

** 2021年7月改訂 (第3版)

* 2021年2月改訂 (第2版)

この添付文書をよく読んでから使用してください。

SARS コロナウイルス核酸キット

Illumina COVIDSeq テスト

【重要な基本的注意】

1. 本品の判定が陰性であっても、SARS-CoV-2 感染を否定するものではありません。
2. 検査に用いる検体については、厚生労働省より公表されている「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針」を参照してください。
3. 診断は厚生労働省より発表されている医療機関・検査機関向けの最新情報を参照し、本製品による検査結果のみで行わず、臨床症状も含めて総合的に判断してください。
4. 検体採取及び取扱いについては、必要なバイオハザード対策を講じてください。

【一般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載内容以外の使用方法 (貯蔵方法含む) については、測定結果の信頼性を保証いたしません。
3. 測定にあたり使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用してください。また、試薬ごとに設定された反応時間、反応温度及びその他の条件については遵守してください。
4. 試薬および消耗品は専用のものを使用し、その容器、付属品などは他の用途に転用しないでください。

【形状・構造 (キットの構成)】**

4種類の試薬箱 (Box 1 ~ 4) より構成される。

Illumina COVIDSeq テスト Box 1

No.	構成試薬	内容 [反応系に関与する成分]	容量と個数
1	ITB HT	Illumina Tune Beads HT	233 mL × 1
2	ST2 HT	Stop Tagment Buffer 2 HT	56 mL × 1

Illumina COVIDSeq テスト Box 2

No.	構成試薬	内容 [反応系に関与する成分]	容量と個数
3	EBLTS HT	Enrichment BLT HT	6.1 mL × 2
4	ELB HT	Elution Buffer HT	114 mL × 1
5	RSB HT	Resuspension Buffer HT	10 mL × 1
6	TWB HT	Tagmentation Wash Buffer HT	845 mL × 1

Illumina COVIDSeq テスト Box 3

No.	構成試薬	内容 [反応系に関与する成分]	容量と個数
7	CPP1 HT	COVIDSeq Primer Pool 1 HT [ARTIC V3 Primer Pool 1]	14.4 mL × 1
8	CPP2 HT	COVIDSeq Primer Pool 2 HT [ARTIC V3 Primer Pool 2]	14.4 mL × 1
9	EPH3 HT	Elution Prime Fragment 3HC Mix HT [Random Hexamer]	45 mL × 1
10	EPM HT	Enhanced PCR Mix HT [DNA Polymerase]	79 mL × 1
11	FSM HT	First Strand Mix HT [dNTPs]	41 mL × 1
12	IPM HT	Illumina PCR Mix HT [DNA Polymerase]	100 mL × 1
13	RVT HT	Reverse Transcriptase HT [Reverse Transcriptase]	4.6 mL × 1
14	TB1 HT	Tagmentation Buffer 1 HT	38 mL × 1

Illumina COVIDSeq テスト Box 4

No.	構成試薬	内容 [反応系に関与する成分]	容量と個数
15	CPC HT	COVIDSeq Positive Control HT	100 µL × 1

【使用目的】

生体試料中の SARS-CoV-2 RNA の検出 (SARS-CoV-2 感染の診断の補助)

【使用目的に関連する使用上の注意】

【臨床的意義】、【操作上の注意】の内容を熟知し、本品の有用性を理解した上で検体種を選択すること。

【測定原理】**

本品は次世代シーケンス法による検体中の SARS-CoV-2 RNA 検出用キットである。検査のワークフローを以下に示す。

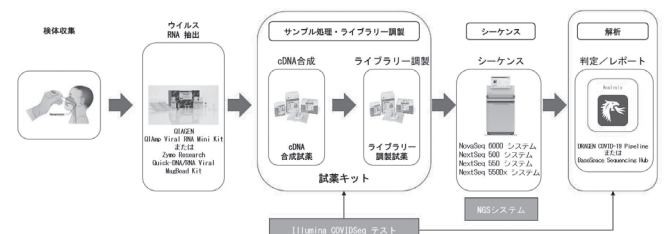


図 Illumina COVIDSeq テストを用いた検査のワークフロー

〈検体収集 (Specimen Collection)〉

被験者より採取された鼻咽頭ぬぐい液を本品による検査に供することができる。

〈検査工程〉

以下の4段階からなる。

1) ウイルス RNA の抽出 (Viral RNA Extraction)

以下の専用キットを用いて、検体からウイルス RNA を抽出する。

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QUICK-DNA/RNA Viral MagBead Kit (Zymo Research)

2) サンプル処理とライブラリー調製 (Sample Processing and Library Preparation)

① cDNA 合成 (cDNA Synthesis)

ランダムヘキサマー、逆転写酵素を用いた逆転写反応によってウイルス RNA に相補的な DNA (cDNA) を合成する。

② ライブラリー調製 (Library Prep)

