

この添付文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管しておいてください。

体外診断用医薬品

2021年3月作成(第1版)

製造販売承認番号:30300EZ00025000

SARS コロナウイルス核酸キット
インフルエンザウイルス核酸キット

コバス® Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B

【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、A型インフルエンザウイルス及びB型インフルエンザウイルスの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してください。
3. 検体採取及び取扱については、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」を参照してください。
5. 鼻腔ぬぐい液を検体とした場合、適切な検体採取が行われないと正しい結果が得られない可能性があるため、【操作上の注意】をよく読み、1本のスワブで必ず両鼻孔から採取してください。
6. 鼻咽頭ぬぐい液及び鼻腔ぬぐい液のインフルエンザウイルスの検出については、承認時点において、臨床性能試験が実施されておらず、製造販売後に臨床性能試験を実施することが承認条件とされています。そのため、インフルエンザウイルス感染の診断は、本品による検査結果のみで行わず、他の検査結果及び臨床症状を考慮し総合的に判断してください。

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、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。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、検出結果の信頼性を保証しかねます。
3. SARS-CoV-2 検査における唾液、下気道由来検体(喀痰もしくは肺胞洗浄液)に対する分析性能を担保する試験成績は取得していません。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。また、試薬ごとに設定された反応時間及び温度などは厳守してください。
5. 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
6. キットの試薬を取り扱う際には保護眼鏡、実験着及び使い捨てゴム手袋を着用し、試薬が皮膚、目、粘膜などに触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合は、大量の水でじゅうぶんに洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。

【形状・構造等(キットの構成)】

コバス Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B 1テスト用 20セット

1. 内部コントロール [RNA-IC]	10 µL
2. プロテアーゼ試液 [ProK]	7 µL
3. MGP 試液 [MGB]	10 µL
4. ライシス試液 [LB]	215 µL
5. 洗浄試液 [WB]	240 µL
6. 溶出試液 [EB]	40 µL
7. マスターミックス1 [MMX-1]	10 µL
プライマー MS2_R1	
プライマー A_RT3	
プライマー A_RT3-m1	
プライマー B_RT2F	
プライマー COVID-F4-RP-2	
プライマー COVID-F3-RP-1	
2'-デオキシアデニン-5'-三リン酸(dATP)	
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)	
2'-デオキシグアニン-5'-三リン酸(dGTP)	
2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(dUTP)	
8. マスターミックス2 [MMX-2]	10 µL
Z05 DNA ポリメラーゼ	
9. マスターミックス3 [MMX-3]	10 µL
プライマー A_nonRT3	
プライマー B_nonRT2	
プライマー MS2_F1m8	
プライマー COVID-F3-FP-3	
プライマー COVID-F4-FP-3	
プローブ A_P3_M_FAM	
プローブ A_P3_M_m1	
プローブ B_SPRB2_CFR610	

プローブ COVID-F3-PR-1
プローブ COVID-F4-PR-2
プローブ Internal Control-MS2-HEX

【使用目的】

生体試料中のSARS-CoV-2 RNA、鼻咽頭ぬぐい液又は鼻腔ぬぐい液中のA型及びB型インフルエンザウイルスRNAの検出(SARS-CoV-2感染又はインフルエンザウイルス感染の診断補助)

【使用目的に関連する使用上の注意】

【性能】2. SARS-CoV-2、【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してください。

【測定原理】

1. 本キットの測定は以下の3つのステップからなります。試料の調製から増幅及び検出までは「コバス Liat」が自動で行います。

(1) 核酸の抽出

検体に、内部コントロール、プロテアーゼ試液、MGP 試液及びライシス試液が混和されます。これによりウイルス等が溶解し、検体中の核酸は磁性粒子に吸着します。核酸が吸着した磁性粒子は、磁石により捕らえられて固定され、溶解したウイルスのたんぱく質などの不要な成分は洗浄により除去されます(B/F分離)。これに溶出試液を加えて核酸を遊離させ試料とし、マスターミックスを加えて逆転写反応、増幅及び検出を行います。

(2) 逆転写反応による標的 RNA から逆転写 DNA の合成

Mn²⁺の存在下、逆転写活性と DNA ポリメラーゼ活性を併せ持つ耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼにより逆転写反応を行い、Target1 (A型インフルエンザウイルス特異的) RNA、Target2 (B型インフルエンザウイルス特異的) RNA、Target3 (SARS-CoV-2 特異的) RNA 及び IC RNA に相補的な逆転写 DNA(cDNA)が合成されます。

