

## SARS コロナウイルス核酸キット

## FTD SARS-CoV-2キット

## ■ 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. 診断は本品による検査結果のみで行わず、厚生労働省より公表されている最新情報を参照し、臨床症状も含め総合的に判断ください。
3. 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。
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」を参照ください。

## ■ 全般的な注意

- ・本品は体外診断用医薬品ですので、それ以外の目的に使用しないでください。
- ・本品の測定結果は、患者の治療歴、臨床症状その他関連する他の検査結果等を考慮して総合的に判断ください。
- ・電子添文に記載されている以外の使用方法については保証しません。
- ・使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んでから使用ください。
- ・適切な保護手袋、保護衣、保護用眼鏡及び顔防衛マスクを使用し測定ください。

## ■ 形状・構造等（キットの構成）

構成試薬	識別	内容量	成分
SCoV2 PP Mix 96	緑	96 reactions: 1 x 144 µL	SCoV2 (N) Fプライマー、SCoV2 (N) Rプライマー、SCoV2 (N) プロープ、SCoV2 (ORF1ab) Fプライマー、SCoV2 (ORF1ab) Rプライマー、SCoV2 (ORF1ab) プロープ
SCoV2 PC 96	赤	96 reactions: 1 x 150 µL	環状二本鎖DNA、バッファー、安定化剤
Negative Ctrl 96	白	96 reactions: 1 x 2000 µL	精製水
Internal Ctrl 96	青	96 reactions: 1 x 350 µL	環状二本鎖DNA、バッファー、塩化グアニジン、マレイン酸
25x RT- PCR Enz 96	黄	25x RT-PCR Enzyme mix 96 reactions: 1 x 96 µL	逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、安定化剤
2x RT- PCR Buff 96	水色	2x RT-PCR Buffer 96 reactions: 1 x 1200 µL	デオキシアデノシン三リン酸 (dATP)、デオキシチジン三リン酸 (dCTP)、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP)、デオキシチミジン三リン酸 (dTTP)

PP : Primer/Probe、PC:Positive control、Ctrl : Control、Enz : Enzyme、Buff : Buffer

各バイアルには、ピペッティングのデッドボリュームを考慮し表示よりわずかに多く入れています。箱及び各バイアルには、ロット番号が表示されています。実施可能な最大試験数は、操作のワークフローにより異なります。

## ■ 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）

## ■ 測定原理

本品は、ヒト検体中の病原体の検出を目的とするリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（以下、RT-PCR）法による試験です。

適切な検体とInternal Ctrl（以下、IC）の核酸抽出を行います。処理をした病原体の核酸抽出液に、RT-PCR反応を行うマスターミックスを添加します。SCoV2マスターミックスは、SCoV2 PP Mix（SCoV2（N）及びSCoV2（ORF1ab）のプライマー及びプロープ含有）、25x RT-PCR Enz（DNAポリメラーゼ、逆転写酵素含有）、2x RT-PCR Buff（デオキシリボヌクレオチド三リン酸（dNTPs）含有）の混合液です。

マルチプライマー及びプロープの組み合わせを使用する利点は、1回の反応で異なる遺伝子領域を同時に検出することです。測定対象物が検体中に存在する場合は、試薬に特異的な配列にプライマーとプロープがハイブリダーゼし、ポリメラーゼによる増幅が行われます。蛍光色素と消光物質（クエンチャー）を含むプロープが近くに存在する場合は、蛍光発光が限定されます。増幅の間、ポリメラーゼが新しい鎖の伸長を助長し、エキソヌクレアーゼ活性により蛍光色素で標識されたプロープが変性します。この反応が起こると、クエンチャーから蛍光色素が分離されるため、はっきりとした蛍光を発するようになります。

蛍光強度は、増幅量に応じて増加し、検体中の病原体の量に相関します。蛍光強度は、リアルタイムサーマルサイクラーによりCt値（cycle threshold）として報告されます。

ICはウマ動脈炎ウイルスを含み、抽出時の検体及びNegative Ctrl（以下、NC）に添加します。ICは、抽出の過程をモニターし、PCR増幅阻害の原因を特定するために、各検体と同様に抽出、処理、増幅が行われます。NCも検体と同様に（抽出及びRT-PCR）の処理をすることで汚染の有無の確認を行います。

本品中のSCoV2 PC（PC）は、各RT-PCR測定時に使用します。これにより、RT-PCR反応、プライマー及びプロープの性能をモニターします。

## ■ 操作上の注意

## 1. 測定試料の性質、採取法

## (1) 検体の性質、採取法

- ・本項は、試験結果を正確にするための、上気道由来検体の一般的な取扱い、保存方法について記載します。

本品は、鼻咽頭及び中咽頭のぬぐい液から抽出した核酸を検出する試薬です。

呼吸器病原体の検出は、検体が適切に採取され、検査室に迅速に輸送され、適切に保存をし、検査前に適切に処理されたかに左右されます。感度は外部環境にいる数種類の病原体により左右されるため、検体採取後、可能な限り速やかに検査室に検体を輸送し、検体処理及び試験を行います。検査室の手順に従い、すべての検体に適切なラベルをしてください。ウイルス性RNAの劣化を妨げるために、検体の取扱いは特に重要です。

- ・検体採取前に患者が事前に準備することはありません。また、検体の保存のための前処理は不要です。

- ・検体の採取は、標準的な手法に従い実施ください。

- ・Remel M4RT輸送培地は使用しないでください。

- ・鼻咽頭ぬぐい液スワブ

口蓋に対して外鼻孔からスワブを水平に抵抗がある所まで挿入するか、患者の耳と鼻の間と同程度の長さまで上咽頭からスワブを挿入します。挿入後、やさしくスワブを回転し、感染した細胞を採取し、適切な容器に入れます。

- ・検体の輸送

- ぬぐい液スワブは、VTM輸送培地又はAmies輸送培地を使用してください。速やかに検体を検査室に輸送できる場合については、冷蔵保存とし輸送温度を2~8℃とします（使用説明書に従ってください）。