ARTIC V3 プライマーセットを用いて SARS-CoV-2 全ゲノム配列をカバーする DNA 配列断片 (アンプリコン) を PCR (Polymerase Chain Reaction) によって増幅する。精製後、各検体にそれに由来する断片を帰属させるためのインデックス化を目的として、インデックスアダプターを付加し、さらに増幅するための PCR を行う。そして、調製された DNA 断片 (ライブラリー産物) をプールし、精製する。

3) シーケンス (Sequencing)

Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いてライブラリー産物の DNA 定量を行う。そして、希釈して濃度を適正化した後、専用の NGS システム^{注1)}にて SBS (Sequencing by Synthesis) ケミストリー法によって DNA 配列を決定する。

注 1): 専用の NGS システムは、以下の5機種及び同等の医療機器である。

- NovaSeq 6000 システム
- NextSeq 500 システム
- NextSeq 550 システム
- NextSeq 550Dx システム
- NextSeq 2000 システム

4) 解析 (Analysis) / レポート (Clinical Report)

DRAGEN サーバ上で Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline を、または BaseSpace Sequence Hub 上で Illumina DRAGEN COVIDSeq app を運用してウイルスゲノムの解析を行う。具体的には、Kmer based algorithm に従って、検出されたアンプリコンの個数を数え上げ、ウイルスゲノム由来のアンプリコンが5以上のときに (+)、5未満のときに (-) と判定する。また、内部標準については検出されたアンプリコンが3以上のときに "Pass"、3未満のときに "Fail" と判定する。

【操作上の注意】**

1. 測定試料の性質、採取法

- (1) 検体はサンプリング後、できる限り早く輸送、測定すること。
- (2) 検体は、15℃～30℃で24時間、冷蔵2℃～8℃で72時間保存できる。
- (3) サンプリング後、72時間以内に測定できない場合、-70℃以下にて冷凍保存すること。
- (4) 検体の採取時には厚生労働省より公表されている「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針」を参照すること。

2. その他

本品はシーケンス工程を以下の専用の NGS システム、または同等の医療機器で行う。

- NovaSeq 6000 システム
- NextSeq 500 システム
- NextSeq 550 システム
- NextSeq 550Dx システム
- NextSeq 2000 システム

【用法・用量 (操作方法)】**

1. 必要な汎用機器及び消耗品

- マイクロピペット (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- 8-チャンネルピペット (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- 12-チャンネルピペット (20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- セロロジカルピペット (10 mL, 20 mL, 50 mL)
- 冷凍庫 (-25℃～-15℃、-85℃～-65℃)
- 遠心分離機
- マイクロプレート専用遠心分離機
- ピペットエイド
- シーリングローラー
- ボルテックスミキサー
- ピペットチップ (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- アッセイ用チューブ (15 mL)

2. 専用機器及び消耗品 (推奨)

専用機器 (推奨)

名称	供給元
BioShake iQ	QInstruments
DRAGEN Bio-IT Platform or BaseSpace Sequence Hub	Illumina
MagneticStand-96	Thermo Fisher Scientific
いずれかを準備すること	
• Dynabeads MPC-S (Magnetic Particle Concentrator)	Thermo Fisher Scientific
• MagnaRack Magnetic Separation Rack	
いずれかを準備すること	
• NovaSeq 6000 システム	Illumina
• NextSeq 500 システム	
• NextSeq 550 システム	
• NextSeq 550Dx システム	
• NextSeq 2000 システム	
NovaSeq Xp Flow Cell Dock	Illumina
Qubit 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
いずれかを準備すること	
• C 1000 Touch Thermal Cycler with 96-Well Fast Reaction Module	Bio-Rad
• C 1000 Touch Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module	

必要な専用消耗品

名称	供給元
Hard-Shell 96-Well PCR Plates	Bio-Rad
96 deep well plate, 2000 µl	Eppendorf
1.7 ml LoBind microcentrifuge tubes	Eppendorf
5 ml LoBind microcentrifuge tubes	Eppendorf
Microseal 'B' adhesive seals	Bio-Rad
RNase/DNase-free Disposable Pipetting Reservoirs	VWR
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific

