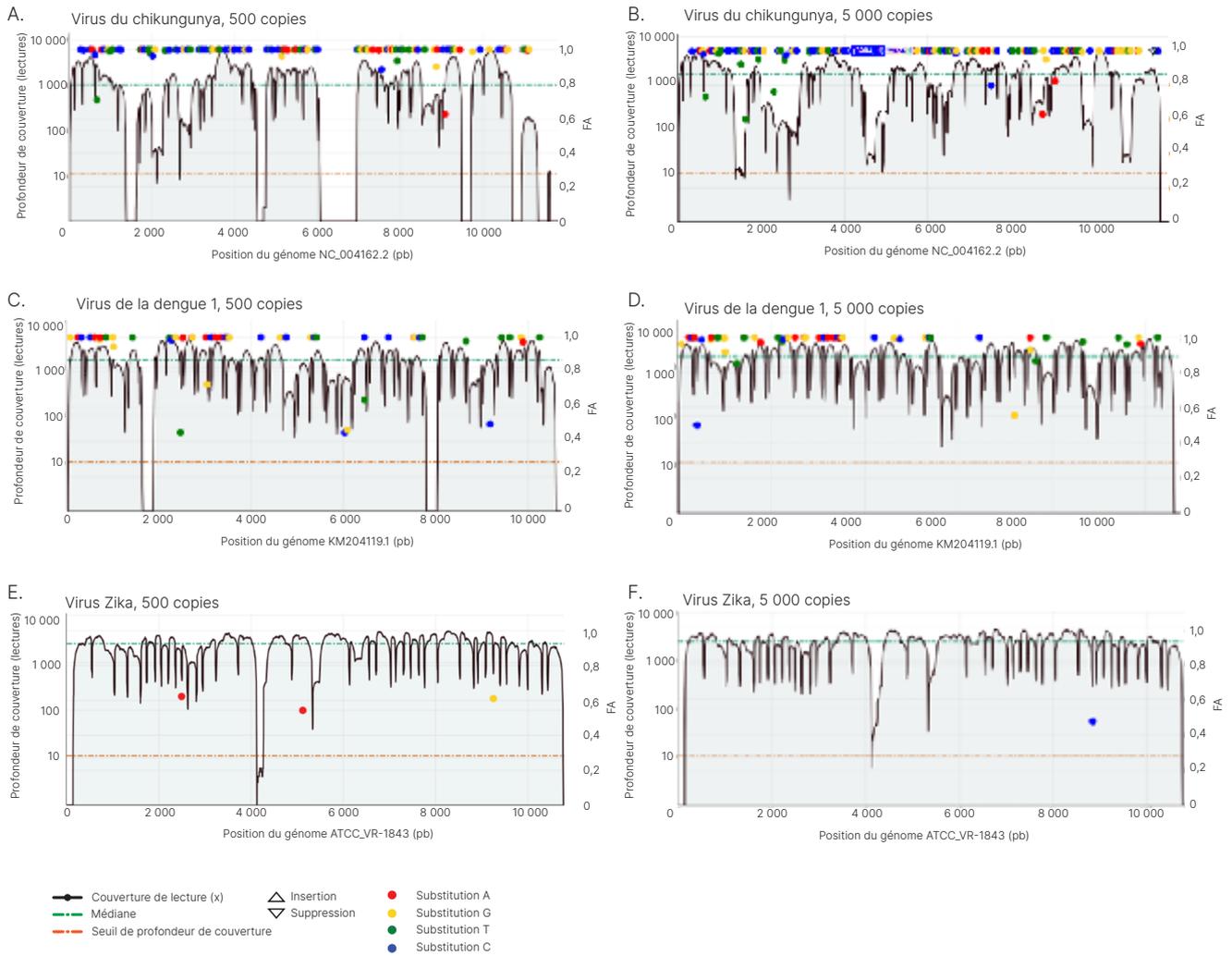


Figure 2 : Couverture du génome des arbovirus à partir de l'application DRAGEN Targeted Microbial App : les résultats du séquençage des arbovirus, y compris (A, B) le virus chikungunya, (C, D) le virus de la dengue 1 et (E, F) le virus Zika ont montré une couverture médiane élevée à un apport de 500 copies et une couverture accrue à 5 000 copies.

