

Viral Surveillance Panel v2

高リスクウイルスのサーベイランスと研究のための合理化された全ゲノムシーケンス

- 拡大パネルは公衆衛生上の懸念を含む約200種類のウイルスをカバー¹⁻⁶
- ハイブリッドキャプチャー濃縮はRNAとDNAウイルス病原体に対応
- 統合されたワークフローで幅広い種類の宿主サンプルと環境サンプルに対応⁷

illumina®

公衆衛生サーベイランスのための 高リスクウイルスの同定

ウイルスゲノムサーベイランスは、病原体の進化、拡散、挙動に関する貴重な洞察を提供することで、世界的な健康安全保障において極めて重要な役割を果たします。¹ 次世代シーケンサー (NGS) を使用してウイルスの遺伝子構成を解析することで、科学者は伝染性、毒性、治療への耐性に影響を与える変異を追跡できます。⁸ この情報は、新興感染症に対処するための有効な診断検査、治療薬、ワクチンを設計する上で非常に重要です。

Illumina Viral Surveillance Panel v2は、公衆衛生上の重要なリスクとして特定されたウイルスを含む¹⁻⁶ (表1)、約200種類のウイルスの検出と全ゲノムシーケンス (WGS) を実現するNGSパネルです (全リストは[こちら](#))。本パネルはハイブリッドキャプチャーターゲット濃縮ワークフローを使用しており、ショットガンメタゲノミクスシーケンスでは必要な高いリード深度を必要とすることなく、さまざまな種類のサンプルのシーケンスを実現します。アンプリコンシーケンスなどのその他のターゲットリシーケンスメソッドと比較すると、ハイブリッドキャプチャー法はウイルスゲノム全体のより均一なカバレッジ、変異や多様な配列を同定するための高い能力を提供するため、感染拡大のサーベイランスとバリエーションモニタリングには、Viral Surveillance Panel v2が最も適しています。

効率化されたNGSワークフロー

Viral Surveillance Panel v2ワークフローは、下水、血清、血漿、皮膚病変、鼻咽頭スワブを含む幅広いタイプのサンプルからウイルスゲノムを濃縮します。⁷ ライブラリーは、宿主または環境サンプルから抽出したRNAまたはDNAから調製し、イルミナのベンチトップシーケンスシステムでシーケンス、BaseSpace™ Sequence Hub上のDRAGEN™ Microbial Enrichment Plusアプリを使用して解析します。ライブラリー調製からシーケンスのステップは、最短のハンズオンタイムで、2日で完了します⁷ (図1)。

ライブラリー調製

Viral Surveillance Panel v2ライブラリー調製ワークフローは、濃縮前および濃縮のステップで構成されています。濃縮前では、ハイブリッドキャプチャー手法を使用して、Viral Surveillance Panel v2プローブで濃縮された数十万の非ターゲットライブラリーを生成します。オンビーズタグメンテーションによる濃縮は、迅速かつ自動化対応ワークフローにより、最短のハンズオンタイムで、約2日で完了します。プロトコールは、10 ng~100 ngの核酸のサンプルインプット量に対応しているほか、1回のランで最大384サンプルのマルチプレックスにも対応しています。



図1: Viral Surveillance Panel v2ワークフロー: 効率的かつ包括的なワークフローでは、ライブラリーを環境または宿主サンプルから調製し、イルミナのシーケンスシステムでシーケンス、DRAGEN Microbial Enrichment Plusアプリで解析し、ウイルス検出、全ゲノムコンセンサス生成、最も一致性の高いウイルスに対してのリードマッピングおよび株タイピングを行います。シーケンス時間は、サンプルリード深度と使用するシーケンスシステムによって異なります。

