

4. 交差反応性

他のコロナウイルス、他の呼吸器疾患原因菌を含む下記31種について測定し、すべて陰性を示すことを確認しました。

ウイルス名	ウイルス名
Human coronavirus 229E	MERS coronavirus
Human coronavirus OC43	SARS coronavirus
Adenovirus	Respiratory syncytial virus (RSV)
Parainfluenza virus 1	Rhinovirus
Parainfluenza virus 2	Herpes simplex virus
Parainfluenza virus 3	Human metapneumovirus
Parainfluenza virus 4	

菌名	菌名
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

5. 重複感染による競合阻害

1つのターゲットウイルス RNA を高濃度 (1テストあたり 8×10^5 コピー)、他方 2 つのウイルス RNA を 1 テストあたり最小検出感度 (LOD) の 1 倍濃度 (SC2 RNA: 25 コピー、FluA RNA および FluB RNA: 50 コピー) に調製し、重複感染検出として、4 回測定を実施しました。その結果、低濃度のターゲットウイルスにおいても、すべて陽性として検出されました。重複感染による競合阻害は、認められませんでした。

RNA 添加条件			判定結果 (陽性数/全体数)		
高濃度 ウイルス RNA (8×10^5 コピー /テスト)	低濃度 ウイルス RNA (1 × LOD/テスト)		SC2	FluA	FluB
SC2	FluA	—	4/4	4/4	0/4
	—	FluB	4/4	0/4	4/4
	FluA	FluB	4/4	4/4	4/4
FluA	SC2	—	4/4	4/4	0/4
	—	FluB	0/4	4/4	4/4
	SC2	FluB	4/4	4/4	4/4
FluB	SC2	—	4/4	0/4	4/4
	—	FluA	0/4	4/4	4/4
	SC2	FluA	4/4	4/4	4/4

6. SARS-CoV-2 変異株に対する検出性能

以下に示す SARS-CoV-2 変異株において、ウイルス RNA を 1 反応当たり 1 × LOD (25 コピー) に調製し、4 回測定を実施しました。その結果、いずれの変異株においても、すべて陽性として検出されました。

SARS-CoV-2 変異株名	判定結果 (陽性数/全体数)
	SC2
α 株 (B.1.1.7 系統)	4/4
β 株 (B.1.351 系統)	4/4
δ 株 (AY.1 系統)	4/4
ο 株 (B.1.1.529 系統)	4/4

7. コンタミネーションの防止

本品は、ウラシル-N-グリコシラーゼ (UNG) が酵素液に含まれており、PCR 増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性判定を抑制することができます。しかし、大量の PCR 増幅産物による汚染やクロスコンタミネーションは防止できませんので、以下の事項を遵守してください。

(1) 個人防護具を着用してください。人体に付着した微生物や体液 (例えば

唾液、汗) の混入を防ぐため、また検体からの感染防止の観点からも個人防護具 (手袋、マスク、防護衣など) を着用して操作を行ってください。作業過程ごとの手袋着脱など、操作には細心の注意を払ってください。

(2) 検体の調製時に使用するマイクロピペットには、内部の汚染を防止するため、フィルター付きのチップを使用してください。

(3) 反応終了後の PCR 用容器の開閉は避けてください。

(4) 実験台や使用器具は次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 0.5% 以上) 等でよく清掃してください。

さらに、コンタミネーション防止のために、試料調製、試薬調製、リアルタイム PCR はエリア分けをして、物理的に隔離することをお薦めします。

【用法・用量 (操作方法)】

1. 必要な器具、器材など

- 個人防護具 (手袋、マスク、防護衣など)
- ボルテックスミキサー
- 小型遠心機 (スピンドアウン用)
- マイクロピペット及びフィルター付きチップ
- マイクロチューブ
- リアルタイム PCR 用容器 (8 連チューブ、96 穴プレートなど)
- 加熱処理用サーマルサイクラーまたはヒートブロック
- リアルタイム PCR 装置 (QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) など)
- 陽性コントロール (SC2、FluA、FluB RNA など)
- 陰性コントロール (滅菌蒸留水など)