- 検査までに時間がかかることが予想される場合は、検体を-20℃に凍結保存することもできますが、-70℃がより適した温度です。凍結融解は繰り返さないでください（WHO推奨事項<sup>1)</sup>）。

- 注意：

- ・検体の保存と輸送については推奨される例示です。検査室の規則や該当する規制について確認ください。

- ・検体を輸送する際は、臨床検体及び病原体の輸送に関して適用される規制に従い、検体を梱包・表示ください。

## 2. 妨害物質・妨害薬剤

臨床検体で妨害物質となる可能性のある物質について評価試験を行いました。調製済み溶液を以下の妨害物質、溶媒、又は未処理の生体物質に添加調製しました。各検体は、調製後NucliSENS easyMAG（核酸抽出装置）で3回抽出しました。抽出液にSARS-CoV-2 RNA (BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1) を添加し、3x LoDの濃度に行いました。Applied Biosystems 7500 (RT-PCR装置) を用いて本品1ロット試験でRT-PCRを行いました。妨害の程度は以下のとおりです。試験した物質は試験した条件において本品の結果に影響を与えませんでした。

表 1 妨害物質

物質	提供者	測定濃度	結果
全血	Biomex	10% v/v	妨害なし
ムチン (ウシ由来)	Sigma	60 µg/mL	妨害なし
サルブタモール	Vaseline	1.7 µmol/L	妨害なし
鼻腔スプレー (キシロメタゾリン)	Up&Up	10% v/v	妨害なし
鼻腔スプレー	Ratiopharm	10% v/v	妨害なし
グアイフェネシン	Emsa	15.2 mmol/L	妨害なし
アセチルシステイン	Sigma	920 µmol/L	妨害なし
ニコチン	Sigma	6.2 µmol/L	妨害なし
ベンゾカイン	Sigma	0.63 mg/mL	妨害なし
オセルタミビル	Sigma	1.5 mg/mL	妨害なし

## 3. 交差反応性

### In Silico分析

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) により、in silico分析を実施しました。本品のプライマー及びプローブについて、測定対象物が属するシーケンスを除きNational Center for Biotechnology Information (NCBI) Nucleotide collection database (non-redundant protein [nr]/non-redundant nucleotide[nr]) を全調査し、遺伝子領域の類似性を調査しました。潜在的に合成されるアンプリコンを確認するために、プライマーとプローブそれぞれについて、マッピングによる規格は相同性が90%以上としました。プライマーとプローブをマッピングする際に、オリゴターゲットシーケンス間のミスマッチは4以下としました。結果は下表のとおりです。

コウモリコロナウイルスから分離されるRaTG13 (Accession number MN996532.1) 及びMP789 (Accession number MT084071.1) に潜在的に交差反応を示す可能性を示唆しました。

いずれもSARSに属するコロナウイルスです。Bat CoV RaTG13 及びSARS-CoV-2 (Accession number NC\_045512) の組み合わせシーケンス一致率は、96.1%です。RaTG13はSARS-CoV-2に最も近いグループに属し、SARSが属するコロナウイルスと同系であることが根拠となっています<sup>2</sup>。センザンコウCoV MP789及びSARS-CoV-2 (Accession number NC\_045512) の組み合わせシーケンス一致率は、78.7%です。センザンコウから分離したこのウイルス株は、センザンコウコロナウイルス (pangolin-CoV-2020) がSARSCoV-2及びコウモリコロナウイルスの両方に関連することを明確にしました。しかしながら、系統発生分析においては、SARS-CoV-2がpangolin-CoV-2020から発生したことは示されませんでした<sup>3</sup>。本品においてはそのほかの交差反応は特定されませんでした。

表 2 In silico分析により交差反応性の可能性があると特定されたウイルス株

病原体	交差反応性物質
SARS-CoV-2	Bat coronavirus isolate RaTG13 (MN996532.1) Pangolin coronavirus isolate MP789 (MT084071.1)

### In Vitro分析

呼吸器感染の原因となる細菌叢及び病原体について潜在的交差反応性の検討をしました。試験は、プール検体、調製検体及び抽出RNA・DNA液を用いて実施しました。プール検体に最大で5回病原体を添加しました。この抽出液はRT-PCR装置にApplied Biosystems 7500 (Thermo Fisher Scientific社)、核酸抽出装置にNucliSENS easyMAG (bioMérieux社) を使用し、3回測定しました。検討結果は下表のとおりです。非特異的なシグナルは検出されませんでした。

表 3 交差反応性試験結果 (In vitro)

病原体	提供者	品番	測定濃度	単位	交差反応
Human Adenovirus 1 (Adenoid 71)	American Type Culture Collection (以下ATCC)	VR-1	1.13E+06	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human parainfluenza Virus 2, Greer	ATCC	VR-92	1.13E+06	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human enterovirus, human echovirus 1; Strain: Farouk	ATCC	VR-1808	2.00E+06	TCID <sub>50</sub> /mL	なし