(3) 増幅及び検出

リアルタイム PCR(Polymerase Chain Reaction)法¹⁾を応用し、(2)に引き続き、自動で行います。検出には蛍光色素(レポーター)及び消光物質(クエンチャー)で標識した Target1 RNA、Target2 RNA、Target3 RNA 及び IC RNA 用 DNA プローブを用います。このプローブの蛍光色素は、レポーターとクエンチャーが近くに存在する場合は、クエンチャーにより蛍光が消光され強い蛍光を発することはありますが、レポーターとクエンチャーが切り離された場合は、レポーターが発光するために強い蛍光を発するようになります。(2)で合成された cDNA を高温で1本鎖に変性させます(2サイクル目以後は、増幅した2本鎖 DNA を同様に高温で1本鎖に変性させます)。温度を下げると Target1 RNA、Target2 RNA、Target3 RNA 及び IC RNA 用 DNA プローブが標的配列とハイブリダイズします。

また、プライマーが標的配列の 3'末端側へアニールし、Mn²⁺及びデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)存在下、耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼの働きにより標的配列に相補的な DNA 鎖が伸長されます。DNA 鎖の伸長と同時に既に標的配列とハイブリダイズしている Target1 RNA、Target2 RNA、Target3 RNA 及び IC RNA 用 DNA プローブは Z05 DNA ポリメラーゼの 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により分解され蛍光を発します。この蛍光強度を Target1 RNA、Target2 RNA、Target3 RNA 及び IC RNA 用蛍光色素それぞれに固有の異なる波長で検出します。この「熱変性」、「DNA プローブと標的配列のハイブリダイズ」、「プライマーのアニール」、「耐熱性 Z05 DNA ポリメラーゼによる相補鎖の伸長と DNA プローブの分解による蛍光発光」、「蛍光強度の測定」を所定のサイクルで連続的に繰り返し、各サイクルの PCR 産物をリアルタイムにモニターしながら増幅曲線を作成します。作成した増幅曲線より蛍光強度が一定量以上となるサイクル数を求め、Ct 値(Cycle-to-threshold value)とします Target1、Target2 及び Target3 について、Ct 値が求められた場合をそれぞれ陽性、求められなかった場合をそれぞれ陰性とします。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質

検体の採取には、コパンUTM(別売)、BD UVIT(別売)、サーモフィッシャーサイエンティフィック Remel(別売)もしくは0.9%生理食塩水(別売)等を用いることができます。コパンUTM、BD UVIT、サーモフィッシャーサイエンティフィック Remelに採取した検体は、室温で4時間、2~8°Cで3日間安定です。検体の保存及び輸送が72時間を超える場合は、-70°C以下で保管してください。0.9%生理食塩水に採取した検体は、室温で4時間、2~8°Cで3日間安定です。

その他、検体の輸送方法、保存方法、前処理は、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」、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」及び採取用キットの添付文書を参照してください。

2. 検体採取

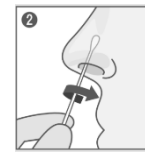
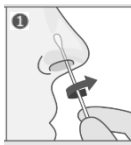
(1) 鼻咽頭ぬぐい液

- ① 検体採取キット(別売)に付属の滅菌スワブを用意します。
- ② 滅菌スワブを鼻孔に挿入し、鼻咽頭後部の表面に到達させます。
- ③ 静かに回転させ、鼻咽頭の表面を数回擦るようにして粘膜表皮を採取します。
- ④ 滅菌スワブを鼻孔から注意深く引き出します。



(2) 鼻腔ぬぐい液

- ① 鼻腔ぬぐい液採取用の滅菌スワブを用意します。
なお、鼻腔ぬぐい液採取用の滅菌スワブは本品には付属しておりません。市販品をご用意ください。
- ② 滅菌スワブを鼻腔（鼻前庭）約 1~2cm のところまで挿入します。この時無理に圧を加えないでください。
- ③ 鼻腔壁にスワブを約 3 秒間 回転させ、粘膜表皮を採取します。滅菌スワブの先端がほかの部位に触れないように鼻腔から注意深く引き出します。
- ④ 同じスワブを使用して反対の鼻腔でも同様の操作を繰り返します。



* 細菌の増殖が困難であったため、ゲノムDNAを用いて検査を実施しました。

3. 重複感染による競合阻害

1つのターゲットウイルスを高濃度、他の2つのターゲットウイルスを低濃度(3×LoD)に調製した同時感染サンプルで評価しました。低濃度のターゲットウイルスが100%のヒット率で検出されるまで、高濃度のターゲットウイルスを陰性の鼻咽頭ぬぐい液を懸濁したUTMで段階希釈を行い、条件毎に3重測定を行いました。低濃度の2つのターゲットウイルスが100%(3/3) 検出される各ウイルスの最高濃度は下表のとおりでした。