2. リアルタイム PCR 装置の設定

リアルタイム PCR 装置の添付文書及び取扱説明書に従い、以下の通り、設定します。

・検出チャネル

	検出チャネル
SC2	Cy5 に相当するチャネル
FluA	ROX に相当するチャネル
FluB	HEX に相当するチャネル
IC	FAM に相当するチャネル

・PCR 反応液量

50 μL

・RT-PCR サイクル

ステップ	温度	時間	サイクル数	蛍光検出
1	42℃	5 分	1	なし
2	95℃	10 秒	1	なし
3	95℃	5 秒	45	なし
	60℃	30 秒		あり

3. 試薬の調製方法・操作方法

(1) 反応試薬の準備

- 前処理液、反応液、プライマー・プローブ液: 室温にて解凍し、ボルテックスミキサーにて攪拌後、スピンドアウンして使用する。
- 酵素液: そのまゝ用います。使用前にボルテックスミキサーにて攪拌し、スピンドアウンして使用する。

(2) 前処理方法

1) 精製 RNA の場合

- 前処理は不要です。精製 RNA 10 μL を次工程で使用する。

2) 簡易抽出を行う場合

- リアルタイム PCR 用容器に 3 μL の前処理液と 8 μL の検体を添加し、蓋をする。その後、室温で 5 分程度放置する。
- サーマルサイクラーまたはヒートブロックで 95℃、5 分加熱処理を行う (前処理済み試料)。

※加熱処理後は室温まで冷却し、速やかに次工程に移ってください。前処理済み試料を一時保存する場合は、氷上または 4℃ で保存してください。

(3) リアルタイム RT-PCR マスターミックスの調製

- 以下の組成で、マスターミックスを調製し、ボルテックスミキサーでよく混合する。

1 反応あたりの調製量	
反応液	30 μL
酵素液	5 μL
プライマー・プローブ液	5 μL
合計	40 μL

- 精製 RNA 10 μL もしくは、前処理済み試料 11 μL が入ったリアルタイム PCR 用容器に上記で調製したマスターミックス 40 μL を添加し、蓋をする。
- ボルテックスミキサーでよく混合後、スピンドアウンする。

※マスターミックス 40 μL に前処理済み試料 11 μL、もしくは精製 RNA

10 μ L を添加する方法でも調製は可能です。

(4)リアルタイム RT-PCR

- リアルタイム PCR 用容器をリアルタイム PCR 機器にセットし、測定を開始する。

精度管理のため、陽性コントロール、陰性コントロールを同時に測定してください。

陽性コントロール例

SC2:「Twist Synthetic SARS-CoV-2 RNA Control 1(MT007544.1)

(Twist Bioscience, Code. 102019)」

FluA:「Twist Synthetic Influenza H1N1 (2009) RNA Control

(Twist Bioscience, Code. 103001)」

FluB:「Twist Synthetic Influenza B RNA Control

(Twist Bioscience, Code. 103003)」

陽性コントロールは滅菌蒸留水で2500倍希釈したもの(400コピー/μ L)10 μ L、陰性コントロールは滅菌蒸留水 10 μ L を、3.(3)のマスターミックス 40 μ L と混合し、リアルタイム RT-PCR を実施します。陽性コントロールが陰性を示した場合、又は陰性コントロールが陽性を示した場合は再測定を行ってください。

【測定結果の判定法】

1.判定方法

使用したリアルタイム PCR 装置の添付文書及び取扱説明書に従い解析を実施し、Ct 値を算出します。算出された Ct 値またはそれに相当する数値が 40 以下であれば「+」、40 より大きい又は検出されない場合を「-」として、以下の判定方法に従って陽性/陰性を判定します。判定無効の場合、再測定を行ってください。

測定結果				判定		
Cy5 (SC2)	ROX (FluA)	HEX (FluB)	FAM (IC)	SC2	FluA	FluB
+	-	-	+	陽性	陰性	陰性
-	+	-	+	陰性	陽性	陰性
-	-	+	+	陰性	陰性	陽性
-	+	+	+	陰性	陽性	陽性
+	-	+	+	陽性	陰性	陽性
+	+	-	+	陽性	陽性	陰性
+	+	+	+	陽性	陽性	陽性
-	-	-	+	陰性	陰性	陰性
上記以外				判定無効		