専用試薬（推奨）（3072テスト用）

名称	数量	供給元
QIAamp Viral RNA Mini Kit RNA 抽出法 • QIAamp Viral RNA Mini Kit ※その他必要な試薬、備品については当該品の取扱説明書等を参照すること。	13	QIAGEN
QUICK-DNA/RNA Viral MagBead 抽出法 • QUICK-DNA/RNA Viral MagBead ※その他必要な試薬、備品については当該品の取扱説明書等を参照すること。	8	Zymo Research
Qubit dsDNA HS Assay Kit	1	Thermo Fisher Scientific
Index Adapter • IDT for Illumina-PCR Indexes Sets 1-4 (384 Indexes)	8	Illumina
NovaSeq 6000 システム S4 フローセルを用いる場合 • NovaSeq 6000 試薬キット (S4 フローセル用) - ライブラリーチューブ - フローセル - バッファークートリッジ - クラスターカートリッジ - SBS カートリッジ - ExAmp 試薬 1 - ExAmp 試薬 2 - ExAmp 試薬 3 - NovaSeq Xp マニフォールド	2	Illumina
NovaSeq 6000 システム SP フローセルを用いる場合 • NovaSeq 6000 試薬キット (SP フローセル用) - ライブラリーチューブ - フローセル - バッファークートリッジ - クラスターカートリッジ - SBS カートリッジ - ExAmp 試薬 1 - ExAmp 試薬 2 - ExAmp 試薬 3 - NovaSeq Xp マニフォールド	4	Illumina
NextSeq 500 システム、NextSeq 550 システムまたは NextSeq 550Dx システムを用いる場合 • NextSeq 試薬キット - フローセルカートリッジ - 試薬カートリッジ - 緩衝液カートリッジ - ライブラリー希釈緩衝液	8	Illumina
NextSeq 2000 システムを用いる場合 • NextSeq 1000/2000 試薬キット (100 cycle) - NextSeq 1000/2000 フローセル - NextSeq 1000/2000 試薬カートリッジ - NextSeq 1000/2000 RSB	8	Illumina

3. 必要な汎用試薬

- 2 N NaOH
- 400 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- Nuclease-free Water
- Ethanol, 100% (200 proof) 分子生物学用グレード

4. 測定法

(1) RNA 抽出

- ① CPC HT を以下の3段階に分けて 200,000 倍に希釈する。

Dilution 1 : ELB HT 495 μ L + CPC HT 5 μ L

Dilution 2 : ELB HT 495 μ L + Dilution 1 CPC HT 5 μ L

Dilution 3 : ELB HT 3.8 mL + Dilution 2 CPC HT 200 μ L

- ② 以下のいずれかの方法でウイルス由来 RNA を抽出する。

〈QIAamp Viral RNA Mini Kit RNA 抽出法〉

検体、Dilution 3 CPC HT（陽性コントロール）、ELB HT（No Template コントロール）それぞれ 140 μ L を供する。方法の詳細については、当該品の取扱説明書に従う。

〈QUICK-DNA/RNA Viral MagBead 抽出法〉

検体、Dilution 3 CPC HT（陽性コントロール）、ELB HT（No Template コントロール）それぞれ 400 μ L を供する。方法の詳細については、当該品の取扱説明書に従う。

(2) RNA のアニーリング

- ① 96 穴プレート（PCR 用）を 1 枚用意する。CDNA1 とラベルする。
- ② CDNA1 各ウエルに EPH3HT 8.5 μ L を分注する。
- ③ CDNA1 各ウエルに（1）での溶出サンプル 8.5 μ L を添加する。
- ④ CDNA1 プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。
- ⑤ 1,000 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ⑥ サーマルサイクラーに CDNA1 プレートをセットして、アニーリング反応を行う。プログラムは以下のとおりである。

サンプル容量		17 μ L
反応条件	反応前	プレヒート (Lid)
	本反応	65°C、3分間
	反応後	4°C (Hold)

(3) cDNA（一本鎖）合成（逆転写反応による）

- ① 1.7 mL チューブ内で 1 反応系あたり以下の容量に従い、2 種類の試薬を混和して Master Mix を調製する。

FSM HT 9 μ L + RVT HT 1 μ L

- ② Master Mix 8 μ L を各ウエルに添加する。
- ③ プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。
- ④ 1,000 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ⑤ サーマルサイクラーにプレートをセットして、逆転写反応を行う。プログラムは以下のとおりである。

サンプル容量		25 μ L
反応条件	反応前	プレヒート (Lid)
	本反応	25°C、5分間
		50°C、10分間
		80°C、5分間
反応後	4°C (Hold)	

(4) cDNA（二本鎖）の増幅（PCRによる）

- ① 96 穴プレート（PCR 用）を 2 枚用意する。COV1、COV2 とラベルする。
- ② 2 種類の Master Mix（COV1 用、COV2 用）を調製する。1 反応系当たりの容量を以下に示す。

	COV1 用	COV2 用
IPM HT	15 μ L	15 μ L
CPP1 HT	4.3 μ L	N/A
CPP2 HT	N/A	4.3 μ L
Nuclease-Free Water	4.7 μ L	4.7 μ L

- ③ COV1, COV2 各プレートに対応する Master Mix を 1 ウエルあたり 20 μ L ずつ分注する。
- ④ cDNA (一本鎖) 産物を各ウエルに 5 μ L ずつ添加する。
- ⑤ 各プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。
- ⑥ 1,000 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ⑦ サーマルサイクラーに各プレートをセットして、PCR を行う。プログラムは以下のとおりである。