表1: Viral Surveillance Panel v2に含まれる主要な高リスクウイルス

アデノ随伴ウイルス2	ヒトアデノウイルスA-G	マヤロウイルス	サビアウイルス
アイチウイルス1	ヒトボカウイルス	麻疹ウイルス	サリウイルスA
アイガイウイルス	ヒトコロナウイルス	メニングルウイルス	シチリア型サシチョウバ工熱ウイルス
ボンバリウイルス	ヒトサイトメガロウイルス	中東呼吸器症候群関連 コロナウイルス	サポウイルス
バーボンウイルス	ヒト免疫不全ウイルス1/2	エムボックスウイルス	重症急性呼吸器症候群 コロナウイルス
キャッシュバレーウイルス	ヒトメタニューモウイルス	ムンプスウイルス	重症急性呼吸器症候群 コロナウイルス2
カリフォルニア脳炎ウイルス	ヒトパピローマウイルス	マレーバレー脳炎ウイルス	セムリク森林ウイルス
チャパレウイルス	ヒトパラインフルエンザウイルス1-4	ニパウイルス	重症熱性血小板減少症候群ウイルス
チクングニアウイルス	ヒトパレコウイルス	ノロウイルス	シンドビスウイルス
コロラダニ熱ウイルス	ヒトパルボウイルスB19	オムスク出血熱ウイルス	カンジキウサギウイルス
コクサッキーウイルスA/B	インフルエンザウイルスA-C	オニョンニョンウイルス	パラミクソウイルス
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	ジェームスタウンキャニオンウイルス	オロプーシェウイルス	セントルイス脳炎ウイルス
デングウイルス1-4	日本脳炎ウイルス	ポリオウイルス	タチエンティックウイルス2
エボラウイルス	フニンウイルス	ポリオーマウイルス	タヒナウイルス
エコーウイルス	キャサナル森林病ウイルス	ポワッサンウイルス	ダニ媒介性脳炎ウイルス
エンテロウイルスA-D	ラクロスウイルス	プンタトロウイルス	トルクテノウイルス
エプスタイン・バーウイルス	ラッサウイルス	狂犬病ウイルス	トスカーナウイルス
馬脳炎ウイルス	ロビウウイルス	ラウンウイルス	ウスツウイルス
グアナリトウイルス	ルジョウイルス	呼吸器合胞体ウイルスA/B	水痘帯状疱疹ウイルス
ハンタウイルス	リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	ライノウイルスA-C	天然痘ウイルス
ハートランドウイルス	リッサウイルス	リフトバレー熱ウイルス	ウエストナイルウイルス
ヘニパウイルス	マチュポウイルス	ロスリバーウイルス	黄熱ウイルス
肝炎ウイルスA-E	ママストロウイルス	ロタウイルスA/B/C/H	ジカウイルス
単純ヘルペスウイルス1/2	マールブルグウイルス	風疹ウイルス	

シーケンス

Viral Surveillance Panel v2濃縮ライブラリーのシーケンスに必要なリード深度は低いいため、ベンチトップ型のMiniSeq™システム、MiSeq™システム、NextSeq™ 550システム、NextSeq 1000システムおよびNextSeq 2000システムを含む複数のシーケンスシステムを選択できます。ウイルス力価、核酸サンプル品質、サンプルリード深度およびサンプルあたりのリード数は、ウイルスに特異的なリード数と取得するシーケンスカバレッジに影響します。品質の良いサンプルに対する一般的なシーケンスリード深度の推奨値は、150 bp × 2のリード長で、サンプルあたり最少2Mリードです。また、推奨されるサンプルリード深度はサンプルの種類によって異なります。下水などのより複雑なサンプルについては、サンプルあたり最少8Mリードが推奨されます。複雑なサンプルタイプで確認された細菌など、他の微生物の核酸が存在する場合、オフターゲットリードが大量に発生することが予想されます。

データ解析

Viral Surveillance Panel v2を使用して生成されたデータは、BaseSpace Sequence Hubで利用可能なDRAGEN Microbial Enrichment Plusアプリを使用して解析します。この使いやすい解析パイプラインでは、サンプルの品質管理、広範囲に及ぶキュレーションされたウイルスゲノムデータベースへの参照ガイド付きアライメント、バリエーションコール、ウイルスゲノムコンセンサス配列生成、インフルエンザA/Bウイルスの抗ウイルス薬耐性予測、柔軟なレポート作成オプションのほか、サポートされているウイルスの系統分類をさらに進めるためのPangolinおよびNextcladeとの統合が可能です。

性能

ターゲット濃縮

すべてのRNA/DNAをシーケンシングするショットガンメタゲノミクスシーケンスと比較すると、Viral Surveillance Panel v2で 사용되는ターゲットハイブリッドキャプチャーは、宿主と非ターゲット微生物由来の不要なシーケンスを最小限に減らし、コストを削減し、ベンチトップシーケンサーでの幅広いウイルスゲノムのシーケンスを可能にします。⁷