※判定はリアルタイム PCR 装置上では表示されません

2.判定上の注意

本品で陰性と判定されても必ずしも SC2, FluA, FluB の存在を否定するものではありません。検体中に標的となる RNA が存在しても、最小検出感度以下になった場合は陰性と判定されますのでご注意ください。

(1)以下の場合、正常に測定できないことがありますのでご注意ください。

- 検体調製が不十分で、ウイルスのロスまたは RNA の分解が生じている検体を使用した場合
 - 保管方法が適切に行われていないもしくは有効期限が過ぎている試薬を使用した場合
 - 保存が適切に行われていない検体を使用した場合
- (2)プライマーおよびプローブは、比較的変異が少ない遺伝子領域をターゲットにしていますが、ウイルスの変異により、本品での検出感度が低下し、正常に検出できなくなる可能性があります。
- (3)必ず増幅曲線の形状を確認してください。増幅曲線のベースラインの乱れを増幅曲線の立ち上がりで誤判定しないように注意してください。PCR 反応阻害等により増幅曲線の形状に異常が生じた場合、解析ソフトウェアのアルゴリズムが対応できないケースが稀に発生します。ソフトウェアの Auto 機能で適切な解析ができない場合には、ソフトウェアの手順書に従い Manual で解析パラメータの設定を行ってください。

【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す。また、冬季には SARS-CoV-2 とインフルエンザウイルスの同時流行が懸念されます。

本品は、簡易抽出法の採用により RNA の精製をすることなく、SC2、FluA、FluB RNA をリアルタイム RT-PCR 法により検出できます。標準的な PCR 検査法に比べて検査時間が大幅に短縮されます。また、内部コントロールを同時検出するため PCR 阻害による偽陰性判定を防止することができ、SARS-CoV-2 感染及びインフルエンザウイルス感染の診断の補助に有用と考えられます。

＜臨床性能試験成績＞

1.インフルエンザウイルス (擬似検体)

鼻咽頭ぬぐい液及び鼻腔ぬぐい液の陰性検体に FluA 又は FluB の分離培養株を 1 反応当たり 1×LOD (50 コピー)及び 2×LOD (100 コピー)となるようスパイクした擬似陽性検体各 33 例を本品の前処理法で処理し、測定を行いました。その結果、鼻咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液共に陽性一致率、陰性一致率は 100%となりました。

表 1. 鼻咽頭ぬぐい液 臨床評価結果

分離培養株	検体中の RNA の最終濃度	陽性率
A/California/08/2009 (H1N1) pdm09	100 コピー/テスト (2×LOD)	100% (33/33)
	50 コピー/テスト (1×LOD)	100% (33/33)
B/Wisconsin/1/2010	100 コピー/テスト (2×LOD)	100% (33/33)
	50 コピー/テスト (1×LOD)	100% (33/33)
陰性	-	0% (0/33)

表 2. 鼻腔ぬぐい液 臨床評価結果

分離培養株	検体中の RNA の最終濃度	陽性率
A/California/08/2009 (H1N1) pdm09	100 コピー/テスト (2×LOD)	100% (33/33)
	50 コピー/テスト (1×LOD)	100% (33/33)
B/Wisconsin/1/2010	100 コピー/テスト (2×LOD)	100% (33/33)
	50 コピー/テスト (1×LOD)	100% (33/33)
陰性	-	0% (0/33)

*2.SARS-CoV-2 (実検体)

以下に「TRexGene® SARS-CoV-2 検出キット」の試験成績を記載する。なお、本品と「TRexGene® SARS-CoV-2 検出キット」における使用酵素、バッファー成分、SARS-CoV-2 検出用プライマー・プローブ配列は同一である。

a.精製 RNA

鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、唾液又は鼻腔ぬぐい液を含む 302 検体(陽性 150 例、陰性 152 例)から「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 (国立感染症研究所)」に従って RNA を抽出精製しました。精製した RNA を「TRexGene® SARS-CoV-2 検出キット」と「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 (国立感染症研究所)」に従った RT-PCR 法で測定しました。その結果、鼻咽頭ぬぐい液の陽性一致率は 100%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 100%、喀痰の陽性一致率は 83.3%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 93.2%、唾液の陽性一致率は 100%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 100%、鼻腔ぬぐい液の陽性一致率は 100%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 100%となりました。使用した検体は RNA 濃度が 20 コピー以下のもの 22 検体、21~200 コピーのもの 21 検体を含んでいます。なお、判定が異なった検体については、いずれもウイルス量の少ない陽性検体で、検体の品質、及び最小検出感度付近の測定による影響が考えられます。