高濃度ターゲットに用いるウイルス株	高濃度ターゲットの検出濃度	低濃度ターゲットの濃度(TCID ₅₀ /mL)及び Hit Rate		
		Influenza A	Influenza B	SARS-CoV-2
	TCID ₅₀ /mL	3.00E-03	1.20E-02	3.60E-02
A/Brisbane/59/07	1.40E+04	NT	3/3	3/3
B/Florida/04/06	3.20 E+02	2/3	NT	0/3
	1.60E+02	3/3	NT	0/3
	4.00E+01	3/3	NT	2/3
B/Colorado/06/2017	2.00E+01	3/3	NT	3/3
	1.40E+04	NT	NT	1/3
SARS-CoV-2 USA WAI/2020	7.00E+03	NT	NT	3/3
	4.80E+01	2/3	2/3	NT
	3.60E+01	3/3	3/3	NT

NT 未検査

4. 反応特異性

(1) SARS-CoV-2

2020年5月17日時点においてNCBI及びGISAIDデータベースに登録されているSARS-CoV-2遺伝子配列に対し、本品のプライマー4種をそれぞれマッピングする *in-silico* 解析により反応特異性を検討しました。検討した遺伝子配列は、全て検出できるものと考えられました。

(2) インフルエンザウイルス

反応性の検討としてA型インフルエンザウイルス28株、B型インフルエンザウイルス15株を検討した結果を下表に示します。検討した濃度ではすべてのウイルス株が検出されました。

株	亜型	試験濃度
A/Aichi/2/68	Influenza A/H3N2	1.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
A/Alice	Influenza A/H3N2	5.0×10 ¹ CEID ₅₀ /mL
A/Anhui/1/2013	Influenza A/H7N9 (Eurasian lineage)	1.0×10 ³ TCID ₅₀ /mL
A/Brisbane/10/07	Influenza A/H3N2	2.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/Brisbane/59/07	Influenza A/H1N1	2.0×10 ³ TCID ₅₀ /mL
A/Cambodia/X0810301/2013 (H5N1)-PR8-IDCDC-RG34B	Influenza A/H5N1 reassortant	2.5×10 ¹ CEID ₅₀ /mL
A/Denver/1/57	Influenza A/H1N1	1.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/FM/1/47	Influenza A/H1N1	1.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/H3/Perth/16/09	Influenza A/H3N2	2.5×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
A/Hong Kong/8/68	Influenza A/H3N2	1.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/Indiana/8/2011	Influenza A/H3N2v	5.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
A/Mal/302/54	Influenza A/H1N1	4.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/MRC2	Influenza A/H3	1.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/New Caledonia/20/99	Influenza A/H1N1	1.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/New Jersey/8/76	Influenza A/H1N1	1.0×10 ¹ CEID ₅₀ /mL
A/NY/01/2009	Influenza A/H1N1 pdm09	2.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/NY/02/2009	Influenza A/H1N1 pdm09	2.5×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/NY/03/2009	Influenza A/H1N1 pdm09	2.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
A/Port Chalmers/1/73	Influenza A/H3N2	1.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/PR/8/34	Influenza A/H1N1	5.0×10 ⁹ TCID ₅₀ /mL
A/Solomon Island/3/2006	Influenza A/H1N1	5.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/Swine/1976/31	Influenza A/H1N1	1.0×10 ¹ CEID ₅₀ /mL
A/Swine/Iowa/15/30	Influenza A/H1N1	1.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/Texas/50/2012	Influenza A/H3N2	1.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
A/Victoria/3/75	Influenza A/H3N2	1.0×10 ² CEID ₅₀ /mL
A/Victoria/361/2011	Influenza A/H3N2	2.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
A/Weiss/43	Influenza A/H1N1	1.0×10 ³ TCID ₅₀ /mL
A/Wisconsin/67/05	Influenza A/H3N2	5.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
B/Allen/45	Influenza B	5.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
B/Brisbane/60/2008	Influenza B (Victoria lineage)	1.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
B/Florida/04/06	Influenza B (Yamagata lineage)	2.0×10 ³ TCID ₅₀ /mL
B/Florida/07/04	Influenza B (Yamagata lineage)	5.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
B/GL/1739/54	Influenza B	2.0×10 ⁹ TCID ₅₀ /mL
B/HongKong/5/72	Influenza B	2.5×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
B/Lee/40	Influenza B	2.5×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
B/Malaysia/2506/04	Influenza B (Victoria lineage)	4.0×10 ³ TCID ₅₀ /mL
B/Maryland/1/59	Influenza B	2.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
B/Mass/3/66	Influenza B	1.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL

3. 交差反応性

(1) SARS-CoV-2 (*in-silico*)

NCBI及びGISAIDデータベースからダウンロードした27種類の微生物の遺伝子配列に対し、本品のプライマー及びプローブをそれぞれマッピングする *in-silico* 解析により交差反応の可能性を検討しました。SARS-CoV-2 における RdRp 及び N 遺伝子ターゲット領域に対して、下表のような部分的な相同性が認められました。いずれか2つのプライマーが、短い距離を隔て相対する鎖上の塩基配列にマッピングされた場合の潜在的な増幅の可能性を調べました。SARS-CoV-1を除き、この *in-silico* 解析においては潜在的な意図しない交差反応は認められませんでした。本検討で対象とした微生物は、以下のとおりです。

