

SARS コロナウイルス核酸キット

Whole In One[®] SARS-CoV-2ダイレクト検出キット

【重要な基本的注意】

1. 本品で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、取扱いについては必要なバイオハザード対策をとってください。
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。

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的で使用しないでください。
2. 電子添文に記載された使用目的及び操作方法以外で使用した場合、得られた測定結果については保証を致しかねます。
3. 使用する機器の取扱説明書をよく読んでからご使用ください。
4. 遺伝子検査の知識や経験を持たない場合、検査結果の判定を誤る危険性があります。本品の使用にあたっては、遺伝子検査の知識や経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

100反応分

- | | | |
|---|---|-------------|
| ① | 2×Whole In One Mix
成分：Tth DNAポリメラーゼ
改変型Tth DNAポリメラーゼ
デオキシアデノシン三リン酸（dATP）
デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）
デオキシチジン三リン酸（dCTP）
デオキシチミジン三リン酸（dTTP） | 1,500 μL×1本 |
| ② | RNase Inhibitor | 60 μL×1本 |
| ③ | Primer & Probe Mix
成分：NIID_2019-nCoV_N_F2
2019-nCoV_N2-R
2019-nCoV_N2-P 3'S
RP-F3
RP-R
RP-P | 840 μL×1本 |

【使用目的】

唾液中のSARS-CoV-2 RNAの検出
（SARS-CoV-2感染の診断補助）

【測定原理】

本品は、蛍光標識プローブを用いたOne Step RTリアルタイムPCRにより、唾液中に含まれるSARS-CoV-2（N遺伝子）及び内在性コントロール（ヒトRNase P遺伝子）を同時に検出するキットです。

本品は、耐熱性逆転写酵素を採用しているため、リアルタイムPCR装置上で実施する逆転写ステップの前に、前処理の代わりとなる熱処理ステップを実施できます。そのため、前処理が不要で、直接唾液をOne Step RTリアルタイムPCR用プレミックスへ添加することが可能となっています。

各遺伝子の検出には、Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus (Emerging Infectious Diseases Vol. 10, No. 2,

February 2004)、US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Emerging Infectious Diseases Vol. 26, No. 8, August 2020)、病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.2.9.1（令和2年3月19日 国立感染症研究所）に記載されたプライマー（RP-F3のみ、RP-Fから上流22bpに設計変更）及び蛍光標識プローブを使用しています。

本品は、3つの試薬から構成されており、酵素を含む2×Whole In One Mix、RNase Inhibitor及びPrimer & Probe Mixを混合したOne Step RTリアルタイムPCR用プレミックスに、唾液を直接添加し、One Step RTリアルタイムPCRを行うことで、SARS-CoV-2 RNAと内在性コントロールのRNase P遺伝子の検出を行います。

One Step RTリアルタイムPCRの最初の熱処理ステップで、唾液中に含まれるウイルスからRNAを遊離させると共にRNAの高次構造をほぐし、次のステップで逆転写反応を行った後、蛍光標識プローブを用いたリアルタイムPCRを行います。蛍光標識プローブは5'末端にリポーターとなる蛍光色素、3'末端にクエンチャーとなる消光色素を修飾しており、反応前は、リポーターの蛍光はクエンチャーによって抑制されていますが、伸長反応時にDNAポリメラーゼの有する5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によって相補的な配列に結合した蛍光標識プローブが分解され、蛍光物質がクエンチャーから離れることにより、リポーターから蛍光が発せられます。この蛍光量をモニタリングすることで各標的配列の存在を検出します。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質・採取法
患者検体の採取、輸送方法については、厚生労働省から公表されている「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. 測定試料の調製方法
粘性の低い唾液検体はそのまま使用し、粘性の高い唾液検体は粘性を低減させるための処理を行った後に使用することを推奨します。唾液検体の調製方法の例を以下に示しますが、これに限定されるものではありません。ただし、他の調製方法を用いる場合は、性能を確認した上で使用してください。
 - ① 唾液検体をボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、2,000×g以上の遠心力で1分間遠心し、上清を本品の測定試料として用いてください。
 - ② 特に粘性の高い唾液検体の場合は検体の1～3倍量のPBSを添加した後①の操作を実施してください。
 - ③ ②の操作を行っても粘性が高い検体については、検体の約3倍量のスプタザイム酵素液（極東製薬工業社製）を添加、攪拌した後、室温で約15分間静置し、さらに95℃で5分間熱処理したものを本品の測定試料として用いてください。
3. 妨害物質・妨害薬剤
下記の物質及び濃度では、判定結果に影響を与えません。
リトナビル0.8 μg/mL、オセルタミビル3.0 μg/mL、アジスロマイシン1.0 μg/mL、レボフロキサシン20 μg/mL、アセトアミノフェン20 μg/mL、ロキソプロフェン12 μg/mL、ヒト血液0.5 v/v%、エタノール10 v/v%、グリセリン10 v/v%、塩化セチルピリジニウム0.02 w/v%、ポビドンヨード1.0 w/v%