サンプル容量		25 μ L	
反応条件	反応前	プレヒート (Lid)	
	本反応	98 $^{\circ}$ C, 3 分間	
		98 $^{\circ}$ C, 15 秒間	35 サイクル
反応後	4 $^{\circ}$ C (Hold)		

(5) アンプリコンへのタグ付加

- ① 96 穴プレート (PCR 用) を 1 枚用意する。TAG1 とラベルする。
- ② COV1, COV2 プレート内の PCR 産物を混和する。COV1, COV2 の順に PCR 産物に対応する TAG1 プレート内ウエルに分注する。
- ③ 15 mL チューブ内で 1 反応系あたり以下の容量に従い、3 種類の試薬を混和して Master Mix を調製する。

TB1 HT	12 μ L
EBLTS HT	4 μ L
Nuclease-free Water	20 μ L

- ④ TAG1 各ウエルに Master Mix 30 μ L を添加する。
- ⑤ TAG1 プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。
- ⑥ サーマルサイクラーに TAG1 プレートをセットして、タグ付加反応を行う。プログラムは以下のとおりである。

サンプル容量		50 μ L	
反応条件	反応前	プレヒート (Lid)	
	本反応	55 $^{\circ}$ C, 5 分間	
	反応後	10 $^{\circ}$ C (Hold)	

(6) タグ付加後のアンプリコン精製

- ① TAG1 プレートを 500 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ② TAG1 プレートの各ウエルに ST2 HT 10 μ L を添加する。
- ③ プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。
- ④ 15 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートする。
- ⑤ TAG1 プレートを 500 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ⑥ Magnetic Stand にプレートをセットして、ウエル内上清が澄むまで 3 分間ほど待つ。
- ⑦ シールの内側に液滴や泡がないことを確認する。もし、それらがある場合には 500 \times g で 1 分間遠心分離した後、Magnetic Stand にプレートをセットして 3 分間ほど待つ。
- ⑧ 上清を除去する。
- ⑨ ビーズを以下のとおり洗浄する。
 - a) Magnetic Stand からプレートを外す。
 - b) TWB HT 100 μ L を各ウエルに分注する。
 - c) プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。

- d) 500 \times g で 1 分間遠心分離する。
- e) Magnetic Stand にプレートをセットして、ウエル内上清が澄むまで 3 分間ほど待つ。
- f) 初回洗浄時のみ、ウエル内上清を除去する。

- ⑩ 第 2 回洗浄を⑨ a) ~ e) に従って行う。ビーズの過度な乾燥を防ぐため、第 2 回洗浄ではウエル内上清を除去しない。

(7) タグ付加アンプリコンの増幅 (PCR による)

- ① 15 mL チューブ内で 1 反応系あたり以下の容量に従い、2 種類の試薬を混和して Master Mix を調製する。

EPM HT 24 μ L + Nuclease-free Water 24 μ L

- ② ボルテックスミキサーで Master Mix を混和する。
- ③ Magnetic Stand に TAG1 プレートをセットしたままで、TWB HT を除去する。
- ④ 20 μ L マイクロピペットを用いてウエル内の残液を除去する。
- ⑤ Magnetic Stand から TAG1 プレートを外す。
- ⑥ Master Mix 40 μ L を各ウエルに加える。
- ⑦ Index Adapter 10 μ L を各ウエルに加える。
- ⑧ プレートをシールした後、1,600 rpm で 1 分間振盪する。
- ⑨ シールの内側に液滴や泡がないことを確認する。もし、それらがある場合には 500 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ⑩ ビーズが再懸濁されていることを確認する。再懸濁するためには、ピペットの容量を 35 μ L にセットしてゆっくりとピペティングで混和する。
- ⑪ サーマルサイクラーにプレートをセットして、PCR を行う。プログラムは以下のとおりである。

サンプル容量		50 μ L		
反応条件	反応前	プレヒート (Lid) to 100 $^{\circ}$ C		
	本反応	72 $^{\circ}$ C, 3 分間		
		98 $^{\circ}$ C, 3 分間		
		98 $^{\circ}$ C, 20 秒間	7 サイクル	
				60 $^{\circ}$ C, 30 秒間
				72 $^{\circ}$ C, 1 分間
				72 $^{\circ}$ C, 3 分間
反応後	10 $^{\circ}$ C (Hold)			