Human coronavirus HKU1、Human coronavirus 229E/OC43/NL63、SARS-coronavirus (SARS-CoV-1)、MERS-coronavirus、Adenovirus (e.g. C1 Ad. 71)、Human metapneumovirus (hMPV)、Parainfluenza virus 1-4、Influenza A (all available sequences)、Influenza B (all available sequences)、Enterovirus (e.g. EV68)、Respiratory syncytial virus、Rhinovirus、*Chlamydia pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*、*Legionella pneumophila*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus pyogenes*、*Bordetella pertussis*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Pneumocystis jirovecii* (PJP)、*Candida albicans*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus salivarius*、

(2) SARS-CoV-2 (wet による確認試験)

培養 SARS-CoV-1 (Urbani 株) をブールした陰性鼻咽頭ぬぐい液で 1.0E+05 pfu/mL に調製した試料を用い、SARS-CoV-1 に対する交差反応性を確認しました。下表のとおり、SARS-CoV-1 との交差反応性は認められませんでした。

SARS-CoV-1 検出濃度	本品		
	Influenza A 検出結果	Influenza B 検出結果	SARS-CoV-2 検出結果
1.00E+05 pfu/mL	検出せず	検出せず	検出せず

(3) インフルエンザウイルス

ヒトゲノム DNA 及び 35 種類の微生物を用いて交差反応性を検討しました。A 型インフルエンザウイルス(Brisbane/59/2007)及び B 型インフルエンザウイルス(Malaysia/2506/04)はそれぞれ約 3×LoD での存在下及び非存在下にて検討した結果、いずれも意図しない交差反応は認められませんでした。

微生物	試験濃度
Adenovirus Type 1	9.0×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Adenovirus Type 7	1.4×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Cytomegalovirus	4.5×10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Epstein Barr Virus	2.5×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Herpes Simplex Virus	1.4×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Human Coronavirus 229E	8.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
Human Coronavirus OC43	8.0×10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Human Enterovirus 68	1.0×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Human Metapneumovirus	7.0×10 ² TCID ₅₀ /mL
Human Parainfluenza Type 1	3.7×10 ² TCID ₅₀ /mL
Human Parainfluenza Type 2	7.5×10 ² TCID ₅₀ /mL
Human Parainfluenza Type 3	4.5×10 ² TCID ₅₀ /mL
Human Rhinovirus Type 1A	8.0×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
Measles	8.0×10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Mumps Virus	8.0×10 ¹ TCID ₅₀ /mL
Varicella-Zoster Virus	4.4×10 ² TCID ₅₀ /mL
<i>Bordetella pertussis</i>	2.2×10 ⁶ CFU/mL
<i>Candida albicans</i>	4.2×10 ⁶ CFU/mL
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	8.0×10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
<i>Corynebacterium sp</i>	3.6×10 ⁶ CFU/mL
<i>Escherichia coli</i>	1.9×10 ⁶ CFU/mL
<i>Haemophilus influenzae</i>	2.3×10 ⁶ CFU/mL
<i>Lactobacillus sp</i>	1.9×10 ⁶ CFU/mL
<i>Legionella pneumophila</i>	6.7×10 ⁶ CFU/mL
<i>Moraxella catarrhalis</i>	2.5×10 ⁶ CFU/mL
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2.8×10 ⁶ copies/mL*
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2.9×10 ⁶ copies/mL*
<i>Neisseria elongate</i>	2.0×10 ⁶ CFU/mL
<i>Neisseria meningitidis</i>	2.2×10 ⁶ CFU/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.3×10 ⁶ CFU/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.4×10 ⁶ CFU/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.9×10 ⁶ CFU/mL
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1.8×10 ⁶ CFU/mL
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.5×10 ⁶ CFU/mL
<i>Streptococcus salivarius</i>	4.3×10 ⁶ CFU/mL
Human genomic DNA	1.0×10 ⁷ copies/mL

株	亜型	試験濃度
B/Massachusetts/2/2012	Influenza B (Yamagata lineage)	5.0×10^{-3} TCID ₅₀ /mL
B/Nevada/03/2011	Influenza B (Victoria lineage)	2.5×10^{-1} CEID ₅₀ /mL
B/Taiwan/2/62	Influenza B	2.0×10^{-1} TCID ₅₀ /mL
B/Texas/6/2011	Influenza B (Yamagata lineage)	1.0×10^{-1} TCID ₅₀ /mL
B/Wisconsin/1/2010	Influenza B (Yamagata lineage)	5.0×10^{-1} TCID ₅₀ /mL