上記の濃度以上の妨害物質や妨害薬剤を含む場合及びグアニジンチオシアン酸塩等の不活化剤を含むウイルス輸送液を使用する場合は、RNA精製を行う手法で測定してください。例えば、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver. 2.9.1」に記載された方法でRNA精製を行った後、「【用法・用量（操作方法）】3.操作法」の「(3) 測定試料及びコントロールの添加」の過程で精製RNAを5 μ L分取し、分注後のOne Step RTリアルタイムPCR用プレミックスに添加してください。

4. 交差反応性

下記の微生物（ウイルス10種及び細菌13種）由来のRNA又はDNAと交差反応性を示しません。

Influenza A virus (H1N1)、Influenza B virus、
Human coronavirus 229E (HCoV-229E)、
Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63)、
Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)、
Human coronavirus (HKU-1)、
Human metapneumovirus、Enterovirus、
Rhinovirus、Parainfluenza virus 1、
Haemophilus influenzae、*Bordetella pertussis*、
Mycoplasma pneumoniae、*Staphylococcus aureus*、
Candida albicans、*Legionella pneumophila*、
Mycobacterium tuberculosis、*Streptococcus pyogenes*、
Pseudomonas aeruginosa、*Streptococcus pneumoniae*、
Staphylococcus epidermidis、
Corynebacterium diphtheriae、*Klebsiella pneumoniae*

また、BLASTnを用いた*in silico*解析による、SARS-CoV-2以外への交差反応の可能性検討については、SARS-CoV-2を除いたヒトを宿主とする微生物との交差反応性は認められませんでした。

5. コンタミネーション防止

コンタミネーションには、本品で増幅したPCR産物によるキャリーオーバーコンタミネーションと検体間で発生するクロスコンタミネーションの2種類があります。いずれのコンタミネーションも、核酸が付着した作業者の手袋等を介して検査区域を汚染します。検査で使用する試薬や消耗品類が汚染された場合はコンタミネーションの原因となります。

本品の測定にあたっては下記の事項に留意してください。

- ① コンタミネーション防止のため、One Step RTリアルタイムPCR用プレミックスの調製は操作毎にエリア分けをして、物理的に隔離することを推奨します。
- ② マイクロピペット用のチップはフィルター付きのものをご使用ください。フィルターは疎水性フィルターを推奨します。
- ③ 検体及び陽性コントロールを扱う工程毎に手袋の交換を推奨します。
- ④ 実験台や使用器具などがPCR産物や検体で汚染された場合は1%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液でよくふき取ってください。
- ⑤ コンタミネーション発生の原因となりますので、測定後のチューブの蓋を開閉しないでください。また、測定後の反応液について電気泳動等で解析を行わないでください。