病原体	提供者	品番	測定濃度	単位	交差反応
Human rhinovirus 1A; Strain: 2060	ATCC	VR-1559	1.13 E+07	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Streptococcus pneumoniae	DSMZ	DSM 20566	1.24E+08	cop/mL	なし
Human metapneumovirus (hMPV) A, Type: A1; Strain: IA10-2003	ZeptoMetrix	0810156CFHI	6.82E+05	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human parainfluenza virus 3, C 243	ATCC	VR-93	1.13 E+06	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human parainfluenza virus 4, M-25	ATCC	VR-1378	2.00E+05	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human metapneumovirus (hMPV) B, Type: B1; Strain: Peru2-2002	ZeptoMetrix	0810156CFHI	1.56E+05	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human parainfluenza virus 1, C35	ATCC	VR-94	2.00E+05	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human coronavirus OC43	ATCC	VR-1558	1.41 E+04	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Human coronavirus NL63	ZeptoMetrix	0810228CFHI	8.39E+03	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Influenza B, Florida/04/06	ZeptoMetrix	0810255CFHI	不明 (Ct: 20.3) <sup>[a]</sup>	—	なし
Chlamydia pneumoniae, Strain: TW-183	ATCC	VR-1435	2.01E+04	TCID <sub>50</sub> /mL	なし
Haemophilus influenzae	ATCC	9006	5.71E+02	CFU/mL	なし
Legionella pneumophila	ATCC	33152	1.00E+03	CFU/mL	なし
Bordetella pertussis, H898	ATCC	BAA-2702	1.43+03	CFU/mL	なし
Mycoplasma pneumoniae	DSMZ	DSM 23978	不明 (Ct: 21) <sup>[d]</sup>	—	なし
Respiratory syncytial virus (RSV A), A2	ATCC	VR-1540	3.14E+06	PFU/mL	なし
Respiratory syncytial virus (RSV B), Strain: CH93 (18) -18	ZeptoMetrix	0810040CFHI	3.26E+05	TCID <sub>50</sub> /mL (熱不活化前)	なし
SARS-Coronavirus, HKY39849 <sup>[b]</sup>	European Virus Archive-GLOBAL (以下EVAg)	011N-03868	不明 (Ct: 18) <sup>[c]</sup>	—	なし
MERS-Coronavirus <sup>[b]</sup>	EVAg	011N-03868	不明 (Ct: 29) <sup>[c]</sup>	—	なし
Mycobacterium tuberculosis <sup>[d]</sup>	Vircell	MBC034	1.00E+06	cop/mL	なし
Human coronavirus 229E	EVAg	011N-03868	不明 (Ct: 30.3) <sup>[a]</sup>	—	なし
Human coronavirus HKU1	Discovery Life Science (DLS)	DLS0085250	不明 (Ct: 14.9) <sup>[a]</sup>	—	なし
Influenza A <sup>[b]</sup>	Vircell	MBC028	1.00E+06	cop/mL	なし
Streptococcus salivarius	DSMZ	DSM20560	5.91E+07	cop/mL	なし
Staphylococcus epidermidis	DSMZ	DSM20044	8.05E+06	cop/mL	なし
Legionella sainthelensi	DSMZ	DSM25322	2.29E+08	cop/mL	なし
Legionella spiritensis	DSMZ	DSM19324	4.08E+08	cop/mL	なし
Streptococcus pyogenes	DSMZ	DSM20565	6.82E+08	cop/mL	なし
Pneumocystis carinii (Pneumocystis jirovecii)	ATCC	PRA-159	1.64E+08	cop/mL	なし
Candida albicans	ATCC	ATCC-14053	2.99E+06	CFU/mL	なし
Pseudomonas aeruginosa	ATCC	ATCC-10145	3.10E+07	CFU/mL	なし

[a] Ct valueは FTD Respiratory pathogens 21 (CE-IVD) の測定結果です。

[b] RNA抽出液

[c] 検体供給者によるCt値です。

[d] DNA抽出液

TCID<sub>50</sub> = Median Tissue Culture Infectious Dose, cop/mL = copies per milliliter, CFU/mL = Colony-forming unit per milliliter, PFU/mL = Plaque-forming unit per milliliter

## ■ 用法・用量 (操作方法)

操作方法の詳細は機器の取扱説明書を参照ください。

### 1. 試薬の調製と取扱い

本品の保存条件は凍結のため融解後使用ください。

使用期限の過ぎた試薬は使用しないでください。

## 2. 必要な器具・器材・試料等

- 本品は次の製品とバリデーションがされています：リアルタイムPCR装置：Applied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステム（以下、Applied Biosystems 7500）（Thermo Fisher Scientific社）、核酸抽出装置：NucliSENS easyMAG（bioMérieux社）
- 抽出液：NucliSENS easyMAG（bioMérieux社製、ソフトウエアバージョン2.1以上）詳細については、bioMérieux社にお問い合わせください。
  - 注意：上記以外のリアルタイムPCR装置及び抽出液を使用する場合は、検査室ごとにバリデーションを行ってください。
- 可変式マイクロピペット：1000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、20  $\mu$ L及び10  $\mu$ L
- 単回使用・滅菌パック入りピペットチップ（エアロゾル混入防止タイプ）
- 単回使用パウダフリー手袋
- ボルテックスミキサー
- 卓上遠心機
- サンプルラック
- 検体採取器具、機材
- 漂白剤/Microcide（消毒剤）又は同等品
- 96ウェルPCRプレート、プレートシーラー
- 試験管（調製する液量に応じて1.5 mL又は2.0 mL）

## 3. 抽出法

NucliSENS easyMAG SystemによるRNAの抽出方法を示します。これ以外の方法で抽出を実施する場合は、各施設でバリデーションを実施ください。

- NC及びICを融解します。
- 使用前にその他の試薬を室内温度（15～30℃）に戻します。NC及びICをボルテックスで混合し、静置します。
- 検体を抽出処理します（必要な場合は、検体を融解し、室内温度に戻してから行います）。
  - バリデーションされた液量は、検体 200  $\mu$ L、抽出溶液 55  $\mu$ Lです。
- 検体及びNCを容器に入れます。
- 機器の操作に従い、処理を進めます。
- Lysis Bufferを分注するために、DISPENSE LYSISを選択し、インキュベーションステップに進みます。インキュベーションの間に、手順に従いビーズの準備をします。
- インキュベーションが終了したら、Lysis Bufferと検体の混合液にICを2  $\mu$ L添加します。
- ビーズを各ウェルに添加し、抽出を開始します。

注意：

- Lysis Bufferの添加前にICを添加しないでください。
- 抽出後にICを添加しないでください。
- 核酸増幅阻害と同様に各検体及びNCにICを添加することは、核酸の抽出をモニターする上で重要なステップです。
- SCoV2 PCは抽出しないでください。

