

# SARS コロナウイルス核酸キット

## カネカ Direct RT-PCR キット SARS-CoV-2

### 【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. 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。
3. 検体採取、検体の取扱いについては必要なバイオハザード対策を行ってください。
4. 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。

### 【一般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品です。本添付文書記載の使用目的以外の目的には使用しないでください。
2. 本添付文書に記載された使用目的および操作方法に従って使用してください。本添付文書に記載されていない使用目的および操作方法で使用した場合には、性能を保証いたしません。
3. 本品を使用する際、必ず保護着、マスク、保護メガネ、手袋等を着用し、試薬が目や皮膚、粘膜に触れないように注意してください。万が一、このようなことが起きた場合は、大量の水で十分に洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。
4. 使用する器具、機材については、本添付文書又は取扱説明書をお読み頂き、適切に点検・校正されたものを使用してください。
5. 本品の使用に際しては、ウイルス・細菌検査に習熟した人の指導のもとに検査を実施してください。

### 【形状・構造等（キットの構成）】

1. 前処理試薬：400 µL 1本（100テスト）
2. RT-PCR 酵素ミックス：600 µL 1本（100テスト）  
逆転写酵素  
DNA ポリメラーゼ  
デオキシリボヌクレオシド三リン酸
3. プライマー&プローブミックス：500 µL 1本（100テスト）  
2019-nCoV-N1 F-Primer  
2019-nCoV-N1 R-Primer  
2019-nCoV-N1 Probe  
2019-nCoV-N2 F-Primer  
2019-nCoV-N2 R-Primer  
2019-nCoV-N2 Probe  
IC F-Primer  
IC R-Primer  
IC Probe  
IC Template DNA
4. RNase Free Water：900 µL 1本（100テスト）

### 【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）

【操作上の注意】、（臨床性能試験成績）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してください。

### 【測定原理】

本品は、蛍光プローブを組み合わせた 1step RT-PCR（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 法）により、生体試料中に含まれる SARS-CoV-2 遺伝子を検出する試薬です。本品のプライマー&プローブミックスは、SARS-CoV-2 の RNA に特異的な配列からなるプライマーと蛍光プローブに加え、PCR の増幅工程が正常に機能したことを確認する内部標準コントロール（IC）DNA およびそれに特異的な配列からなるプライマーと蛍光プローブを含みます。SARS-CoV-2 検出用のプライマーおよびプローブには、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行の「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time rRT-PCR Panel Primers and Probes (Effective: 24 Jan 2020)」に記載された配列を使用しています。

生体試料と本品の前処理試薬を混合し加熱することで、生体試料に含まれる RNA を抽出します。逆転写酵素により RNA から cDNA を合成した後、DNA ポリメラーゼにより cDNA 中の標的配列を増幅します。反応液中に含まれる蛍光プローブは 3'末端側をクエンチャーで、5'末端側を蛍光物質（SARS 検出用：FAM、IC 検出用：ROX）で修飾されており、4 種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸を取り込みながら DNA を伸長する過程で蛍光プローブは分解し、それまでクエンチャーによって消光されていた蛍光物質が遊離し、蛍光を発します。PCR の各サイクルにおける蛍光をリアルタイム PCR 装置で測定し、SARS-CoV-2 を検出するプローブの FAM 蛍光の Ct 値と、IC を検出するプローブの ROX 蛍光の Ct 値から、試料中の SARS-CoV-2 の RNA の有無を判定します。

### 【操作上の注意】

1. 検体の採取法  
患者検体の採取、輸送方法については、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」および国立感染症研究所の「2019-nCoV（新型コロナウイルス）感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル」を参照してください。不適切な保存や凍結融解により測定結果に影響が生じる可能性があります。
2. 妨害物質・妨害薬剤  
本品では前処理の段階で核酸を精製しないため、タンパク質変性剤（グアニジン等）やエタノール等を含む溶液に検体を懸濁した場合、PCR 反応に影響を及ぼす可能性があります。必要に応じて、本品との適合性（PCR 阻害の有無など）を事前に確認した上でご使用ください。  
※タンパク質変性剤（グアニジン等）、エタノール、PBS、高濃度の DTT を含む場合、前処理で RNA 精製した後で、測定することをおすすめします。
3. 交差反応性  
計 11 種のウイルス・細菌の RNA 又は DNA（市販品）を測定したところ、全て陰性となり、交差反応は認められませんでした。