6. その他の留意事項

- ① 各試薬を凍結状態から融解後、よく混合し、軽くスピンドウンしてからご使用ください。
- ② 融解後の試薬は使用時まで氷上で保持してください。
- ③ 2×Whole In One Mix及びPrimer & Probe Mixは遮光して保管してください。
- ④ 消耗品及び器具類はDNase/RNaseフリーのものをご使用ください。
- ⑤ One Step RTリアルタイムPCR用プレミックスを調製するマイクロチューブはDNA低吸着仕様のものを推奨します。
- ⑥ 各操作は必ず氷上で行ってください。
- ⑦ One Step RTリアルタイムPCRを行う前に、反応容器をス

ピンドウンし、反応液に気泡がないことを確認してください。気泡があると蛍光検出に影響を及ぼすことがあります。

【用法・用量（操作方法）】

1. 必要な器具・器材・試薬等

- ① マイクロピペット
- ② マイクロピペット用チップ（フィルター付き）
- ③ 1.5 mL又は2.0 mLマイクロチューブ（DNA低吸着チューブ）
- ④ 卓上遠心機又は小型遠心機
- ⑤ リアルタイムPCR装置（アプライドバイオシステムズ QuantStudio™ 5 Dx(ライフテクノロジーズジャパン社製) など）
- ⑥ リアルタイムPCR用容器（8連チューブ又は96穴プレート）
- ⑦ ボルテックスミキサー
- ⑧ Control RNA, SARS-CoV-2 (N gene)（ニッポンジーン社製）
- ⑨ RTmate（ニッポンジーン社製）
- ⑩ Water, Nuclease free（ニッポンジーン社製）

2. 試薬の調製方法

- ① 本品から2×Whole In One Mix、RNase Inhibitor及びPrimer & Probe Mixを取り出し、RNase Inhibitorはスピンドウンして使用する。
- ② 2×Whole In One Mix及びPrimer & Probe Mixは室温で解凍し、よく混合した後、スピンドウンして使用する。
- ③ 各試薬は、氷上又は冷蔵庫で保持し、使用後は速やかに-10℃～-25℃で保存する。

3. 操作法

(1) One Step RTリアルタイムPCR用プレミックスの調製

- ① 下記の通り、プレミックスを氷上で調製します。

1反応あたり

2×Whole In One Mix	12.5 μ L
RNase Inhibitor	0.5 μ L
Primer & Probe Mix	7.0 μ L
Total	20.0 μ L

- ② リアルタイムPCR用8連チューブ又は96穴プレートにプレミックスを20 μ Lずつ分注し、検体を添加するまで氷上で保持します。[†]
[†]コンタミネーションを防止するため、アルミ箔等で8連チューブ又は96穴プレート上部に簡易的な蓋をすることを推奨します。

(2) 前処理

唾液検体をボルテックスミキサーで10秒間攪拌後、2,000×g以上の遠心力で1分間遠心し、上清をPCR検査の測定試料として用います。

(3) 測定試料及びコントロールの添加

- ① Water, Nuclease freeで10倍希釈したRTmateにて、Control RNA, SARS-CoV-2 (N gene) を100倍希釈します。
- ② 「(2) 前処理」を実施した測定試料を5 μ L分取し、分注済のプレミックスに添加後、5回以上ピペッティングを行い攪拌します。
- ③ 陰性コントロールとしてControl RNA, SARS-CoV-2 (N gene) に付属のWater, Nuclease freeを5 μ L分取し、分注済のプレミックスに添加後、5回以上ピペッティングを行い攪拌します。
- ④ 陽性コントロールとして①で100倍希釈したControl RNA, SARS-CoV-2 (N gene) を5 μ L分取し、分注済のプレミックスに添加後、5回以上ピペッティングを行い攪拌します。
- ⑤ リアルタイムPCR用8連チューブ又は96穴プレートに蓋をし、スピンドウンします。