表 3. 鼻咽頭ぬぐい液 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (精製 RNA の測定時)

鼻咽頭ぬぐい液		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene® SARS-CoV-2 検出キット	陽性	38	0
	陰性	0	49
陽性一致率		100% (38/38)	
陰性一致率		100% (49/49)	
全体一致率		100% (87/87)	

表 4. 喀痰 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (精製 RNA の測定時)

喀痰		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene® SARS-CoV-2 検出キット	陽性	15	0
	陰性	3	26
陽性一致率		83.3% (15/18)	
陰性一致率		100% (26/26)	
全体一致率		93.2% (41/44)	

表 5. 唾液 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (精製 RNA の測定時)

唾液		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene [®]	陽性	26	0
SARS-CoV-2 検出キット	陰性	0	27
陽性一致率		100% (26/26)	
陰性一致率		100% (27/27)	
全体一致率		100% (53/53)	

表 6. 鼻腔ぬぐい液 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (精製 RNA の測定時)

鼻腔ぬぐい液		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene [®]	陽性	68	0
SARS-CoV-2 検出キット	陰性	0	50
陽性一致率		100% (68/68)	
陰性一致率		100% (50/50)	
全体一致率		100% (118/118)	

b. 前処理済み試料

鼻咽頭ぬぐい液、喀痰、唾液又は鼻腔ぬぐい液を含む 304 検体(陽性 152 例、陰性 152 例)を「TRexGene[®] SARS-CoV-2 検出キット」の前処理液で処理し、測定を行いました。本測定と、「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1(国立感染症研究所)」に従った、RNA 精製及び RT-PCR 法による測定を比較しました。その結果、鼻咽頭ぬぐい液の陽性一致率は 100%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 100%、喀痰の陽性一致率は 83.3%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 93.2%、唾液の陽性一致率は 100%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 100%、鼻腔ぬぐい液の陽性一致率は 98.5%、陰性一致率は 100%、全体一致率は 99.2%となりました。使用した検体は RNA 濃度が 20 コピー以下のもの 24 検体、21～200 コピーのもの 21 検体を含んでいます。なお、判定が異なった検体については、いずれもウイルス量の少ない陽性検体で、検体の品質、及び最小検出感度付近の測定による影響が考えられます。

表 7. 鼻咽頭ぬぐい液 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (前処理済み試料の測定時)

鼻咽頭ぬぐい液		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene [®]	陽性	40	0
SARS-CoV-2 検出キット	陰性	0	49
陽性一致率		100% (40/40)	
陰性一致率		100% (49/49)	
全体一致率		100% (89/89)	

表 8. 喀痰 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (前処理済み試料の測定時)

喀痰		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene [®]	陽性	15	0
SARS-CoV-2 検出キット	陰性	3	26
陽性一致率		83.3% (15/18)	
陰性一致率		100% (26/26)	
全体一致率		93.2% (41/44)	

表 9. 唾液 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (前処理済み試料の測定時)

唾液		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene [®]	陽性	26	0
SARS-CoV-2 検出キット	陰性	0	27
陽性一致率		100% (26/26)	
陰性一致率		100% (27/27)	
全体一致率		100% (53/53)	

表 10. 鼻腔ぬぐい液 既存法(RT-PCR 法)との一致率 (前処理済み試料の測定時)

鼻腔ぬぐい液		既存法(RT-PCR 法)	
		陽性	陰性
TRexGene [®]	陽性	67	0
SARS-CoV-2 検出キット	陰性	1	50
陽性一致率		98.5% (67/68)	
陰性一致率		100% (50/50)	
全体一致率		99.2% (117/118)	