ウイルス・細菌種	判定結果
Influenza A H1	陰性
Influenza A H5	陰性
Influenza B	陰性
Human corona virus OC43	陰性
Respiratory Syncytial Virus A	陰性
Respiratory Syncytial Virus B	陰性
Mycoplasma pneumoniae	陰性
Streptococcus pneumoniae	陰性
Legionella pneumophila	陰性
Bordetella parapertussis	陰性
Haemophilus influenzae	陰性

また、BLAST を用いた *in silico* 解析による N1 および N2 プライマーおよびプローブの交差反応予測では、SARS-CoV-2 以外の病原体との交差反応性は認められませんでした。

*in silico* 解析に使用したウイルス・細菌種 (抜粋)

ウイルス・細菌種
Human corona virus
SARS-coronavirus
MERS-coronavirus
Adenovirus
Human Metapneumovirus (hMPV)
Human parainfluenza virus
Influenza A virus
Influenza B
Influenza C
Enterovirus
Respiratory Syncytial Virus A
Respiratory Syncytial Virus B
Rhinovirus
Parechovirus
Bordetella pertussis
Candida albicans
Corynebacterium diphtheriae
Coxiella burnetii (Q-Fever)
Chlamydomphila pneumoniae
Chlamydomphila psittaci
Haemophilus influenzae
Legionella (non-pneumophila)
Legionella pneumophila
Leptospira sp.
Mycobacterium tuberculosis
Mycoplasma pneumoniae
Neisseria elongate
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Streptococcus salivarius
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes

#### 4. 共存物質

下表の共存物質については、検体中に混入した際に影響がないことを確認しています。

共存物質	許容濃度*
クラリスロマイシン	2 mg/mL
セフトジジム	2 mg/mL
レボフロキサシン	2 mg/mL
アセトアミノフェン	2 mg/mL
ロキソプロフェンナトリウム	2 mg/mL

\*:RT-PCR 反応液に混入しても問題ないことを実験的に確認した最大の濃度。

#### 【用法・用量 (操作方法)】

##### 1. 必要な器具・機材等

- (1) リアルタイム PCR 装置 (LightCycler 96 (Roche Diagnostics 製) 又はそれと同等の機器で使用)

- (2) リアルタイム PCR 用容器 (8 連チューブ、96 ウェルプレートなど)
- (3) ヒートブロック (95°C 設定が可能なもの)
- (4) マイクロピペット
- (5) マイクロピペット用フィルター付きチップ
- (6) マイクロチューブ (RNase / DNase フリー)
- (7) 卓上遠心機 (スピンドダウン用)
- (8) ボルテックスミキサー
- (9) ポジティブコントロール (別売、推奨品: 株式会社日本遺伝子研究所、新型コロナウイルス陽性コントロール RNA (米国 CDC Real-time RT-PCR N1/N2 PC mix))

##### 2. 前処理 (RNA の抽出)

- (1) マイクロチューブに前処理試薬 4  $\mu$ L と検体 16  $\mu$ L を混合する。
- (2) ヒートブロック等で 95°C、5 分間の熱処理を行う。  
※熱処理後は速やかにリアルタイム RT-PCR 反応液に添加し、反応を開始してください。前処理後の溶液を一時保存する場合は氷上又は 4°C で保存してください。

##### 3. リアルタイム PCR 装置の設定

- (1) 使用するリアルタイム PCR 装置の手順書に従って、下記の通り条件を設定してください。
  - ① 検出チャンネル: SARS-CoV-2 FAM、内部標準コントロール (IC) ROX
  - ② RT-PCR 反応液量: 25  $\mu$ L
  - ③ RT-PCR 反応条件