(4) 測定

使用するリアルタイムPCR装置の電子添文及び取扱説明書に

従って下記の通り設定を行い、測定を実施します。

① 検出波長

検出対象遺伝子	蛍光フィルター	クエンチャー
SARS-CoV-2 N遺伝子	FAM	TAMRA
RNase P (内在性コントロール)	Cy5	None

② 反応液量

25 μL

③ One Step RTリアルタイムPCRサイクル

ステップ	サイクル数	温度	反応時間	蛍光検出
1	1	95℃	2分	OFF
2	1	60℃	10分	OFF
3	45	95℃	5秒	OFF
4		60℃	30秒	ON

(5) データ解析

使用するリアルタイムPCR装置の解析ソフトウェアの取扱説明書に従い、各ウェルのCq値をAuto解析にて算出します。

- ① 各ウェルの増幅曲線の形状を確認し、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。
- ② ベースラインの乱れが認められた場合
当該ウェルのベースライン設定を確認し、ベースラインのエンドポイントが15サイクルより小さい値に設定されていた場合、エンドポイントの値をマニュアルで15サイクルに変更してください。次にAuto解析時に決定したThreshold Lineの値を変更せずに再解析してください。

【測定結果の判定法】

1. コントロール反応の判定法

データ解析後、下記の判定基準を参照し、陰性コントロール反応が陰性を示すこと、及び陽性コントロール反応が陽性を示すことを確認してください。条件を満たさない場合は再検査を行ってください。

○陰性コントロール

		SARS-CoV-2 (FAM)	
		Cq ≤ 40	Cq > 40 又は不検出
RNase P (Cy5)	Cq ≤ 40	再検査	再検査
	Cq > 40 又は不検出	再検査	陰性

○陽性コントロール

		SARS-CoV-2 (FAM)	
		Cq ≤ 40	Cq > 40 又は不検出
RNase P (Cy5)	Cq ≤ 40	再検査	再検査
	Cq > 40 又は不検出	陽性	再検査

2. 測定結果の判定法

Cq値を用いて下記の判定表に従って陽性/陰性を判定してください。

		SARS-CoV-2 (FAM)	
		Cq ≤ 40	Cq > 40 又は不検出
RNase P (Cy5)	Cq ≤ 40	陽性	陰性
	Cq > 40 又は不検出	陽性	再検査

再検査と判定された場合、検体量の不足や劣化、又はPCR阻害の疑いがあります。RNA精製を行う手法での再測定により判定することを推奨します。例えば、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver. 2.9.1」に記載された方法でRNA精製を行った後、「【用法・用量(操作方法)】3.操作法」の「(3)測定試料及びコントロールの添加」の過程で精製RNAを5 μL分取り、分注後のOne Step RTリアルタイムPCR用プレミックスに添加し、再検査を行ってください。

【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、2019年12月に中国湖北省武漢市で確認されて以降、世界的な大流行を引き起こしています。感染拡大の防止には早期診断が重要であり、高感度なPCR検査の需要は非常に高まっています。

本品はOne Step RTリアルタイムPCRによってSARS-CoV-2 RNAを高感度に検出するキットです。耐熱性逆転写酵素を採用したことで、通常であれば事前に行う必要がある唾液検体の熱処理を、リアルタイムPCR装置上で、プログラム開始時に実施することが可能となりました。既存のダイレクトPCR試薬では必要な前処理が不要で、かつ操作が簡便なことから、大量の検体を検査する必要性の高いSARS-CoV-2感染の診断補助に有用と考えられます。

【性能】

1. 感度
 - 自家管理陽性試料(20コピーのSARS-CoV-2 N遺伝子を含む)を測定するとき、陽性を示す。
2. 正確性
 - 自家管理陰性試料を測定するとき、陰性を示す。
 - 自家管理陽性試料(20コピーのSARS-CoV-2 N遺伝子を含む)を測定するとき、陽性を示す。
3. 同時再現性
 - 自家管理陰性試料を3回同時に測定するとき、すべて陰性を示す。
 - 自家管理陽性試料(20コピーのSARS-CoV-2 N遺伝子を含む)を3回同時に測定するとき、すべて陽性を示す。
4. 最小検出感度
 - 20コピー/反応
(アプライドバイオシステムズQuantStudio™ 5 Dx測定)