(8) ライブラリーの精製

- ① 500 \times g で 1 分間遠心分離する。
- ② Magnetic Stand にプレートをセットして、ウエル内上清が澄むまで 3 分間ほど待つ。
- ③ ライブラリーを以下の要領でプールする。追加のプレートがある場合、これを繰り返す。
 - a) 20 μ L の 8-チャンネルピペットを用いて、各ウエルの PCR 産物 5 μ L を PCR 用 8 連チューブに移す。レーンごとにチップを替える。最終的に 1 行 (row) につき、60 μ L のライブラリーがプールされる。
 - b) 1.7 mL チューブを新たに用意して、ITB とラベルする。(以下、ITB チューブ)
 - c) 8 連チューブの各ウエル内から 55 μ L ずつ ITB チューブへと移す。最終的に 1 枚のプレートから 440 μ L のライブラリーがプールされる。
- ④ ITB チューブをボルテックスミキサーで攪拌し、素早く遠心分離する。
- ⑤ ITB HT をボルテックスミキサーで再懸濁させる。
- ⑥ ITB HT をプールされたライブラリーの容量の 0.9 倍量ほど添加する。例えば、96 サンプル (1 プレート分) に対しては 396 μ L 添加する。
- ⑦ ボルテックスミキサーで混和する。
- ⑧ 15 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C で 5 分間ほどインキュベートする。

- ⑨ 素早く遠心分離する。
- ⑩ Magnetic Stand にチューブをセットして、ウエル内上清が澄むまで 5 分間ほど待つ。
- ⑪ 上清を除去する。
- ⑫ ビーズを以下の要領で洗浄する。
 - a) Magnetic Stand にチューブをセットしたままで、調製したばかりの 80% EtOH 1,000 μ L を添加する。
 - b) 30 秒間ほど放置する。
 - c) 上清を除去する。
- ⑬ 第 2 回の洗浄を行う。
- ⑭ 20 μ L のマイクロピペットを用いて残りの EtOH を取り除く。
- ⑮ RSB HT 55 μ L を添加する。
- ⑯ ボルテックスミキサーで混和し、素早く遠心分離する。
- ⑰ 15 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C で 2 分間インキュベートする。
- ⑱ Magnetic Stand にチューブをセットして、ウエル内上清が澄むまで 2 分間ほど待つ。
- ⑲ ITB チューブから上清 (ライブラリープール) 50 μ L を新しいマイクロチューブへ移す。

(9) DNA 定量

- ① ライブラリープール 2 μ L を Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いて DNA 濃度を測定する。標準曲線の範囲から逸脱する場合には、10 倍希釈した後、再度定量する。
- ② 定量には以下の公式を用いる。

$$\frac{\text{ライブラリー濃度 [ng/\mu L]}}{660 \text{ [g/mol]} \times \text{ライブラリー平均塩基対数}^{(2)} \text{ [bps]}} \times 10^6 = \text{ライブラリー濃度 [nM]}$$

注 2) : ライブラリー平均塩基対数 : 400 [bps]

- ③ RSB HT を用い終濃度 4 nM、最小液量 30 μ L に希釈調製する。

(10) ライブラリーのプールと希釈

- ① 各セット (384 検体) について、Index Adapter Set 1 ~ 4 を含む濃度規格化済みのライブラリープールを 25 μ L ずつ合わせる。ここで、初期濃度が 4 nM のライブラリープールが得られる。各専用システムにおける 1 フローセルあたりのサンプル数を以下に示す。

システム	フローセル	サンプル数
NextSeq 500 システム NextSeq 550 システム NextSeq 550Dx システム	HO Flow Cell	384 検体 (1 フローセル)
NextSeq 2000 システム	P2 Flow Cell	384 検体 (1 フローセル)
NovaSeq 6000 システム	SP Flow Cell	384 検体 (1 レーン) 768 検体 (1 フローセル)
	S4 Flow Cell	384 検体 (1 レーン) 1536 検体 (1 フローセル)

- ② 最終分注濃度へ希釈するためのライブラリーの変性、希釈の方法については、以下に示す専用システムに対応したマニュアルに従って行う。

システム	マニュアル
NextSeq 500 システム NextSeq 550 システム NextSeq 550Dx システム	NextSeq System Denature and Dilute Libraries Guide
NextSeq 2000 システム	NextSeq 1000 and 2000 Sequencing System Guide
NovaSeq 6000 システム	NovaSeq 6000 Denature and Dilute Libraries Guide

- ③ 以下の最終分注濃度に調製する。②のとおり、調製方法については、各専用システムに対応したマニュアルに従って行う。

システム	フローセル	初期濃度 [nM]	最終分注濃度 [pM]
NextSeq 500 システム NextSeq 550 システム NextSeq 550Dx システム	HO Flow Cell	4	1.4
NextSeq 2000 システム	P2 Flow Cell	4	1000
NovaSeq 6000 システム	SP Flow Cell	4	100
	S4 Flow Cell	4	100