## 4. RT-PCR

Applied Biosystems 7500によるRT-PCRの実施方法を示します。これ以外の方法で操作を実施する場合は、各施設でバリデーションを実施ください。

- 使用前に、本品を完全に融解し、ボルテックスで混合を行い静置します。
  - 特記事項：
    - 25x RT-PCR Enzymeは-30～-10℃で保存するか、常にクーリングブロックで保存ください。
    - PCは、室内温度（15～30℃）に20～30分置き、使用前にボルテックスで十分に混合します。

表 4 試薬量

試薬	反応数			
	1	10	32	96
2x RT PCR Buffer	12.5 $\mu$ L	125 $\mu$ L	400 $\mu$ L	1200 $\mu$ L
SCoV2 PP Mix	1.5 $\mu$ L	15 $\mu$ L	48 $\mu$ L	144 $\mu$ L
25x RT PCR Enzyme	1 $\mu$ L	10 $\mu$ L	32 $\mu$ L	96 $\mu$ L
合計	15 $\mu$ L	150 $\mu$ L	480 $\mu$ L	1440 $\mu$ L

- SCoV2 PP Mix用に2 mL試験管を用意し、ラベルをします。2x RT-PCR Bufferを表4を参照し必要量を分取し試験管に分注します。
- SCoV2 PP Mixを表4を参照し必要量を分取し、2x RT-PCR Buffを分注した試験管に加え混合します。
- SCoV2マスターミックスの準備

注意：

- 25x RT-PCR Enzymeを分注する際には、正確な量を分取するために、機材の洗浄を避け、ピペットチップ全体を液に浸さないでください。
- 泡立ちを避けるために、分注操作は丁寧に実施ください。
- 分注前に容器の端にチップをつけて、ピペット先端の余分な液を除去ください。

・ピペッティング操作ごとにチップを交換ください。

- 25x RT-PCR Enzymeを表4を参照し必要量をピペットで分取し、SCoV2 PP Mix及び2x RT-PCR Bufferを含む試験管に分注します。
- 上記の溶液（SCoV2マスターミックス）をボルテックスでミキシングし、静置します。
- SCoV2マスターミックスは速やかに使用し、使用後の残りは保存しないでください。

## 96-ウェルプレートの準備（Applied Biosystems 7500用）

注意：性能の評価をするために、SCoV2マスターミックスごとにPC及びNCをセットください。

下図を参考に検体とコントロールをセットください。

図 1 検体とコントロールのプレートマップ例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample 1											
B	Sample 2											
C	Sample 3											
D	Sample 4											
E	Sample 5											
F	Sample 6											
G	PC											
H	NC											

グレーの部分はSCoV2マスターミックス（A1～H1）、PC（G1）、NC（H1）

- 96-ウェルのプレートを準備し、SCoV2マスターミックスをピペットで分取し、ウェル（A1～H1）に15  $\mu$ L分注します。
- 検体抽出液をウェル（A1～F1）に10  $\mu$ L分注します。
- PCをウェル（G1）に10  $\mu$ L分注します。
- NCをウェル（H1）に10  $\mu$ L分注します。
- プレートを適切なフィルムで覆います。
- プレートを穏やかにボルテックスで混合し、短時間遠心します。
- プレートをApplied Biosystems 7500に装填します。

注意：詳細は、Applied Biosystems 7500の取扱説明書を参照ください。

## サーマルサイクラーの設定

下表は、本品に使用されている色素の検出波長です。

表 5 検出設定

SCoV2 PP Mixとサーマルサイクラーの検出設定

病原体	色	検出波長 (nm) [a]
SARS-CoV-2	緑	520
—	黄色	550
—	オレンジ	610
IC (EAV)	赤	670

[a]は、Applied Biosystems 7500の検出波長で機種により検出波長は異なります。

注意：2つの測定対象物（N gene及びORF1ab）は、同じ色素で標識しているため、同じチャンネル内で検出されます。

注意：パッシブプリファレンス色素は設定をNONEにします（デフォルトによりROX色素が選択されています）。

## PCRの設定

サーマルサイクラーの設定は以下のとおりです。

Stage	Cycle	Acquisition	Temperature	Time
Hold	—	—	50℃	15分
Hold	—	—	94℃	1分
Cycling	40	—	94℃	8秒
		Yes	60℃	1分

詳細については、以下のウェブサイトを参照ください。

[www.fast-trackdiagnostics.com](http://www.fast-trackdiagnostics.com)

## 測定の終了

サーマルサイクラーの取扱説明書に従い、PCRプレートを取り出します。結果を確認し、PCRプレートをバイオハザードとして規制に従い廃棄します。



## 有効な測定基準

- 以下の基準を満たす場合は、結果を有効とし、患者の結果を報告します。
- 1.IC用を除くNCは増幅が現れません。ICは<Ct33でなければなりません。NCについて、検出チャンネル中に増幅がないことを目視で確認します。汚染の可能性がある場合は（検出チャンネル中にカーブが出現）、結果は解釈せずに抽出も含めて全行程をやり直して再測定ください。
  - 2.すべてのPCの結果は、陽性を示す指数関数的な増幅を示さなければなりません。PCは<Ct33です。
  - 3.ICについてすべての検体とNC（又は各抽出液）は増幅が出現しなければなりません。ICは<Ct33です。