5. コンタミネーションに関して

クロスコンタミネーションは、主に検体を扱ったピペットなどで発生するエアロゾルやピペット本体の汚染が原因となりますので、検査区域の分割や次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃を徹底することで、クロスコンタミネーションを最小限に防止することができます。したがって、本キットの検出に当たっては次の事項を徹底するようにしてください。

- 検体採取時に使用した手袋は検査を行う前に必ず新しいものに交換してください。検体をアッセイチューブに分注する際は、安全キャビネットを利用するなどバイオセーフティ/バイオハザードに準拠した環境で実施してください。付属のトランスファーピペットを利用してください。ここで使用する器具や保護衣をほかの場所に持ち込まないでください。また、分注時には、すべて静かに操作してエアロゾルの発生をできる限り防止してください。

- 実験台及び使用器具などが検体や増幅 DNA で汚染された場合は、用時調製した次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)でよく拭き取るか、紫外線照射をじゅうぶん行ってください。

以上の事項に従っても、クロスコンタミネーションが起こる可能性がありますので、結果の判定にはじゅうぶん注意してください。

6. その他の留意事項

試料中に PCR の妨害物質が存在すると正しい判定結果が得られないので注意してください。また、試料中に標的 RNA が存在しても最小検出感度以下である場合には Negative(陰性)と判定されることがありますので注意してください。

【用法・用量(操作方法)】

1. 試液の調製方法及び安定性

すべての試薬はそのまま用います。

2. 別途必要な器具・器材・試料等

- コパス Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B コントロールキット^{*1}
- 安全キャビネット(陰圧)
- ゴム手袋(パウダーフリー)
- コパン UTM(コパンジャパン株式会社)又は BD UVT(日本ベクトン ディッキンソン株式会社)、サーモフィッシュサイエンティフィック Remel(サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社)、0.9%生理食塩水など

3. 操作方法

検出に必要な検体量は 200 μL です。試薬ロット毎につきコントロールとして SARS-CoV-2 陽性コントロール[SARS-COV-2 (+)C]、インフルエンザ A/B 陽性コントロール[FluA/B (+)C]及び陰性コントロール[Nega(-)C]を検出し、精度管理を行います。精度管理の手順は(4)及び(5)を参照してください。

(1) コパス Liat システムによる検体検出

- 電源ボタンを押し、電源を入れ、ログイン画面からログインします。
- 検体及びアッセイチューブを準備します。
- 「Main」メニューから「Run Assay」を選択し、「Select」ボタンを押します。
- 「Scan」ボタンを押し、アッセイチューブのバーコードをスキャンします。

(2) 検体架橋及び試薬のロード

- 検体 ID を入力するか、スキャンします。
- アッセイチューブのキャップを取り外し、付属のトランスファーピペットを利用して 200 μL 検体を添加し、閉栓します。検体量が多い場合は自動的に調整され、少ない場合はエラーが表示されます。
- 「Scan」ボタンを選択し、検体を添加したアッセイチューブのバーコードを再度スキャンします。
- アッセイチューブのスリーブを取り外し、アッセイチューブを分析装置に挿入し、検出を開始します。

(3) 検出の終了

検出が終了したら、結果を印刷、またはオンラインで上位の検査システムへ送信します。アッセイチューブを取り出し廃棄します。検出結果は SARS-CoV-2、A 型インフルエンザ及び B 型インフルエンザそれぞれの結果を「検出(Detected)」「未検出(Not Detected)」又は「分析不能(Invalid)」として報告されます。各機器の操作の詳細については、取扱説明書を参照してください。操作の概略は最終ページの図を参照してください。

試薬ロット毎に実施する、陰性コントロールの調整及び検出、陽性コントロールの調整と検出は、以下の手順に従って実施してください。

(4) 陰性コントロールの調製及び検出

- 電源ボタンを押し、電源を入れ、ログイン画面からログインします。
- 本品アッセイチューブ及び同梱されるバーコードカード、コントロールキットに同梱される Dilution UTM-RT 及び陰性コントロール用のバーコードカードを準備します。
- 機器の「Main」メニューから「Assay Menu」を選択します。
- リストの下部にある「New Lot」を選択します。
- 「Scan」を選択し、本品に同梱されるバーコードカードを読み取らせます。
- 同様に陰性コントロールのバーコードを読み取らせます。
- 付属のトランスファーピペットを用いて Dilution UTM-RT をアッセイチューブに添加します。
- 「Scan」を選択後、アッセイチューブのバーコードを読み取らせます。
- アッセイチューブを挿入し、検出を開始します。
- 検出結果が正しければ「Confirm(ソフトウェア 3.2 の場合は「OK」)」を選択し、引き続き陽性コントロールの調製及び検出をおこないます。検出結果が正しくない場合は、再検査してください。