(11) シーケンス

〈サンプルシートの準備〉

- ① [Sequencing Run] フォルダにファイル名 Sample Sheet.csv ^{注3)} としてサンプルシートを保存する。

注 3) : インストールパッケージ、または、Illumina COVIDSeq Test サポートサイトより入手できる。

- ② [Settings] にて AdapterRead1 パラメータに以下の文字列を入力する。

CTGTCTCTTATACACATCT

- ③ [Data] セクションにて要求される以下のパラメータを入力する。サンプル間において空いている行が無いことを確認する。

フィールド	内容	入力に関する要求事項
Sample_ID	レポート内で帰属する検体名を示す。	ランごとに判別できる名称 100 文字以内 アルファベット、数字、アンダーバー、ダッシュのみ。
Index_ID	検体に紐づいた IDT for Illumina-PCR Indexes のインデックス名	Illumina Adapter Sequences 参照。 各フローセルのレーンに固有 Index、Index2 とマッチする
Index	サンプルシートに基づく IDT for Illumina-PCR Indexes の i7 インデックス名	Illumina Adapter Sequences 参照。 Index_ID が指定されていれば不要。
Index2	サンプルシートに基づく IDT for Illumina-PCR Indexes の i5 インデックス名	Illumina Adapter Sequences 参照。 Index_ID が指定されていれば不要。
Lane	フローセルのレーンの名称	NovaSeq 6000 システムでは、1, 2, 3, 4 のいずれかを入力。 NextSeq 500 システム、NextSeq 550 システム、NextSeq 550Dx システム、NextSeq 2000 システムでは該当するフィールドはない。
Sample_Type	各検体のサンプルタイプ	以下のいずれかを入力。 <ul style="list-style-type: none"> • PatientSample • NTC • PositiveControl

- ④ 必要に応じて、Sample_Name などを入力する。

〈シーケンシングランのセットアップ〉

- ① NovaSeq 6000 システムを使用する場合

シーケンスの方法については、NovaSeq 6000 Sequencing System Guide を参照。

- NovaSeq Control Software (NVCS) v1.7 を用いる。

- Illumina DRAGEN COVIDSeq Test BaseSpace Sequence Hub appを使用する場合、Configuration OptionはRun Monitoring and Storageを選択する。
- 以下の数値を入力する。

フィールド	入力値
Read1	36
Index1	10
Index2	10
Read2	0

- ② NextSeq 500 システム、NextSeq 550 システム、または NextSeq 550Dx システムを使用する場合

シーケンスの方法については、NextSeq 500 System Guide、NextSeq 550 System Guide、または NextSeq 550Dx Instrument Reference Guideを参照。

- NextSeq Control Software (NCS) v4.0を用いる。
- Illumina DRAGEN COVIDSeq Test BaseSpace Sequence Hub appを使用する場合、Configuration OptionはRun Monitoring and Storageを選択する。
- Single-Read を Read-Type として入力する。
- 以下の数値を入力する。

フィールド	入力値
Read1	36
Index1	10
Index2	10

- ③ NextSeq 2000 システムを使用する場合

シーケンスの方法については、NextSeq 1000 and 2000 Sequencing System Guide を参照。

BaseSpace Sequence Hub 上でシーケンシングランを作成する場合は以下を確認する。

- Analysis Location は BaseSpace を選択する。
- Analysis Type は Illumina DRAGEN COVIDSeq Test を選択する。
- Analysis Type で Illumina DRAGEN COVIDSeq Test が表示されない場合は Illumina Technical Support に連絡すること。
- 解析のセットアップについては、後述の〔NextSeq 2000 を用いての BaseSpace Sequence Hub 上での解析〕を参照。

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2 を用いる。クラウドモードを有効にするためには、設定画面で Online Run Setup と Proactive, Run Monitoring and Storage を選択する。

〔NextSeq 2000 を用いての BaseSpace Sequence Hub 上での解析〕

1. Fast モードを有効にするためには Fast Mode Option で True を選択する。

Fast モードではアラインメント、バリエーションコール、コンセンサス配列ファイル (FASTA) の生成が無効となる。

2. シーケンスランのログ、QC メトリックファイル、その他のファイルを除くためには、Metrics and Logs Datasets Option で False を選択する。

これによって解析速度が改善されるが、Logs_Intermediate_Lane_* フォルダは生成されない。

3. 各インデックスセットについて Positive Control 及び No Template Control (NTC) を入力する。

- ライブラリー調製においてインデックスセットを用いた場合、Positive Control 及び No Template Control (NTC) について、Sample ID またはウエルの位置を入力する。

- インデックスセットを用いなかった場合、NA と入力する。

4. Submit Run を選択する。

シーケンス終了後、Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline をシステム上、または Illumina DRAGEN COVIDSeq Test app を BaseSpace Sequence Hub 上で運用し、解析を行う。ローカルな解析については Illumina DRAGEN COVIDSeq Test Pipeline Software Guide、BaseSpace Sequence Hub 上での解析については、Illumina DRAGEN COVIDSeq Test App Guide を参照すること。