## ■ 測定結果の判定法

測定結果の算出方法の詳細については、機器の取扱説明書を参照ください。

### 1.結果の判定法

結果の単位はcycle threshold (Ct) です。下表に従い結果の判定をします。

表 6 結果の判定方法

検体/コントロール	SARS-CoV-2	IC	結果	判定
患者検体	陰性	Ct<33	有効	SARS-CoV-2 未検出
	陰性	Ct≥33	有効でない	結果は無効のため要再検
	陰性	検出せず	有効でない	結果は無効のため要再検
	陽性	Ct<33	有効	SARS-CoV-2 検出
	陽性	Ct≥33	有効でない	結果は無効のため要再検
	陽性	検出せず	有効でない	結果は無効のため要再検
NC	陰性	Ct<33	有効	測定は有効
	陰性	Ct≥33	有効でない	抽出/増幅の過程でエラー発生
	陰性	検出せず	有効でない	抽出/増幅の過程でエラー発生
PC	Ct<33	非該当	有効	測定は有効
	Ct≥33	非該当	有効でない	増幅の過程でエラー発生
	検出せず	非該当	有効でない	増幅の過程でエラー発生

結果は、Cycle threshold (Ct値) で表示されます。

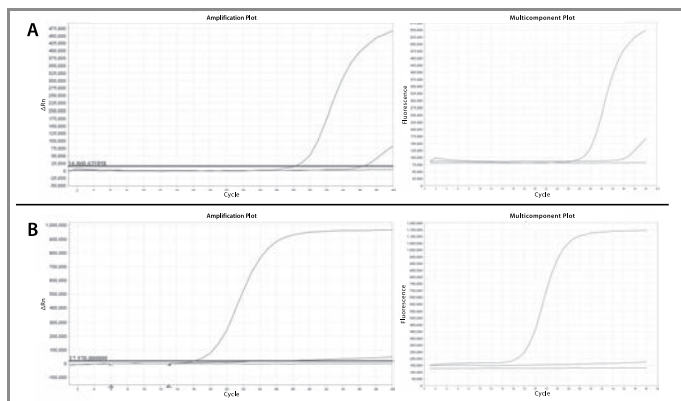
上記の条件をすべて満たし、患者検体の結果が指数関数的な増幅を示す場合は、SARS-CoV-2陽性と考えられます。指数関数的な増幅が現れない場合は、検出に十分な核酸が検体中に存在しなかったことを意味します。すべての抽出液（患者検体及びNC）についてICの結果は陽性でなければなりません。

以下の情報はベースラインの設定及びマルチコンポーネントプロットに重要です。

### ベースラインの設定及びマルチコンポーネントプロット

増幅カーブのベースラインは、PCRに影響を与えるパラメーターの一つです。ベースラインの設定が不適切な場合、増幅がなくてもCt値が表示されます。(図2)は、増幅あり(A)と不適切なベースライン設定により増幅が起きていない(B)のCt値が表示されています。

図 2 増幅が見られる場合 (A) と不適切なベースライン設定 (B) の比較



増幅が見られたかを判断する前に常にマルチコンポーネントプロットとベースラインが適切に設定されたかを確認してください。マルチコンポーネントプロットは、各色素の波長分布を示し、シグナルがスパイク、ディップ又は突発の変化であるかを調べるのに役立ちます。ベースラインの適切な設定については、弊社にお問合せください。

## 3.判定上の注意

- 本電子添文に記載の検体の保存及び輸送に関する記載は推奨事項です。検体の採取法と取扱いについて、検証したデータはありません。
- 本品は検出試薬であり、測定対象病原体についての定量値を報告するものではありません。Ct値と測定対象物の病原体の量に相関するものではありません。
- 本品には、検体輸送培地としてRemel M4RTは推奨しません。
- 患者の要因により偽陰性、偽陽性、無効な結果となる例：抗ウイルス薬による治療中、患者の年齢、呼吸器感染症に関する病歴、症状の状態、感染状況。
- 本品はRT-PCRの手法及びFTD製品についてトレーニングを受けた人の使用に限定してください。
- 本品の性能は、本電子添文に従って操作した場合に達成されます。使用方法の変更により、性能が変わることがあります。
- 本品の性能は、ヒト検体測定に限定されます。
- 本品の結果だけで治療を決定しないでください。上述したような要因により結果は影響を受けます。陰性結果は、測定対象病原体の存在を否定するものではありません。
- 信頼できる結果を得るためには、適切な検体採取、検体、試薬の輸送及び保存、試験の手順、これらすべてが適切であることが要件となります。これらが条件を満たさない場合は、結果は不適切となり偽陽性及び偽陰性の要因となります。
- 定量限界未満のウイルス量でも検出されることがありますが、このような結果は反復しない場合があります。
- 本品の測定対象病原体が領域で変異を起こし、試薬中のプライマーとプローブの組み合わせではウイルスを検出できない場合があります。
- 本品の性能試験で検討した特定の妨害物質（交差反応性物質）以外の妨害物質により測定対象病原体の検出に影響が生じる可能性があります。

## ■ 臨床的意義

世界保健機関 (WHO) は、2019年12月に中国湖北省武漢市で複数の原因不明の肺炎患者が確認されたことを報告しました。その後すぐにヒトから初めて新しいコロナウイルスに類別されるSARS-CoV-2が特定され、COVID-19と呼ばれる新しい病気が原因であることが確認されています。2020年1月30日には、WHOは国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態宣言を発令しました。それ以降、感染は急激に広がり、世界各国でアウトブレイクが起こり、パンデミックをもたらすに至ります。

COVID-19の初期症状は多岐に渡ります。鼻水、頭痛、筋肉の痛み、倦怠感を覚える場合があります。感染から2〜3日後に、しばしば、発熱、咳、呼吸器徴候が起こり、肺炎や死につながることもあります。患者のうち重度の臨床症状を呈する約20%が入院、約5%が集中管理治療を必要とします。また、高齢者 (>70歳) 又は基礎疾患を持つ患者で重症化し易いことが確認されています。しかしながら、感染をしても、感染者のうち約30〜60%においては、無症候性又は軽い症状です。呼吸器挿入期間の平均日数は5日 (2〜12日) です<sup>4</sup>。発症間隔 (serial interval: 1人 (感染源) が発症し、2次感染者の発症までの期間) は約4日です。これは、呼吸器挿入期間の中央値より、COVID-19の発症間隔は、短いということになります。2次感染者発症より前に感染を伝播させている可能性が高いことを示唆しています<sup>5,6</sup>。この静かなる伝播がパンデミックを扱いにくいものとし、さらに急速に広まることになりました。