【性能】

1.性能

(1) 感度試験

- 1) 自家管理陽性試料(SC2)を測定するとき、SC2 陽性を示す。
- 2) 自家管理陽性試料(FluA)を測定するとき、FluA 陽性を示す。
- 3) 自家管理陽性試料(FluB)を測定するとき、FluB 陽性を示す。

(2) 正確性試験

- 1) 自家管理陰性試料を測定するとき、陰性を示す。
- 2) 自家管理陽性試料(SC2)を測定するとき、SC2 陽性を示す。
- 3) 自家管理陽性試料(FluA)を測定するとき FluA 陽性を示す。
- 4) 自家管理陽性試料(FluB)を測定するとき FluB 陽性を示す。

(3) 同時再現性試験

- 1) 自家管理陰性試料を 4 回同時に測定するとき、すべて陰性を示す。
- 2) 自家管理陽性試料(SC2)を 4 回同時に測定するとき、すべて SC2 陽性を示す。
- 3) 自家管理陽性試料(FluA)を 4 回同時に測定するとき、すべて FluA 陽性を示す。
- 4) 自家管理陽性試料(FluB)を 4 回同時に測定するとき、すべて FluB 陽性を示す。

(4) 最小検出感度 (QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System 測定)

- SC2 : 25 コピー/テスト
FluA : 50 コピー/テスト
FluB : 50 コピー/テスト

2. 校正用基準物質

本品の校正用基準物質には SC2 の Nucleocapsid protein 遺伝子を含む RNA、FluA の Matrix protein 遺伝子を含む RNA 及び FluB の nonstructural protein 遺伝子を含む RNA を使用しています。

【使用上又は取扱上の注意】

1. 取扱上の注意

- (1) 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全管理規定に従って取扱ってください。
- (2) 検体を取扱う時は、個人防護具(手袋、マスク、防護衣など)を着用し、検体を吸い込んだり体に付着したりすることがないようにご注意ください。
- (3) 前処理液にはタンパク質分解酵素が含まれており、吸入するとアレルギー、喘息または呼吸困難を起こすおそれがあります。十分、注意して取扱ってください。
- (4) 試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の診察・治療などを受けてください。
- (5) 試薬が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。
- (6) 試薬が飛散した場合は、拭き取ってください。
- (7) 検体を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、0.5%次亜塩素酸剤などの消毒液を使用して拭き取ってください。

2. 使用上の注意

- (1) 本品に含まれる試薬は必ず保管方法に従って保存してください。使用時の蓋の開放は最小限にし、長時間室温に放置しないでください。また、保管方法以外の条件で保存した試薬や有効期間が過ぎている試薬は使用しないでください。
- (2) Lot の異なる構成試薬は継ぎ足して使用しないでください。
- (3) 試薬の凍結融解は 10 回までとしてください。
- (4) 検査従事者の汗や唾液に含まれる RNase による RNA 分解を防ぐため、本品を使用する際は必ず手袋・マスクを着用してください。
- (5) 機器や器具類は、適切に点検・校正されたものを使用してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 使用済みの試薬及び器具などを廃棄する場合には医療用廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。
- (2) 試薬を廃棄する場合は水質汚濁防止法などの規制に留意して処理してください。
- (3) 反応終了後の PCR 用容器は開封せずに廃棄してください。増幅産物による汚染を防ぐため、廃棄の際、オートクレーブは行わないでください。

【保管方法・有効期間】

保管方法 -35～-15℃

有効期間 18 ヶ月 (期限は外装に表示)

【包装単位】

商品名	構成試薬名 (包装内容)
TRexGene [®]	前処理液 (660 μ L×1 本)
SARS-CoV-2 &	反応液 (1650 μ L×2 本)
Flu A/B	酵素液 (550 μ L×1 本)
検出キット	プライマー・プローブ液 (550 μ L×1 本)

＊【承認条件】

承認時の以下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。

・鼻咽頭ぬぐい液又は鼻腔ぬぐい液中のインフルエンザウイルス核酸検出に係るデータ

TOYOBO

【問い合わせ先】

東洋紡株式会社 診断システム事業部
〒530-0001 大阪市北区梅田一丁目 13 番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3335 FAX 06-6348-3833

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

東洋紡株式会社
〒914-8550 福井県敦賀市東洋町 10 番 24 号