Viral Surveillance Panel v2の性能を評価するために、高濃度ヒトRNA (10 ng) およびDNA (10 ng) バックグラウンドの存在下で、異なるコピー数でマルチターゲットのウイルスサンプルを作成しました (表2)。

Viral Surveillance Panel v2濃縮を使用したウイルスゲノムの回収を、濃縮なしのショットガンメタゲノミクスシーケンスと比較しました。ショットガンメタゲノミクスシーケンスと比較して、Viral Surveillance Panel v2は、マルチターゲット人工サンプルからの優れたウイルスゲノム回収を示しました (図2)。Viral Surveillance Panel v2を使用して、反応あたり1,000個のゲノムコピーにより全6個のレプリケートで、平均してヒトアデノウイルスEゲノムの99.1%と、インフルエンザAウイルス (H3N2) ゲノムの99.4%が回収されました。 (図2A、2C)。ショットガンメタゲノミクスシーケンスでは、同じウイルス力価でもゲノムカバレッジが大幅に低いことが示されました。反応あたり1,000ゲノムコピーのレプリケートで、平均してヒトアデノウイルスEゲノムの1.9%のみ回収され、インフルエンザAウイルス (H3N2) ゲノムは回収されませんでした (図2B、2D)。

表2: Viral Surveillance Panel v2の性能評価に使用した定量的ウイルスコントロール材料

参照株	ウイルスコントロール材料	ベンダー	カタログ番号
ヒトアデノウイルス4 (RI-67株)	定量的ゲノムDNA	ATCC	VR-1572DG
インフルエンザAウイルス (H3N2) 株A/Wisconsin/15/2009	定量的ゲノムRNA	ATCC	VR-1882DQ

臨床用残留サンプル

柔軟性に優れたViral Surveillance Panel v2ワークフローは、血漿、血清、皮膚病変、鼻咽頭スワブなど、複数の臨床サンプルタイプから抽出されたRNA、DNA、および全核酸に対応します。シーケンスされた宿主リードの割合を下げ、ターゲットウイルスリードを濃縮することにより、Viral Surveillance Panel v2は、ウイルスゲノムのカバレッジとカバレッジ深度の中央値を向上させました。事前に同定されたウイルスを含む臨床残留サンプルを使用して、Viral Surveillance Panel v2の性能を評価しました (表3)。Viral Surveillance Panel v2で濃縮されたすべての臨床残留サンプルは、ショットガンメタゲノミクスシーケンスと比較し、異なるウイルス (ヒト免疫不全ウイルス1を除く) とサンプルタイプで、より優れたウイルス検出感度を示しました (図3)。