【測定結果の判定法】*

1. 各項目について以下のように判定される。

- (1) Sample ID : SARS-CoV-2 ゲノム RNA 由来のアンプリコンが 5 個以上のとき (+)、5 個未満のとき (-) と判定される。
- (2) Sample 内部標準 : ヒトゲノム RNA 由来のアンプリコンが 3 個以上のとき Pass、3 個未満のとき Fail と判定される。
- (3) NTC : SARS-CoV-2 ゲノム RNA 由来のアンプリコンが 5 個未満、かつ、ヒトゲノム由来のものが 3 個未満のとき、“Pass” と判定される。それ以外の場合、“Fail” と判定される。
- (4) Positive Control : SARS-CoV-2 ゲノム RNA 由来のアンプリコンが 5 個以上のとき “Pass”、5 個未満のとき “Fail” と判定される。

各検体の判定結果については、以下の基準による (表 1)。

- [1] NTC、Positive Control がいずれも Pass、かつ、Sample ID が (+) のとき、陽性と判定される。
- [2] Sample 内部標準、NTC、Positive Control がいずれも Pass、かつ、Sample ID が (-) のとき、陰性と判定される。
- [3] Sample 内部標準が Fail、NTC、Positive Control がいずれも Pass、かつ、Sample ID が (-) のとき、RNA 陰性と判定される。
- [4] NTC、Positive Control のうち少なくとも一項目が Fail のとき、要再検と判定される。

Sample ID	Sample 内部標準	NTC	Positive Control	結果	判定
+	Pass or N/A	Pass	Pass	Positive	陽性
-	Pass	Pass	Pass	Negative	陰性
-	Fail	Pass	Pass	Invalid	RNA 陰性 ^{注4)}
+ or -	Pass or Fail	Fail	Pass	Invalid	要再検 ^{注5)}
+ or -	Pass or Fail	Pass	Fail	Invalid	要再検 ^{注5)}
+ or -	Pass or Fail	Fail	Fail	Invalid	要再検 ^{注5)}

表 1 測定結果の判定法

注 4) : RNA 抽出から再試行することが求められる。

注 5) : すべてのサンプルについて検査を再試行することが求められる。

2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果と合わせて担当医師が総合的に判断すること。

【臨床的意義】**

1. 鼻咽頭ぬぐい液を検体としたときの US CDC RT-PCR との相関性

SARS-CoV-2 RNA 検出系の US CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (US CDC RT-PCR) を対照とした結果は以下のとおりであった (表 2)。用いた RNA 抽出法ごとに示す。

〈QIAamp Viral RNA Mini Kit RNA 抽出法〉

NGS システム	US CDC RT-PCR	Illumina COVIDSeq テスト			陽性一致率 ^{注6)}	陰性一致率 ^{注6)}
		陽性	陰性	無効 (invalid)		
NextSeq 550	陽性	39	1	0	97.5%	97.7%
	陰性	1	43	0		
	判定保留	0	10	0		
NextSeq 2000	陽性	39	1	0	97.5%	97.7%
	陰性	1	43	0		
	判定保留	0	10	0		
NovaSeq 6000 (SP v1.5)	陽性	39	1	0	97.5%	97.7%
	陰性	1	43	0		
	判定保留	0	10	0		
NovaSeq 6000 (S4 v1.5)	陽性	39	1	0	97.5%	97.7%
	陰性	1	43	0		
	判定保留	0	10	0		

注 6) : US CDC RT-PCR にて判定保留となった検体を除いて算出。

〈QUICK-DNA/RNA Viral MagBead 抽出法〉

NGS システム	US CDC RT-PCR	Illumina COVIDSeq テスト			陽性一致率 ^{注7)}	陰性一致率 ^{注7)}
		陽性	陰性	無効 (invalid)		
NextSeq 550	陽性	42	2	0	95.5%	100%
	陰性	0	52	3		
	判定保留	1	2	0		
NextSeq 2000	陽性	42	2	0	95.5%	100%
	陰性	0	52	3		
	判定保留	1	2	0		
NovaSeq 6000 (SP v1.5)	陽性	42	2	0	95.5%	100%
	陰性	0	52	3		
	判定保留	1	2	0		
NovaSeq 6000 (S4 v1.5)	陽性	43	1	0	97.7%	100%
	陰性	0	52	3		
	判定保留	1	2	0		

注 7) : US CDC RT-PCR にて判定保留となった検体を除いて算出。

表 2 相関性試験成績¹⁾

2. 交差反応性

SARS-CoV-2 以外の病原体のゲノムに対して *in silico* 解析を行い、本品で SARS-CoV-2 ゲノムに対して生成される 98 のアンプリコン (ARTIC アンプリコン) が検出されるかを評価した。その結果、どの病原体に対しても ARTIC アンプリコンは検出されなかった (表 3)。したがって、本品の交差反応性は十分に低いと考えられる。