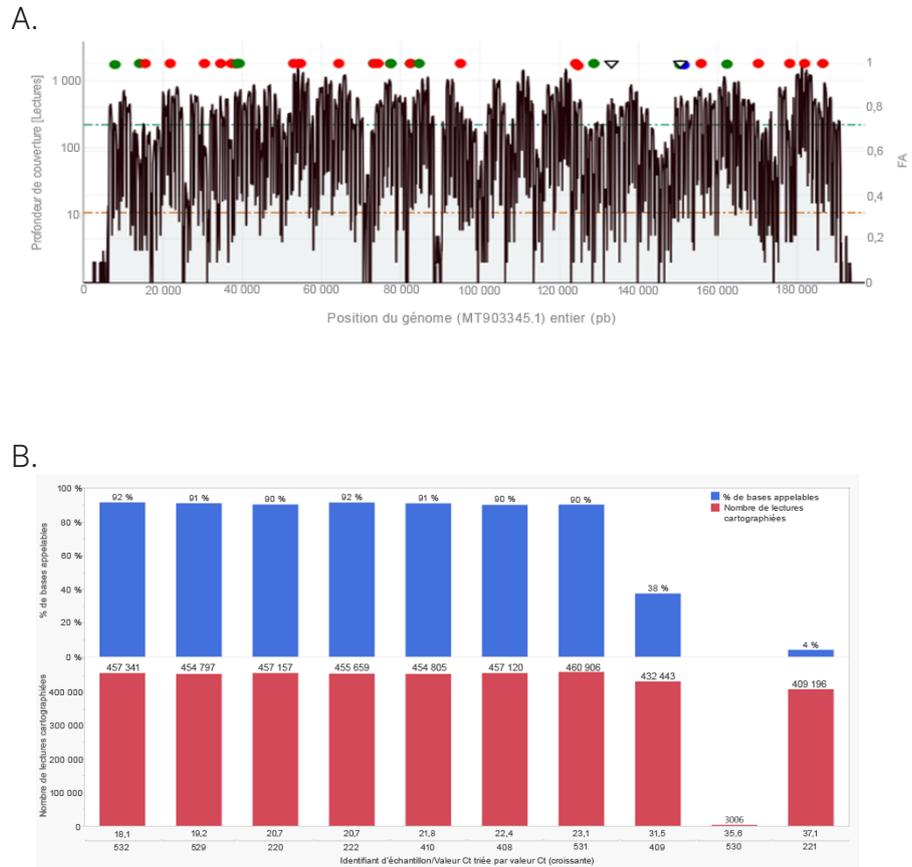


Figure 3 : Couverture du génome du virus Mpxv : les résultats du séquençage avec (A) un échantillon représentatif du virus Mpxv ont montré une couverture dans l'ensemble du génome; (B) les échantillons à titre viral faible ont montré une couverture réduite.

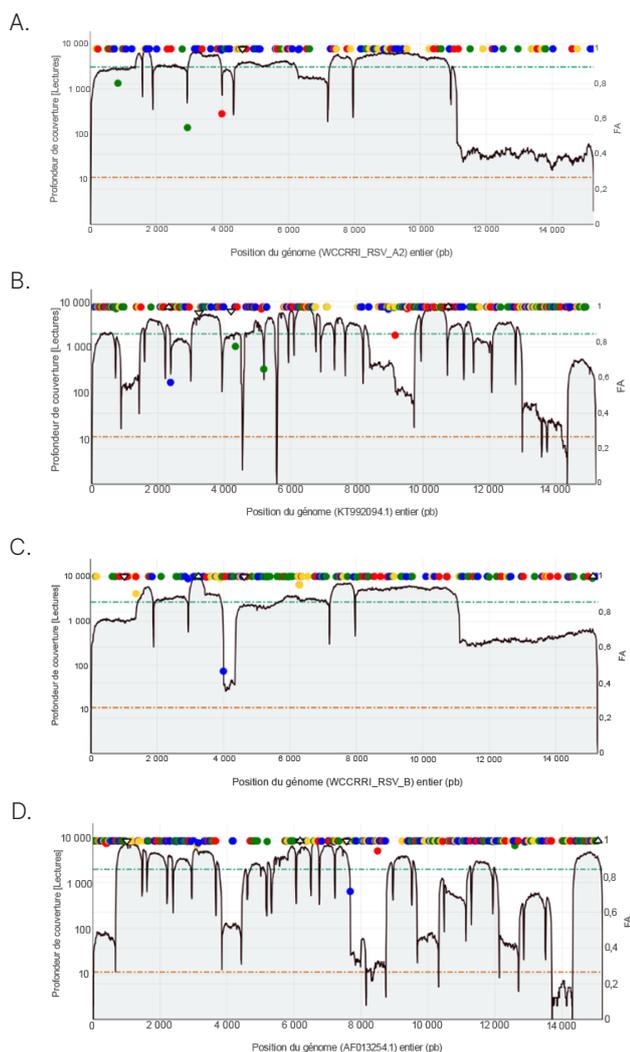


Figure 4 : Couverture des génomes VRSh A/B : les résultats du séquençage avec des échantillons représentatifs de (A, B) VRSh-A et (C, D) VRSh-B ont montré que, bien que les deux conceptions de primers amplifient les génomes viraux, la diminution de la couverture observée avec le regroupement de primers (A, C) WCCRRI correspondait à l'amplicon le plus long (environ 4 300 pb).

Résumé

ILLUMINA Microbial Amplicon Prep fournit une solution de surveillance génomique dont les performances ont été démontrées dans un large éventail de familles virales d'ARN et d'ADN et de tailles de génomes. Comme indiqué dans cette note d'application, ILLUMINA Microbial Amplicon Prep fournit une couverture génomique complète (définie ici comme > 90 % du génome viral couvert à une couverture $\geq 10\times$) pour tous les virus évalués. Cette trousse offre un flux de travail universel avec la possibilité de s'adapter à pratiquement toutes les cibles microbiennes d'intérêt.

En savoir plus

[ILLUMINA Microbial Amplicon Prep](#)

Références

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. Publié le 26 juillet 2022. Consulté le 28 août 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.

illumina^{MD}

Numéro sans frais aux États-Unis : + (1) 800 809-4566 | Téléphone : + (1) 858 202-4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 ILLUMINA, Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques de commerce sont la propriété d'ILLUMINA, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-02215 FRA v1.0