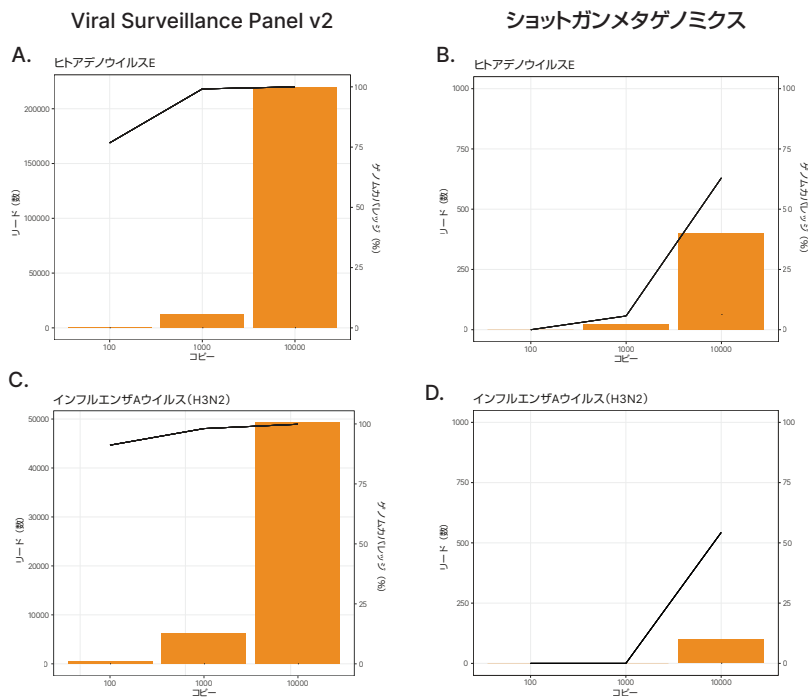


図2: Viral Surveillance Panel v2を用いたリード数およびウイルスゲノムカバレッジの向上: 市販で購入可能なマルチターゲット定量的人工サンプルを用いた Viral Surveillance Panel v2と濃縮なしショットガンシーケンスの性能比較。(A) Viral Surveillance Panel v2で濃縮したヒトアデノウイルス4 (RI-67株)、(B) 濃縮なしでショットガンメタゲノミクスでシーケンスしたヒトアデノウイルス4 (RI-67株)、(C) Viral Surveillance Panel v2で濃縮したインフルエンザウイルス (H3N2)、(D) 濃縮なしでショットガンメタゲノミクスでシーケンスしたインフルエンザウイルス (H3N2)。各人工サンプルの反応あたり1,000コピーの6レプリケートをNextSeq 550システム高出力フローセルでシーケンスしました。シーケンスデータは合計2Mリードにノーマライズしました。

表3: Viral Surveillance Panel v2の性能の評価に使用した臨床残留サンプル

事前に同定されたウイルス	サンプルタイプ	抽出キット	サンプルインプット
単純ヘルペスウイルス1	皮膚病変	ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep	総核酸
単純ヘルペスウイルス2型	皮膚病変	ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep	総核酸
ヒト免疫不全ウイルス1型	血漿、血清	MagMAX Microbiome UltraNucleic Acid Isolation Kit	DNA、RNA
デングウイルス	血清	QIAmp Viral RNA Kit	RNA
ヒト呼吸器合胞体ウイルスA	鼻咽頭スワブ	QIAmp Viral RNA Kit	RNA
インフルエンザウイルス (H3N2)	鼻咽頭スワブ	QIAmp Viral RNA Kit	RNA