(5) 陽性コントロールの調製及び検出

- 本品アッセイチューブ及び同梱されるバーコード、コントロールキットに同

梱されている SARS-CoV-2 陽性コントロール[cobas SARS-CoV-2 (+)C]、インフルエンザ A/B 陽性コントロール[cobas FluA/B (+)C]、陽性コントロール用のバーコードカードを準備してください。

- SARS-CoV-2 陽性コントロール及びインフルエンザ A/B 陽性コントロールチューブの蓋を上部に保持し、各溶液及び内容物が底部にあることを確認します。
- トランスファーピペットを用いて SARS-CoV-2 陽性コントロールを分取し、インフルエンザ A/B 陽性コントロールチューブに添加します。そのまま5分間静置します。
- 新しいトランスファーピペットを用いて、陽性コントロールをゆっくり 10 回ピペティングにて混和します。「Scan」を選択し、コントロールキットに同梱される陽性コントロール用のバーコードカードを読み取ります。
- 付属のトランスファーピペットを用いて陽性コントロールをアッセイチューブに添加します。
- 「Scan」を選択後、アッセイチューブのバーコードを読み取らせます。
- アッセイチューブを挿入し、検出を開始します。
- 検出結果が正しければ「Confirm(ソフトウェア 3.2 の場合は「OK」)」を選択し、引き続き陽性コントロールの調製及び検出をおこないます。検出結果が正しくない場合は再検査してください。

【測定結果の判定法】

1. 検出結果の判定

「コパス Liat」では検体及びコントロールの検出結果判定を自動で行います。機器における表示例及び検出結果の解釈については下表を参照してください。

検出結果の解釈

結果	解釈	
SARS-CoV-2	Not Detected	陰性 (SARS-CoV-2 RNA が検出されませんでした)
	Detected	陽性 (SARS-CoV-2 RNA が検出されました)
	Invalid	SARS-CoV-2 の有無は判定できません。 同じ検体、可能であればあらたな検体を使用して再検査を実施してください。
A 型インフルエンザウイルス	Not Detected	陰性 (A 型インフルエンザウイルス RNA は検出されませんでした)
	Detected	陽性 (A 型インフルエンザウイルス RNA が陽性となりました)
	Invalid	A 型インフルエンザウイルスの有無は判定できません。 同じ検体、可能であればあらたな検体を使用して検出をやり直してください。
B 型インフルエンザウイルス	Not Detected	陰性 (B 型インフルエンザウイルス RNA は検出されませんでした)
	Detected	陽性 (B 型インフルエンザウイルス RNA が陽性となりました)
	Invalid	B 型インフルエンザウイルスの有無は判定できません。 同じ検体、可能であればあらたな検体を使用して再検査を実施してください。
Assay Invalid	SARS-CoV-2、A 型インフルエンザウイルス及び B 型インフルエンザウイルスの有無を確定できません。 同じ検体、可能であればあらたな検体を使用して再検査を実施してください。	
Assay Aborted	標的ウイルスの有無は判定できません。 同じ検体、可能であればあらたな検体を使用して再検査を実施してください。	

2. 結果の判定にかかわる注意

- 以下の検体を検出した場合、誤判定となることがありますので注意してください。

- 弊社指定の検体採取キット以外を用いた検体
- 各検体採取キット推奨の保管期間を過ぎた、または条件を逸脱した検体
- 凍結と融解を 1 回より多く繰り返した検体
- SARS-CoV-2 RNA、A 型インフルエンザウイルス RNA 及び B 型インフルエンザウイルス RNA のコンタミネーションを受けた検体

上記のような検体の場合は、適切な検体を再度採取し検出を行ってください。検体分注及び検出操作が不適切であると判断された場合は、再度検出してください。

- SARS-CoV-2、A 型インフルエンザウイルス及び B 型インフルエンザウイルス感染後、ある程度以上のウイルス濃度となるまで検出することができない場合があります。また、本キットのプライマーやプローブの塩基配列と試料中の SARS-CoV-2 RNA、A 型インフルエンザウイルス RNA 及び B 型インフルエンザウイルス RNA の塩基配列との相違が大きくなると、検出できない可能性もありますので、判定にはじゅうぶん注意してください。そのほかの原因でも「Not Detected」(陰性)となる可能性がありますので、本キットで「Not Detected」(陰性)と判定されても必ずしも SARS-CoV-2、A 型インフルエンザウイルス及び B 型インフルエンザウイルスの存在を否定するものではありません。検出結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
- 強陽性検体において、その他のウイルスが検出できない場合があります。単項目陽性結果はその他のウイルスの存在を否定するものではありません。検出結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
- 反応の阻害などにより PCR における増幅効率が低下した場合、増幅曲線に対しソフトウェアの解析アルゴリズムが対応できないケースが稀に発生することがありますので、注意してください。