本品は、COVID-19が疑われる症候性又は無症候性患者から採取した生体試料中のSARS-CoV-2のORF1ab及びN geneの検出を目的とした半自動の核酸増幅試験です。

本品は、SARS-CoV-2の診断補助を目的とする試薬です。

### 病原体 (新型コロナウイルスSARS-CoV-2)

コロナウイルスは、一本鎖プラス鎖RNAゲノムを有する被包性ウイルスの科に属し、動物及びヒトに対する病原性を有します。通常見られるアルファコロナウイルス (AlphaCoV) 及びベータコロナウイルス (BetaCoV) のように軽度の気道感染を起こすウイルス、急性呼吸器症候群 (SARS)、中東呼吸器症候群 (MERS)、COVID-19のように重篤な感染症を引き起こすウイルスが知られています。COVID-19の原因ウイルスであるベータコロナウイルス属のSARS-CoV-2は、2020年1月にヒトで初めて確認されました。感染経路は、まだ研究中です。SARS-CoV-2については、コウモリが宿主であろうと考えられていますが、新規のヒトウイルスについては、センザンコウ (マレーセンザンコウ) が中間宿主である可能性が研究されています<sup>7</sup>。ヒト間ヒトの伝播は、飛沫又は接触で起こります<sup>8</sup>。本品は、SARS-CoV-2に特異的な2種の異なる遺伝領域を検出します。

## ■ 性能

### 1. 性能

■用法及び用量欄の操作方法により、各試験を行った場合、下記の規格値に適合します。

#### (1) 感度試験

SCoV2陽性コントロール (SCoV2 PC) を3回試験するとき、結果は陽性 (Ct<33) を示します。

#### (2) 正確性試験

SCoV2陰性コントロール (Negative Ctrl) 及びInternal Ctrlを3回試験するとき、Negative Ctrlは陰性及びInternal CtrlはCt<33を示します。SCoV2陽性コントロール (SCoV2 PC) を3回試験するとき、結果は陽性 (Ct<33) を示します。

#### (3) 同時再現性

SCoV2陰性コントロール (Negative Ctrl) 及びInternal Ctrlを3回繰り返し試験するとき、Negative Ctrlは陰性及びInternal CtrlはCt<33を示します。

SCoV2陽性コントロール (SCoV2 PC) を3回繰り返し試験するとき、結果は陽性 (Ct<33) を示します。

### 2. 分析感度 (SARS-CoV2 RNA)

分析感度は、検体中の測定対象物を検出する能力です。95%以上の確率で測定対象物を検出する最低濃度を検出限界 (LoD) と定義しました<sup>9</sup>。LoDは濃度既知のSARS-CoV-2 (BetaCoV/Germany/BavPat1/2020 p.1) のRNA抽出液を段階希釈して決定しました。プロビット回帰分析 (PROBability unITS) により、LoDは1155コピー/mL (95%信頼区間854~1508コピー/mL) とされました。

さらに、プロビット回帰分析で算出されたLoDを、別ロットのプライマー及びプローブミックス (PP mix) で検証しました。定義した上限LoDと同濃度の検体を24測定しました。この実験は、2名の操作者、2台の機器、PP mix1ロット試薬、2日間で行いました。この結果95%LoDは、11.5コピー/テストに相当する1155コピー/mLと定義されました。

### 3. 分析感度 (SARS-CoV2 ウイルス株)

LoDを決定するために、米国人患者から単離された既知ウイルス株 (USA-WA1/2020、ZeptoMetrix、品番0810587CFHI) 疑似呼吸器系マトリクス (SRM) を用いて段階希釈しました。

予備試験において、2倍希釈系列で調整した既知SARS-CoV-2ウイルス株を測定し、暫定的なLoDを設定しました。暫定的なLoDはプロビット回帰分析により算出しました。このプロビット分析により設定したLoDを、NucliSENS easyMAG extraction system及びApplied Biosystems 7500 real-time thermocyclerを用いて検証しました。

LoD濃度のウイルス株をSRM (ESwab Liquid Amies輸送培地 (COPAN社製)) に添加し、23検体を調製しました。各検体を一度抽出し (検体200 µL、抽出液55 µL)、3ロット試薬で1回測定しました。測定結果は以下のとおりです。

表 7 分析感度の結果

PP Mix Lot	LoD (TCID <sub>50</sub> /mL)	テスト数	総検出数	検出率 (%)	平均Ct	SD
1	0.0023	23	22	95.7	38.0	0.9
2	0.0023	23	23	100.0	37.4	0.9
3	0.0023	23	22	95.7	37.4	0.8

TCID<sub>50</sub>/mL = Median tissue culture infectious dose per milliliter, PP = Primer and probe, Ct = Cycle threshold, SD = Standard deviation

プロビット分析により決定した検出感度97.85%における本品のLoDは、0.0023 TCID<sub>50</sub>/mLです。

### 4. 特異度

本品の測定性能を示します<sup>9</sup>。分析特異度は以下のとおりです。

- ・交差反応性：測定対象病原体 (特定されている場合は関連するサブタイプを含む) を特異的に検出し、検体に含まれるその他の生物由来物質を検出しない能力。
  - ・特異度：陰性検体を測定した際に、偽陽性を示さない能力。
- 本品の分析特異度は、*in vitro*及び*in silico*でバリデーションを実施しました。

### 5. 陰性検体の検討

非特異的な増幅を検証するために、陰性検体 (陰性コントロール抽出液、陰性臨床検体抽出液又はテンプレートなしコントロール) を試験した結果を下表に示します。試験の結果、特異度は100%でした。