ステップ	温度	反応時間	サイクル数	蛍光検出
1	52°C	300 秒	1	OFF
2	95°C	20 秒	1	OFF
3	95°C	5 秒	45	OFF
	60°C	30 秒		ON

##### 4. リアルタイム RT-PCR 用マスターミックスの調製

下表の組成で、マスターミックスを調製する。調製量は必要量 (検体数+コントロール反応分) の 1 割増しとする。

試薬名	添加量
RT-PCR 酵素ミックス	6 $\mu$ L
プライマー&プローブミックス	5 $\mu$ L
RNase Free Water	9 $\mu$ L
(全量)	20 $\mu$ L

##### 5. RT-PCR 反応液の調製

<検体>

- 2 で得られた RNA 抽出液 5  $\mu$ L を添加したチューブに 4 で調製したマスターミックス 20  $\mu$ L を添加し、ピペッティングで混合する。

<コントロール反応液>

結果判定を適切に行うために、陰性コントロールおよび陽性コントロールを添加した反応液を調製する (測定毎に少なくとも各々 1 反応分ずつ調製する)。

陰性コントロールとしては、本品に付属の RNase Free Water を、陽性コントロールとしては、市販の合成 RNA を 10<sup>3</sup> コピー/ $\mu$ L に調製したものを使用する。

陰性コントロール又は陽性コントロールを 5  $\mu$ L 添加したチューブに、マスターミックスを 20  $\mu$ L 添加し、ピペッティングによりよく混合する。

##### 6. RT-PCR 反応

- 3 で設定した条件で測定を実施する。

## 7. データ解析

使用したリアルタイム PCR 装置の解析ソフトウェアの手順書に従い解析を行い、Ct 値を算出する。

### 【測定結果の判定法】

<コントロール反応の測定結果>

データ解析後、コントロール反応の結果が以下の条件を満たすことを確認する。条件を満たさない場合は再測定を推奨する。

	SARS-CoV-2 (FAM)	IC (ROX)
陰性コントロール	Ct > 40 もしくは不検出	Ct ≤ 35
陽性コントロール	Ct ≤ 30	Ct ≤ 35

<検体の測定結果>

算出された Ct 値を用いて以下の判定表に従って陽性および陰性を判定する。

		SARS-CoV-2 (FAM)	
		≤40	>40 又は不検出
IC (ROX)	≤35	陽性	陰性
	>35 又は不検出	陽性	再測定を推奨

### 【判定上の注意】

以下に記載の理由等で、陰性判定となる可能性もありますので、本品で陰性と判定されても必ずしも SARS-CoV-2 の存在を否定するものではありません。測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状等と併せて担当医師が総合的に判断してください。

- 検体中のウイルス量が最小検出感度未満の場合
- 本品のプライマー・プローブに該当する領域において SARS-CoV-2 遺伝子の変異、欠損・挿入が生じた場合
- 増幅曲線の形状に異常が生じた場合

### 【臨床的意義】

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、SARS-CoV-2 によって引き起こされるウイルス性呼吸器疾患で、2019 年 12 月に中国湖北省武漢市で発生して以降、世界各地に急速に広まり多数の感染者が確認されています。感染拡大の防止には、早期診断が重要であり、SARS-CoV-2 の遺伝子を増幅する RT-PCR 検査が実施されています。本品は、リアルタイム RT-PCR 法により SARS-CoV-2 遺伝子を検出する体外診断用医薬品です。本品の特長は、簡易な検体前処理法を採用することで、RNA 精製を不要とした点です。それにより、約 1 時間で検査が完了します。また、内部標準コントロールを同時検出できるため、PCR 阻害による偽陰性判定を防止できます。以上より、COVID-19 の診断補助に有用と考えられます。

### 【臨床性能試験成績】

#### 1. 鼻咽頭拭い液検体

10 例の陽性検体、15 例の陰性検体を用いて、本品と国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」2) に記載された RNA 精製を行う手法との比較試験を行った結果、陽性一致率：100%、陰性一致率：100%となり、全体一致率：100%となりました。

鼻咽頭ぬぐい液 (実検体)		感染研法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	10	0	10
	陰性	0	15	15
計		10	15	25