【性能】

1. インフルエンザウイルス

(1) 最小検出感度 (LoD)

A型インフルエンザウイルス3株及びB型インフルエンザウイルス2株の培養ウイルスを陰性鼻咽頭ぬぐい液で段階希釈することにより、ウイルスパネルを作製しました。ウイルスパネルの試料は 3 重測定を行い、全てが陽性となった最低濃度を暫定的な LoD 濃度としました。暫定的な LoD 濃度前後でさらに 20 重測定を行い、N=19 以上が陽性となった濃度を正式な LoD としました。結果は下表のとおりです。

使用株	LoD (TCID ₅₀ /mL)
A/Brisbane/10/07	2.0 × 10 ⁻²
A/Brisbane/59/07	2.0 × 10 ⁻³
A/NY/01/2009	2.0 × 10 ⁻²
B/Florida/04/06	2.0 × 10 ⁻³
B/Malaysia/2506/04	4.0 × 10 ⁻³

(2) 検体種の同索性

10 人の健康者から採取した鼻咽頭ぬぐい液及び鼻腔ぬぐい液をウイルス輸送培地に保存し、2020/2021 シーズンのインフルエンザワクチン作製に用いられた株 (A 型インフルエンザウイルス:A/香港/2671/2019、B 型インフルエンザウイルス:B/Victoria /705/2018) をスパイクして3段階の希釈系列を作製しました。A 型及び B 型インフルエンザウイルス各 5 症例分のスパイク試料を各 1 重測定し検出率を算出したところ、下表のとおりとなりました。

A 型インフルエンザウイルス濃度 (TCID ₅₀ /mL)	陽性検出率	
	鼻咽頭ぬぐい液	鼻腔ぬぐい液
3.0 x 10 ⁰	100% (5/5)	100% (5/5)
3.0 x 10 ⁻¹	60% (3/5)	40% (2/5)
3.0 x 10 ⁻²	0% (0/5)	0% (0/5)

B 型インフルエンザウイルス濃度 (TCID ₅₀ /mL)	陽性検出率 (%)	
	鼻咽頭ぬぐい液	鼻腔ぬぐい液
1.0 x 10 ⁰	100% (5/5)	100% (5/5)
1.0 x 10 ⁻¹	20% (1/5)	20% (1/5)
1.0 x 10 ⁻²	0% (0/5)	0% (0/5)

2. SARS-CoV-2

(1) 最小検出感度 (LoD)

米国の患者から分離された培養ウイルス (USA-WA1/2020) を、陰性鼻咽頭ぬぐい液で 2 倍に連続段階希釈することにより、5 濃度の試料からなるパネルを作製しました。パネルの各試料は 20 重測定を行いました。Probit 解析から算出された Hit rate 95%となる最小検出感度、Hit rate (陽性検出数/有効測定数×100%) が 95%以上となる最小検出感度は下表のとおりでした。

Viral Strain	Concentration [TCID ₅₀ /mL]	Total valid results	Result	
			Hit Rate (%)	Mean Ct
USA-WA1/2020	0.048	10	100	32.6
	0.024	20	100	33.5
	0.012	20	100	35.2
	0.006	20	70	35.7
	0.003	20	25	36.7

Probit 解析から算出された Hit rate 95%となる最小検出感度: 0.010 TCID₅₀/mL (95% CI: 0.007 - 0.018)

(2) 相関性試験成績

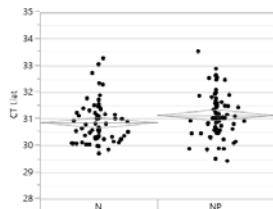
呼吸器感染症が疑われる患者の鼻咽頭から採取しウイルス輸送培地に保存した SARS-CoV-2 陽性と判明している 56 検体及び鼻咽頭から採取しウイルス輸送培地に保存した陰性と判明している 132 検体を、本品及び既承認品 (リアルタイム PCR 法) で測定し、SARS-CoV-2 検出における一致率を算出しました。SARS-CoV-2 陰性と判明している 132 検体のうち、2 検体は本品で Invalid (判定不能) となり、再検を行った結果 2 検体は再び Invalid となりました。Valid となった 130 検体について、既承認品との相関性を評価したところ、陽性一致率 100%、陰性一致率 100% となりました。

SARS-CoV-2 検出	既承認品 (リアルタイム PCR 法)			
	陽性	陰性	合計	
本品	陽性	56	0	56
	陰性	0	130	130
	合計	56	130	186

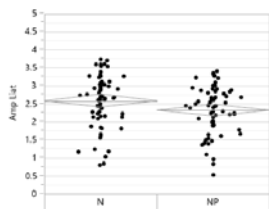
(3) 検体種の同索性

呼吸器感染症が疑われ SARS-CoV-2 陰性と判明している患者 68 名から、鼻咽頭ぬぐい液及び鼻腔ぬぐい液をウイルス輸送培地に採取し、本品で 1 重測定しました。内部コントロール (IC) の Ct 値及び増幅曲線の高さを比較したところ、同等の結果が得られました。