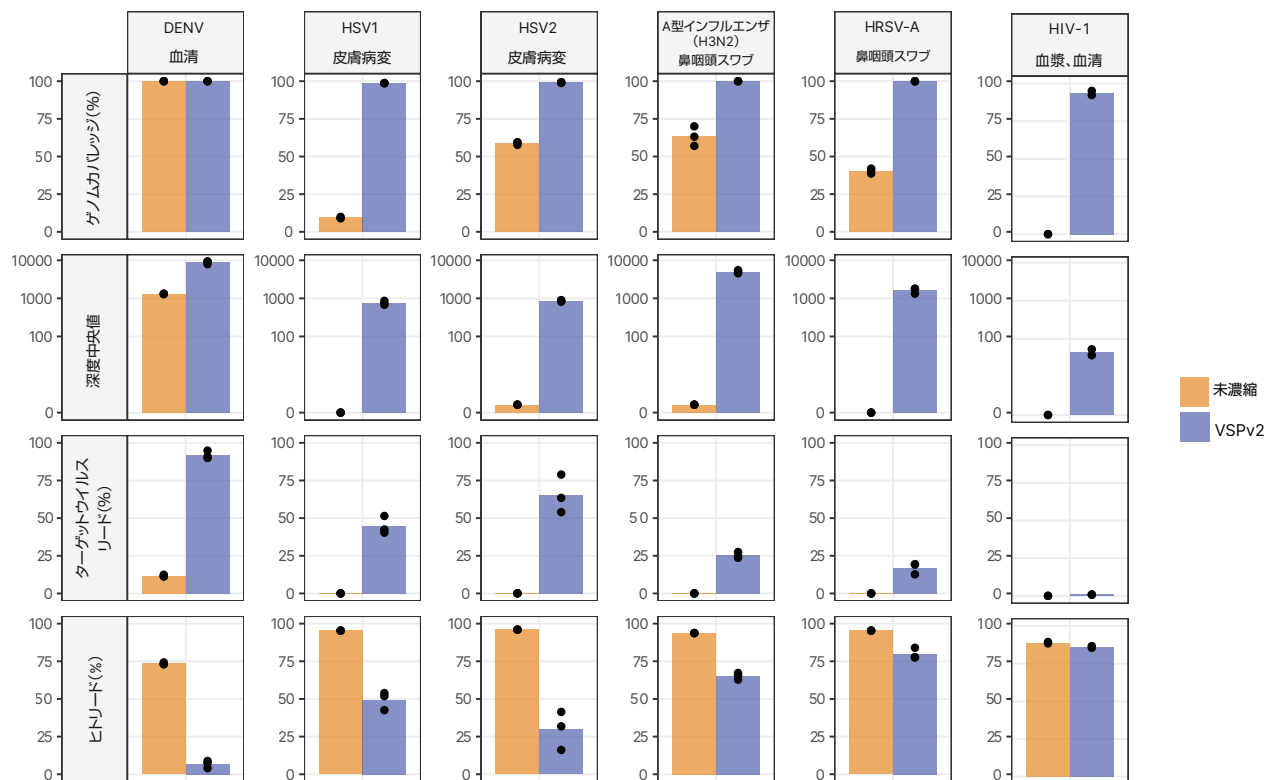


図3: 臨床残留サンプルを使用したViral Surveillance Panel v2の性能: Viral Surveillance Panel v2またはショットガンメタゲノミクスシーケンスを使用して達成されたゲノムカバレッジ、ターゲットウイルスリード、深度中央値、およびヒットリードの割合を示します。6つの臨床サンプルからの2~3レプリケートをNextSeq 550システム高出力フローセルでシーケンスしました。シーケンスデータは合計1Mリードにノーマライズしました。DENV: デングウイルス、HSV1: 単純ヘルペスウイルス1型、HSV2: 単純ヘルペスウイルス2型、Flu A: A型インフルエンザ、HRSV-A: ヒト呼吸器合胞体ウイルスA、HIV-1: ヒト免疫不全ウイルス、NP: 鼻咽頭、VSPv2: Viral Surveillance Panel v2。

下水サーベイランス

下水中のウイルスシーケンスのサーベイランスは、ウイルス性病原体の地域での拡大に関する局地的指標を提供し、公衆衛生の専門家が対応計画を検討するための価値ある情報を与えることができます。⁹ Viral Surveillance Panelはこれらのサンプルを用いて、ショットガンシーケンスよりも低濃度で下水中のウイルスゲノムの早期検出と同定を可能にします (表4)。

ウィスコンシン州衛生研究所 (WSLH) およびコロラド州立大学 (CSU) との協力により、2か所の収集場所から下水サンプルを取得し、抽出しました。それぞれの収集場所からの3つのサンプルを評価しました。これら6つの下水サンプルから調製されたライブラリーをシーケンスし、Viral Surveillance Panel v2濃縮に対し合計8Mリードに、ショットガンメタゲノミクスシーケンスに対し合計8Mと

25Mリードにノーマライズしました。下水サンプルは複雑さが大きく異なり、数十種類のウイルスが低存在量で含まれている可能性があるため、この比較では合計8Mリードのシーケンス深度を使用しました。ショットガンメタゲノミクスシーケンスの合計リードが約6倍に増加した場合でも、ショットガンメタゲノミクスシーケンスと比較して、全体的なウイルス量が低い複雑な環境サンプルタイプで、Viral Surveillance Panel v2はより優れたウイルス検出感度を示しました (表4)。