表 8 陰性検体の結果

病原体	検体	陽性	総反応	陰性一致率 (%)	信頼区間 (CI) (%)
SARS-CoV-2	陰性臨床検体	0	50	100	92.89~100.00
	陰性コントロール	0	39	100	90.97~100.00
	陰性コントロール (テンプレートなし)	0	38	100	90.75~100.00
	合計	0	127	100	97.14~100.00

### 6. 包括性試験 (反応性試験)

包括性試験 (反応性試験) とは、測定対象病原体に近い数種類のウイルス株、種、属の数種類についての検出性能を指します。

包括性試験は、測定対象物についてNCBI Nucleotide collection及びGlobal Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) database (<https://www.gisaid.org/>) で公開されている全シークエンスについて*in silico*分析により実施しました。

計87191シークエンス (GenBankが7753 (2020年7月2日)、GISAIDが79438 (2020年8月24日)) の情報を取得しました。アンプリコンを増幅するかを確認するために、シークエンスについて本品のプライマーとプローブのマッピングをしました。動物由来の不完全シークエンスと完全シークエンスは除外しました。これにより、N gene領域の892シークエンス、ORF1ab領域の207シークエンスを除外しました。

不完全な組み合わせでもペアリングとアンプリコンを産生する場合はほとんどなため、プライマーとプローブのマッピングを実施した際に、オリゴ (プライマー及びプローブ) と対象とするシークエンス間で4つのミスマッチを許容可としました。

・シークエンスの一致から調査したGen BankデータベースのSARS-CoV-2 N geneは、100%検出しました。なお、99.21%のシークエンスはミスマッチなく検出され、0.79%のシークエンスはミスマッチ1でした。

・シークエンスの一致から調査したGISAIDデータベースのSARS-CoV-2 N geneは、100%検出しました。なお、99.21%のシークエンスはミスマッチなく検出され、0.79%のシークエンスはミスマッチ1でした。

・シークエンスの一致から調査したGen BankデータベースのSARS-CoV-2 ORF1abは、100%検出しました。なお、99.49%のシークエンスはミスマッチなく検出され、0.51%のシークエンスはミスマッチ1でした。

・シークエンスの一致から調査したGISAIDデータベースのSARS-CoV-2 ORF1abは、100%検出しました。なお、99.49%のシークエンスはミスマッチなく検出され、0.51%のシークエンスはミスマッチ1でした。

デュアルターゲット調査において、どちらの分析結果も全シークエンスのうちミスマッチが見られたのは9シークエンスだけでした。これらのミスマッチは、検出に大きな影響はなく性能に影響しないと考えられます。結果は下表のとおりです。

表 9 包括性試験の結果

試薬	データベース	完全ゲノム検査数	完全ゲノム検出数	検出率 (%)
SARS-CoV-2 (N gene)	GISAID	78945	78945	100
	GenBank	7354	7354	100
SARS-CoV-2 (ORF1ab)	GISAID	79273	79273	100
	GenBank	7711	7711	100

### 7. 精度

小分けしたシングルホモジネート検体を繰り返し試験した再現性を精度としています。精度は、LoD以上の検体を用いて併行精度 (repeatability) と再現性 (reproducibility) により評価しました。併行精度は全く同じ条件で実施し、再現性は異なる条件 (操作者、サイクル等) で実施しました。各試験結果は、測定の不精密性 (標準偏差及び変動係数) について解析し算出しました。

市販の既知RNA濃度の検体を用いて、本品及びApplied Biosystems 7500により試験をしました。試験は、複数回測定、数日間の試験結果を行いました。測定は1ロット試薬を用い、異なる操作者及び異なるサイクル数で行いました。試験の結果は下記のとおりです。

表 10 精度の結果

検体	N	併行精度 SD	再現性 SD	併行精度 CV (%)	再現性 CV (%)
SARS-CoV-2	23	0.80 (0.61~1.15)	0.95 (0.64~1.79)	2.10 (1.61~3.03)	2.49 (1.69~4.71)

N: 検体数, SD: 標準偏差, CV: 変動係数

### 8. 臨床性能試験

・相関性試験 (対照品: SARS コロナウイルス核酸キット)  
鼻咽喉頭ぐい液の陽性44検体及び陰性30検体を用いて、本品と対照品 (SARS コロナウイルス核酸キット) の結果を比較しました。陽性一致率は100% (95%信頼区間 (CI): 91.96~100%)、陰性一致率は100% (95%信頼区間 (CI): 88.43~100%) でした。


表 11 SARS コロナウイルス核酸キットとの相関試験結果

	対照品		陽性一致率% (95%CI)	陰性一致率% (95%CI)
	陽性	陰性		
本品	陽性	44	100% (91.96~100)	100% (88.43~100)
	陰性	0	30	

## ■ 使用上又は取扱い上の注意

### 1. 取扱い上の注意

- 本品は、PCRの手法についてトレーニングされた人の使用に限定ください。
- 一般的な推奨事項に従いすべての試薬を取扱ってください。
- 患者検体：飛散した場合は、0.5%次亜塩素酸ナトリウム（1:10 v/v 漂白剤）又は同等品で消毒ください。
- 本品：飛散した試薬の消毒には、Microcide SQ（消毒剤）又は同等品をご使用ください。漂白剤は使用しないでください。
- 汚染したものはバイオハザードとして取扱ってください。
- 感染予防措置を講じてください。すべての検体は感染性があるものとして取扱ってください。
- 操作中は、単回使用の手袋を含む防護服を装着してください。手袋を脱着後は手をよく洗い、手袋はバイオハザード廃棄物として廃棄ください。
- キャリアオーバーのリスクを最小限にするために、手袋は頻繁に交換ください。
- 本品及び検体を取扱うところで、飲食、喫煙又は化粧をしないでください。
- 口によるピペッティングを行わないでください。
- 特定の温度において明らかな懸濁又は濁りが見られた場合、その試薬は使用しないでください。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- バイアルや瓶のふたを交互に使用すると、汚染の原因となりますので行わないでください。
- 先の尖ったものの使用を可能な限り避けてください。
- 皮膚又は粘膜への曝露があった場合は、直ちに大量の水で洗浄し、診察を受けてください。
- ピペットや機器は注意して取扱い、それらの使用説明書に従って使用ください。
- 試薬と検体の汚染が起きないように注意ください。
- 滅菌済フィルター付きピペットチップを使用し、分注ごとに新しいチップを使用ください。
- 異なるロットの試薬を混ぜて使用しないでください。
- バイオハザードや生物学的な汚染のある物質は、施設の基準に従い廃棄ください。すべての検体は、廃棄の基準に従い安全に廃棄ください。
- すべての検体は感染のおそれのあるものとして取扱ってください。
- 感染予防に関する規制に従い、単回使用の手袋を含む防護服を着用ください。手袋を外した後は手洗いをよくし、バイオハザード廃棄物の廃棄を行ってください。
- ICは溶血バッファーを含有しています。
- 次の試薬に関する危険有害性情報、注意事項を示します。