検体種	IC Ct 値平均	増幅曲線の高さ平均
鼻腔ぬぐい液 (N)	30.9	2.59
鼻咽頭ぬぐい液 (NP)	31.1	2.32



IC Ct 値分布



増幅曲線の高さ分布

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 検体及び本キットの取扱いには、使い捨て手袋、実験着などの保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。また、検出終了後はよく手を洗ってください。
- 試薬が誤って目や口に入った場合には、直ちに水でじゅうぶん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などを受けてください。
- 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。
- 試薬をこぼした場合には水で希釈してから拭き取ってください。
- 検体をこぼした場合は、次亜塩素酸剤 (有効塩素濃度 5,000 ppm, 0.5%) などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
- 検体及び本キットを取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。
- 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。
- 検体を取扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて 121°C で 20 分間以上加熱殺菌するか、次亜塩素酸剤 (有効塩素濃度 5,000 ppm, 0.5%) に 1 時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中はじゅうぶんに換気を行ってください。
- 検出の準備が整うまで、個別に包装されたアッセイチューブを開封しないでください。
- 機器の操作中又は操作後はアッセイチューブのキャップを開けないでください。
- 本キット及びコバス Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B コントロールキットと同梱されているトランスファーピペットのみを使用してください。そのほかの移送用ピペットを使用すると検出結果が無効になる可能性があります。
- 本品にはアレルギー反応を起こすおそれがある 2-メチルイソチアゾール-3(2H)-オン・塩酸塩が含まれていますので、取扱いにはじゅうぶんに注意してください。

2. 使用上の注意

- プライマー及びプローブは、検出するウイルスの遺伝子の中でも保存性が高く変異が少ない遺伝子領域を反応のターゲットとしておりますが、稀に起こる遺伝子の変異や欠損/挿入などにより、反応性が低下し正確に検出できない場合や検出できない場合があります。
- ウイルスの RNA の測定・検出の結果は、検体採取の方法や感染の進行度などの患者因子の影響を受ける場合があります。
- 従来の検出方法から新しい検出方法に変更する場合は、変更前後の検出方法の相関性などを確認のうえご利用ください。
- 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
- 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結させるなど指定の条件以外で保存したものや使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
- 検査区域の分割、及び次亜塩素酸剤 (有効塩素濃度 5,000 ppm, 0.5%) による器具、実験台の清掃などを徹底して行ってください。
- 本キットを取り扱う際にはウイルス、微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けください。汗や唾液に含まれる RNase 又は DNase が少量でも検体に混入すると、RNA や DNA が分解され検出結果に誤りが生じる可能性があります。

3. 廃棄上の注意

- 検出により生じた廃液については、検体などと同様に滅菌又は消毒の処理を行ってください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。
- 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。
- 廃棄する際は、水質汚濁法等の規制に留意して処理してください。
- 検体及び試薬をこぼした場合は、次亜塩素酸剤 (有効塩素濃度 5,000 ppm, 0.5%) などの消毒液を使用してじゅうぶんふきとってください。なお、ふき取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
- 陽性コントロール及びマスターミックス 3 には 0.05% 未満のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性のある金属アジドを生成することがあるため、廃棄の際には多量の水で洗い流してください。
- 使用済アッセイチューブはチオシアン酸グアニジンを含みます。チオシアン酸グアニジンは次亜塩素酸剤と反応して有毒ガスを発生することがありますので、次亜塩素酸剤と接触させないでください。

【貯蔵方法・有効期間】

- 貯蔵方法
2~8°C
- 有効期間
12 ヶ月
使用期限 (Exp.) は外箱に記載してあります。

【包装単位】

コバス Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B 20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)】を参照してください)

【主要文献】

- Higuchi, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y). 1992, 10, p.413~417.
- Heid, C.A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Research. 1996, 6, p.986~994.

【問い合わせ先】

ロシユ・ダイアグノスティクス株式会社
カスタマーソリューションセンター
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70

フリーダイヤル： 0120-600-152

《特許に関連するお知らせ》

本製品をご購入頂きましたお客様は、これら製品をヒトの体外診断目的における PCR による核酸配列の増幅と検出、及びその関連工程に使用することが許諾されています。この特定された使用許諾権以外には、いかなる種類の特許権又はライセンスも許諾されているものではありません。

《承認条件》

1. 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。
 - ・ 鼻腔ぬぐい液中の SARS-CoV-2 核酸検出に係るデータ
 - ・ 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
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。

COBAS is a trademark of Roche.

コバスは Roche の商標です。

《操作概略》