病原体	検出された ARTIC アンプリコンの個数	SARS-CoV-2 検出の有無
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	無
Human respirovirus 3	0	無
Human adenovirus 1	0	無
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	無
<i>Streptococcus salivarius</i>	0	無
Human adenovirus 5	0	無
Human adenovirus 54	0	無
<i>Chlamydia pneumoniae</i> TW-183	0	無
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	無
Human adenovirus 2	0	無
Rhinovirus C	0	無
Influenza B virus (B/Lee/1940)	0	無
Human respirovirus 1	0	無
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	0	無
Human rhinovirus A1	0	無
Rhinovirus B14	0	無
<i>Bordetella pertussis</i> 18323	0	無
<i>Candida albicans</i> SC5314	0	無
Human coronavirus 229E	0	無
Influenza A virus (A/California/07/2009 (H1N1))	0	無
Human coronavirus OC43	0	無
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	0	無
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	無
Human rhinovirus B3	0	無
Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	0	無
Human parainfluenza virus 4a	0	無
Human metapneumovirus	0	無
Enterovirus D68	0	無
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	0	無
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0	無
Respiratory syncytial virus	0	無
Human coronavirus NL63	0	無
Human adenovirus 35	0	無
Human rubulavirus 2	0	無
Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus	0	無
Human adenovirus 7	0	無
<i>Legionella pneumophila</i>	0	無
Human coronavirus HKU1	0	無

表 3 交差反応性試験成績¹⁾

【性能】**

1. 感度

濃度既知の自家管理検体 (陽性)^{注8)} を所定の操作で試験するとき、陽性の反応を示す。

2. 正確性

自家管理検体 (陽性) 及び自家管理検体 (RNA 陰性^{注8)}) を所定の操作で試験するとき、所定の陽性又は RNA 陰性の反応を示す。

3. 同時再現性

自家管理検体 (陽性) 及び自家管理検体 (RNA 陰性) を所定の操作で 3 回繰り返し試験するとき、それぞれ同一の反応性を示す。

4. 最小検出感度

QIAamp Viral RNA Mini Kit RNA 抽出法を用いた場合、1000 cp/mL である。また、QUICK-DNA/RNA Viral Mag Bead 抽出法を用いた場合、500 cp/mL である。

注 8) : 自家管理検体 (陽性) は本品の構成成分である CPC HT (COVIDSeq Positive Control HT) を Universal Human Reference RNA (UHRP) に添加して、終濃度を 200 cp/test (RNA 抽出後の溶出液 8.5 µL 中において 200 cp に相当する濃度) となるように調製したものである。また、自家管理検体 (RNA 陰性) は本品の構成成分である ELB HT (Elution Buffer HT) であり、本品の測定法上、No Template コントロール (NTC) として位置づけられている。

【使用上又は取扱い上の注意】**

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- (1) 試料 (検体) は HIV, HBV, HCV 等の感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングはしないでください。
- (2) 本品には潜在的に危険な化学物質が含まれています。特に、可燃性の化学物質が含まれるため、検査に当たっては熱及び火気に注意してください。また、それら化学物質への被曝に伴う障害を予防するため、換気の良い施設にて保護具を装着した上で検査を実施してください。所管の規制当局が定めた安全衛生に関する規定を遵守してください。
- (3) 試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- (1) 本品は貯法に従って保存してください。誤って凍結させた試薬では正しい結果が得られないことがあるので使用しないでください。
- (2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 試料 (検体) 中には HIV, HBV, HCV 等の感染性のものが存在する場合がありますので、廃液、使用済み器具など 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液、または 2% グルタルアルデヒドに 1 時間以上浸漬することで消毒処理するか、オートクレーブ (121°C、20 分間以上) による滅菌処理を行ってください。
- (2) 試薬及び器具などを廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】**

1. 貯蔵方法

各試薬箱 (Box 1 ~ 4) について貯蔵温度が指定されている。

試薬箱 (構成試薬)	貯蔵温度
Illumina COVIDSeq テスト Box 1 (ITB HT, ST2 HT)	15°C ~ 30°C
Illumina COVIDSeq テスト Box 2 (EBLTS HT, ELB HT, RSB HT, TWB HT)	2°C ~ 8°C
Illumina COVIDSeq テスト Box 3 (CPP1 HT, CPP2 HT, EPH3 HT, EPM HT, FSM HT, IPM HT, RVT HT, TB1 HT)	-25°C ~ -15°C
Illumina COVIDSeq テスト Box 4 (CPC HT)	-85°C ~ -65°C

2. 有効期間 13 か月

※使用期限は外装に記載してあります。

【包装単位】

品名	包装
Illumina COVIDSeq テスト	3072 テスト用

【主要文献】

- 1) 社内資料

【問い合わせ先】

イルミナ株式会社 テクニカルサポート

〒108-0014

東京都港区芝五丁目 36 番 7 号

三田ベルジュビル 22 階

TEL : 0800-111-5011 (フリーダイヤル)

E-mail : techsupport@illumina.com

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

製造販売業者 : イルミナ株式会社

〒108-0014

東京都港区芝五丁目 36 番 7 号

三田ベルジュビル

【承認条件】

製造販売後に実保存条件での安定性試験を実施すること。