表4：Viral Surveillance Panel v2またはショットガンメタゲノミクスシーケンスを用いて下水中で検出された上位のウイルス

ウイルス (株)	合計8Mリード				合計25Mリード	
	Viral Surveillance Panel v2		ショットガンメタゲノミクス		ショットガンメタゲノミクス	
	ゲノムカバレッジ (%)	リード数	ゲノムカバレッジ (%)	リード数	ゲノム カバレッジ (%)	リード数
サポウイルス (GII.1)	99.7	219,539	50.0	57	84.2	360
ヒトアデノウイルスF (ヒトアデノウイルス41)	100	104,693	6.4	18	23.6	72
ヒトコロナウイルスOC43 (HCoV_OC43)	98.1	23,857	0	0	10.0	26
サポウイルス (GV)	99.6	10,750	0	0	25.3	19
ヒトアデノウイルスE	88.4	6,733	0	0	0	0
JCポリオーマウイルス (JCPyV)	99.3	5,834	0	0	0	0
マmastロウイルス9 (MAstV9)	99.2	4,959	0	0	0	0
マmastロウイルス1 (MAstV1)	98.6	3,972	7.5	5	22.0	13
ヒトアデノウイルスA (ヒトアデノウイルス31)	81.1	3,449	0	0	0	0
マmastロウイルス6 (MAstV6) [MLB1]	97.2	3,181	0	0	17.3	9
ノロウイルス (G1)	96.9	1,972	0	0	0	0
BKポリオーマウイルス (BKPyV)	100	1,522	0	0	11.1	4
マmastロウイルス8 (MAstV8) [VA2]	92.1	1,208	0	0	6.1	4
ヒトパピローマウイルス59 (HPV59、高リスク)	69.3	1,015	0	0	0	0
エンテロウイルスA (コクサッキーウイルスではない) [エンテロウイルスA71]	70.0	295	5.1	4	9.0	6

まとめ

Viral Surveillance Panel v2は、ウイルス感染拡大の検出、人獣共通感染症のサーベイランス、および変異の追跡のための最適化された包括的ワークフローの一部です。このキットには、公衆衛生上高リスクであるとされている約200のRNA/DNAウイルスのゲノムを同定するためのハイブリッドキャプチャープローブが含まれています。ハイブリッドキャプチャーターゲット濃縮は、ターゲット配列に集中することで、高いサンプルリード深度の必要性を最小化し、スループットを向上させながら、コストを削減します。効率化されたワークフローは、臨床サンプルやウイルスの地域的な存在を調べるための下水サーベイランスなど、幅広いサンプルの種類とアプリケーションに対応しています。Viral Surveillance Panel v2を使用して生成されたデータは、BaseSpace Sequence Hub上のユーザーフレンドリーなDRAGEN Microbial Enrichment Plusアプリを使用して解析できます。このロバストなNGSワークフローは、複雑なサンプルに含まれるDNAおよびRNAを同定するための優れたウイルス捕捉性能を発揮し、公衆衛生組織や研究者にとって、ショットガンシーケンスに代わる高度な手段となり得ます。

詳細はこちら

[Viral Surveillance Panel v2](#)

[DRAGEN Microbial Enrichment Analysis Plusアプリ](#)

[イルミナシーケンスシステム](#)

製品情報

製品名	カタログ番号
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set A (96 samples)	20108081
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set B (96 samples)	20108082
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set C (96 samples)	20108083
Illumina Viral Surveillance Panel v2 Kit, Set D (96 samples)	20108084
Illumina Viral Surveillance Panel v2, Panel Only (96 samples)	20123403

参考文献

- Ling-Hu T, Rios-Guzman E, Lorenzo-Redondo R, Ozer EA, Hultquist JF. [Challenges and Opportunities for Global Genomic Surveillance Strategies in the COVID-19 Era. *Viruses*. 2022;14\(11\):2532. doi:10.3390/v14112532.](#)
- World Health Organization. Pathogens prioritization: a scientific framework for epidemic and pandemic research preparedness. [who.int/publications/m/item/pathogens-prioritization-a-scientific-framework-for-epidemic-and-pandemic-research-preparedness](#). Published July 30, 2024. Accessed August 9, 2024.
- World Health Organization. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. [who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts](#). Accessed August 9, 2024.
- Bloom DE, Cadarette D. Infectious Disease Threats in the Twenty-First Century: Strengthening the Global Response. *Front Immunol*. 2019;10:549. doi:10.3389/fimmu.2019.00549.
- World Health Organization. Disease Outbreak News. [who.int/emergencies/disease-outbreak-news](#). Updated July 31, 2024. Accessed August 9, 2024.

6. Africa Centers for Disease Control and Prevention. Diseases information. africacdc.org/disease/. Accessed August 9, 2024.
7. Data on file. Illumina, Inc. 2024.
8. Thakur S, Sasi S, Pillai SG, et al. [SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines](#). *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:815389. doi:10.3389/fmed.2022.815389
9. Diamond MB, Keshaviah A, Bento AI, et al. [Wastewater surveillance of pathogens can inform public health responses](#). *Nat Med*. 2022;28(10):1992-1995. doi:10.1038/s41591-022-01940-x.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.
すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。
商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

illumina[®]