	ICはマレイン酸（0.1% [w/w]）を含有しています。	
	H317	アレルギー性皮膚反応を起こすおそれがあります。
	P280	保護手袋、保護衣、保護用眼鏡及び顔防護マスクを着用ください。
	P302+P352	皮膚に付着した場合、石けんと多量の水で洗ってください。
	P333+P313	皮膚に炎症又は発疹が生じた場合、医師の診断/手当てを受けてください。
	P362+P364	汚染された衣類を脱ぎ、再使用する場合には洗濯してください。

### 2. 使用上の注意

- 本品は、個包装に入れたままの未開封の状態で-30~-10℃で保存した場合、箱に記載の使用期限まで使用できます。
- 本品は使用後に速やかに凍結ください。凍結融解は10回まで可能です。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

- 使用中に発生する可能性のある事象と是正措置の一例を下表に示します。

表 12 エラーと是正措置

事象	可能性のある原因	是正措置
PCが増幅されない	サーマルサイクラー温度設定が不適切	取扱説明書で温度設定を参照
	PCR測定の設定が不適切	<ul style="list-style-type: none"> <li>試薬を適切な順に添加したかの確認</li> <li>ピペットの較正確認</li> </ul>
	陽性コントロールの不適切な取扱い	<ul style="list-style-type: none"> <li>液量が不十分、ボルテックスの未実施、又は室内温度での融解が不適切</li> </ul>
ICのシグナルが弱い又は全くない	PCRの操作がプロトコルに沿っていない	<ul style="list-style-type: none"> <li>抽出が確実であり、増幅が取扱説明書に従っていたかを確認。必要に応じて測定を繰り返す</li> <li>エラーが続く場合は、検体中の妨害物質の存在を検討する</li> </ul>
	ICの増幅が阻害された又はICの抽出が不十分であった	
	ウイルス量が高値の場合、ICのシグナルが干渉して判定無効になる可能性がある	検体希釈を検討し、再測定実施
NCで増幅が発生	PCRプレートのセットアップ中又は抽出中の汚染	<ul style="list-style-type: none"> <li>新しい検体及びコントロールで再測定</li> <li>新しい試薬で再度抽出</li> <li>PCの汚染を防ぐため、PCのピペッティングを最後に行う</li> <li>試験ごとに作業場と機器の除染実施</li> </ul>

### 3. 廃棄上の注意

- 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、使用済み器具等は、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度1,000 ppm、1時間以上浸漬）又はグルタルアルデヒド溶液（2%、1時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121℃、20分以上）による滅菌処理を行ってください。
- 試薬や検体等が飛散した場合には、拭き取り及び消毒を行ってください。
- 危険性のある試薬又は感染性廃棄物は、検査室の基準に従い廃棄ください。試薬及び器具等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い処理ください。

## ■ 承認条件

- 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。
- 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。

## ■ 貯蔵方法・有効期間

### 1. 貯蔵方法

-30~-10℃

### 2. 有効期間

24ヶ月

## ■ 包装単位

FTD SARS-CoV-2キット（品目コード：11416284）

SCoV2 PP Mix 96	96 reactions: 1 x 144 μL
SCoV2 PC 96	96 reactions: 1 x 150 μL
Negative Ctrl 96	96 reactions: 1 x 2000 μL
Internal Ctrl 96	96 reactions: 1 x 350 μL
25x RT-PCR Enz 96	96 reactions: 1 x 96 μL
2x RT-PCR Buff 96	96 reactions: 1 x 1200 μL

## ■ 主要文献

1. World Health Organization. (2020). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579 (7798) :270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
3. Liu P, Jiang JZ, Wan XF, et al. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathog*. 2020;16 (5) :e1008421. doi:10.1371/journal.ppat.1008421.
4. The Institut Pasteur website: <https://www.pasteur.fr/en/medical-center/disease-sheets/covid-19-disease-novelcoronavirus#symptoms>. Accessed March 2020.
5. Du Z, Xu X, Wu Y, Wang L, Cowling BJ, Meyers LA. Serial interval of COVID-19 among publicly reported confirmed cases. *Emerging Infectious Diseases*. 2020 Mar 19;26 (6). <https://doi.org/10.9601/eid2606.200357>.
6. Nishiura H, Linton NM, Akhmetzhanov AR. Serial interval of novel coronavirus (2019-nCoV) infections. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020 Mar 4;99:684–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.060>.
7. Lam TT, Shum MH, Zhu H, et al. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020 Mar 26. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>.
8. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19) : The epidemic and the challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020;55 (3). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays*. 2nd ed. CLSI guideline MM17. Wayne, PA: CLSI. 2018.

## ■ 問い合わせ先

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社  
カスタマーケアセンター  
電話 : 03-4582-5520

## ■ 製造販売元

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社  
東京都品川区大崎1-11-1 ゲートシティ大崎ウエストタワー

輸入