陽性一致率 100% (10/10)、陰性一致率 100% (15/15)

## 2. 唾液検体

唾液の陰性検体に鼻咽頭ぬぐい液の陽性検体をスパイクした疑似検体を用いて、本品と国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」2) に記載された RNA 精製を行う手法との比較試験を行った結果、陽性一致率：100%、陰性一致率：100%となり、全体一致率：100%となりました。

唾液 (疑似検体)		感染研法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	10	0	10
	陰性	0	15	15
計		10	15	25

陽性一致率 100% (10/10)、陰性一致率 100% (15/15)

### 【性能】

#### 1. 性能

##### (1) 感度

陽性管理検体 (50 コピー/反応) を測定した場合、SARS-CoV-2 遺伝子が 38 サイクル以内、内部標準コントロール遺伝子が 35 サイクル以内に検出される。

##### (2) 正確性

陽性管理検体 (50 コピー/反応) を測定した場合、陽性判定となる。陰性管理検体を測定した場合、陰性判定となる。

##### (3) 同時再現性

管理検体を 3 回同時に測定した場合、陽性管理検体はすべて陽性に、陰性管理検体はすべて陰性判定となる。

##### (4) 最小検出感度 (例示)

50 コピー/反応

#### 2. 校正用基準物質

陽性管理検体：SARS-CoV-2 の N 遺伝子、約 100 塩基をそれぞれに含む 2 種類の人工合成 RNA を混合して使用

陰性管理検体：滅菌精製水 (DNA、RNA、Nuclease Free)

### 【使用上又は取扱い上の注意】

#### 1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 本品は、ウイルス・細菌の取扱いに習熟した人の指導のもとにバイオハザード対策を実施した上で行ってください。
- 本品を取扱う場合には、必ず保護衣、マスク、保護メガネ、手袋等を着用してください。

#### 2. 使用上の注意

- 本品と他の試薬を組み合わせて使用しないでください。
- 本品は、貯蔵方法に従い保存してください。融解時に沈殿物が確認されることがありますが、品質には問題ありません。使用時は完全に融解したことを確認した上で、使用してください。使用後はすみやかに貯蔵方法に従い保存してください。
- 有効期限を過ぎたキットは使用しないでください。
- 異なるロットの試薬を継ぎ足して使用しないでください。ロット番号は外装のラベルおよび内容物のラベルに印字されています。
- 試薬の凍結融解は 10 回までとしてください。
- RT-PCR 反応液をリアルタイム PCR 装置にセットする前に、スピンドウンしてください。
- リアルタイム PCR 用容器の蓋や壁面に RT-PCR 反応液の付着や、気泡がないかを確認してください。
- RT-PCR 反応液調製後は、速やかにリアルタイム PCR での測定を実施してください。

### 3. 廃棄上の注意

- (1) 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全規程に従って廃棄してください。
- (2) 検査に用いた器具等は加熱滅菌処理等を行った上、各施設の規程に従って処理してください。
- (3) PCR 反応後は、反応容器の蓋を開けず廃棄してください。PCR 増幅産物による汚染を防ぐため、オートクレーブ処理は行わないでください。
- (4) 使用後の容器等の廃棄物処理に際しては、廃棄物の処理および清掃に関する法律や、各施設の規程等に従ってください。

### 【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法：-10℃～-30℃
2. 有効期間：12 か月（使用期限は外装に記載されています）

### 【包装単位】

カネカ Direct RT-PCR キット SARS-CoV-2 100 テスト  
（各構成試薬の詳細につきましては、【形状・構造等（キットの構成）】の項を参照してください）

### 【主要文献】

1. アメリカ疾病予防管理センター（CDC）発行「2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes」(Effective: 24 Jan 2020)
2. 国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1」

### 【承認条件】

1. 承認時のデータが極めて限られていることから、製造販売後に臨床性能を評価可能な適切な試験を実施すること。
2. 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。

### 【問い合わせ先】

株式会社カネカ お問い合わせ窓口  
電話番号 079-445-2406

### 【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

株式会社カネカ  
〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島 2-3-18