5. 関連性試験

① 感染研法との比較

唾液検体を用いて、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」に記載されたRNA精製を行う手法(以下、感染研法)との比較試験を行った結果、陽性一致率96.7%、陰性一致率100%、全体一致率98.3%の結果となりました。なお、本試験に使用した陽性検体には、10~20コピーのものが2検体、20~100コピーのものが1検体含まれます。

唾液 (実検体)	感染研法		計	
	陽性	陰性		
本品	陽性	58	0	58
	陰性	2	55	57
計		60	55	115

陽性一致率 96.7% (58/60)、陰性一致率 100% (55/55)
全体一致率 98.3% (113/115)

② コロナウイルス株の確認

複数のコロナウイルス株を含む唾液の陽性検体を用いて、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」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、一致率100%の結果となりました。なお、本試験に使用した陽性検体には、R.1株が3検体、アルファ株 (B.1)

が3検体、デルタ株 (AY.29) が3検体、デルタ株 (AY.122) が1検体、オミクロン株 (BA.1) が3検体、オミクロン株 (BA.2) が3検体、オミクロン株 (BA.5) が3検体含まれます。

③ 感染研法との比較 (精製RNA)

唾液検体から国立感染症研究所「病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver. 2.9.1」に記載された方法で精製されたRNAを用いて、本品と感染研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%、全体一致率100%の結果となりました。

唾液 (実検体)		感染研法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	14	0	14
	陰性	0	16	16
計		14	16	30

陽性一致率 100% (14/14)、陰性一致率 100% (16/16)
全体一致率 100% (30/30)

6. 較正用基準物質

本品の較正用基準物質にはSARS-CoV-2 RNAのN遺伝子を含む人工合成RNAを使用しています。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- ① 検体を取扱う際には、使い捨ての防護ガウン、使い捨て手袋、マスク、ゴーグル等の個人用保護具を着用し、各施設のガイドラインに従って、必要なバイオハザード対策を行ってください。
- ② 試薬が誤って目や口に入った場合は直ちに流水で洗い流し、医師の指示に従ってください。
- ③ 試薬が皮膚や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。

2. 使用上の注意

- ① 本品の貯蔵方法に従って保存し、有効期間内に使用してください。
- ② 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。
- ③ 開封後の試薬は、増幅産物などのコンタミネーションに注意して保管、ご使用ください。
- ④ 試薬の凍結融解は30回までとしてください。
- ⑤ リアルタイムPCR用の容器は使用するリアルタイムPCR装置の推奨品を使用してください。
- ⑥ リアルタイムPCRを行う前に、リアルタイムPCR容器が密閉されていることを確認してください。またPCR容器をスピンドウンした後、内壁への反応液の付着や気泡がないことを確認してください。
- ⑦ 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 試料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廃棄してください。
- ② 検査に用いた器具等は高圧蒸気滅菌器を用いて121℃で20分間以上加熱滅菌処理、又は次亜塩素酸ナトリウム液等で処理を行った上、各施設の感染性廃棄物処理マニュアルに従って処理してください。
- ③ PCR増幅産物は、高圧蒸気滅菌処理は行わないでください。処理を行うとPCR増幅産物によるコンタミネーション発生の原因となります。反応後の容器を密閉したまま廃棄してください。
- ④ 廃棄物の処理に際しては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律等に従ってください。
- ⑤ 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い、適切に分別してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法
-10℃ ~ -25℃
2. 有効期間
18ヵ月

【包装単位】

100反応

【主要文献】

1. 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. 厚生労働省「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針」
3. 国立感染症研究所「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」
4. Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus (Emerging Infectious Diseases Vol. 10, No. 2, February 2004)
5. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Emerging Infectious Diseases Vol. 26, No. 8, August 2020)

【承認条件】

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】

株式会社ニッポンジーン 学術営業課
TEL: 076-451-6548

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

株式会社ニッポンジーン
富山県富山市荒川一丁目1番22号