

RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

12/2013



altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg
Germany

phone +49 40 548 06 76 - 0
fax +49 40 548 06 76 - 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

always a drop ahead.

RealStar[®]

MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0

互換性のある PCR 装置

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene) VERSANT™

kPCR Molecular System AD (Siemens)

ABI Prism[®] 7500 SDS および 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)

LightCycler[®] 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)

Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



RUO 試験研究用



製品 No: 391012



48 テスト・反応分 (rxns)



-25° C ~ -15° C にて保存



2013 年 12 月改定



アルトナ・ダイアグノスティクス (altona Diagnostics GmbH)
Mörkenstraße 12 · D-22767 Hamburg

目次

1.	使用目的	6
2.	キット内容	6
3.	保管	6
4.	キット以外に必要な物品および装置	7
5.	背景情報	8
6.	製品について	9
7.	警告および注意事項	12
8.	使用方法	13
8.1	サンプルの準備	13
8.2	マスターミックスのセットアップ	14
8.3	反応のセットアップ	16
9.	リアルタイム PCR 装置のプログラミング	17
9.1	設定	17
9.2	蛍光検出器(色素)	17
9.3	温度プロファイルと蛍光データの収集	18
10.	データ分析	18
10.1	診断の有効性	19
10.1.1	有効な診断	19
10.1.2	無効な診断	19
10.2	結果の解釈	20

11.	性能評価	22
11.1	分析感度	22
11.2	分析特異性	24
11.3	診断性能の評価	26
11.4	精度	28
12.	制限・注意事項	30
13.	品質管理	31
14.	技術的なサポートについて	31
15.	商標権および免責事項	31
16.	シンボルマークの説明	32

1. 使用目的

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は、リアルタイムPCR技術に基づき、中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV) 特異RNAの定性的検出を行う試験研究用試薬(RUO)です。

2. キット内容

キャップの色	青	紫	青	紫	緑	赤	白
構成成分	マスターA Target <i>orf1a</i>	マスターB Target <i>orf1a</i>	マスターA Target <i>upE</i>	マスターB Target <i>upE</i>	インターナル コントロール	陽性 コントロール	PCR グレードの水
バイアル数	4	4	4	4	1	1	1
容量 [μl/バイアル]	60	120	60	120	1000	250	500

3. 保管

- RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は、ドライアイス詰めで出荷されます。お手元に届いた時点でキット構成成分は凍結した状態であればなりません。受取り時点で構成成分のいずれかが解凍状態であった場合、または輸送中のチューブ破損等がありましたら、アルトナ・ダイアグノスティクス(altona Diagnostics GmbH)までお問い合わせください。
- 受取り後直ちに、すべての構成成分を-20℃で保管してください。
- マスター試薬の凍結融解の繰り返し(2回を超える)は避けるようにしてください。アッセイのパフォーマンスに影響する恐れがあります。複数回に分けてご使用になる場合は、試薬を等分に分注し凍結保存してください。
- +4℃での保管22時間を超えないようにしてください。
- マスターAおよびマスターBは遮光保存してください。

4. キット以外に必要な物品および装置

- 適切なリアルタイムPCR装置(第六章「製品について」を参照)
- 適切な核酸抽出システムまたはキット
- 2ml反応チューブ用のローターが付属した卓上遠心分離機
- 96ウェル反応プレートを使用する場合は、マイクロタイタープレート用のローターが付属した遠心分離機
- ボルテックスミキサー
- 適切な96ウェル反応プレートまたは反応チューブと、それに対応する密閉用材料(オプティカルなもの)
- ピペット(調節可能なもの)
- フィルター付きピペットチップ(ディスポーザブル)
- パウダーフリーのディスポーザブル手袋

注意

! 装置類は製造元の指示および推奨に従い、設置、キャリブレーション、点検、メンテナンスを行うようにしてください。

5. 背景情報

2012年、中東呼吸器症候群コロナウイルス、MERS-CoV(旧名称:ヒトコロナウイルスエラスムス医学センター、HCoV-EMC)がヒトに重症疾病を引き起こす原因ウイルスとして初めて特定されました。[1、2] 以来、中東地域を中心に約150の感染例(2013年10月)が確認されています。[3] ウイルスの検出は下気道から採取したサンプルで行うことが望ましく、上気道サンプル(スワブ)ではウイルス検出率に低下が見られます。[4]

世界保健機関(WHO)は、MERS-CoV 感染例の確定には2つの独立したPCRアッセイを用いることを推奨しています。[5]

様々なリアルタイムRT-PCRアッセイが発表されており、そのうち、*E*遺伝子の上流領域(*upE*)をターゲットとするアッセイ、およびオープンリーディングフレーム1a (*orf1a*)をターゲットとするアッセイの2つのアッセイにおいて最も高い感度が得られています。[6、7] RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は、これら2つのアッセイを基本に開発されました。

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は、新規突然変異あるいは今後予想される変異に強い設計となっていますが、流行株が進化、変異を繰り返した場合には、プライマー/プローブセットのアップグレードが必要になることがあります。変異株に迅速に対応するためには、最新の配列情報の入手が非常に重要です。そのため、本キットをご使用になり少しでも通常と異なる結果が得られた場合には、当社テクニカルサポートへ直接ご連絡くださるようお願い致します。

e-mail: support@altona-diagnostics.com
電話: +49-(0)40-5480676-0

[1] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2012;17:20290.

[2] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N Engl J Med 2012;367:1814–20.

[3] WHO. WHO | Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) summary and literature update – as of 20 September 2013 2013:http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/update_20130920/en/index.html.

[4] Guery B, Poissy J, el Mansouf L, Séjourné C, Ettahar N, Lemaire X, et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. Lancet 2013;381:2265–72.

[5] WHO. Laboratory Testing for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus 2013:http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_Lab_recos_16_Sept_2013.pdf.

[6] Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2012;17.

[7] Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2012;17.

注意

! コロナウイルスの分子進化により、PCR法に基づく検査システムでは本質的リスクとして、経時的に変異が繰り返されることで偽陰性の結果につながる可能性があります。

6. 製品について

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は、リアルタイムPCR技術に基づき、中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV) 特異RNAの定性的検出を行う試験研究用試薬(RUO)です。

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は2つの独立したアッセイで構成されます。ひとつはMERS-CoVゲノムの*E*遺伝子の上流領域(*upE*)をターゲットとし、他方はオープンリーディングフレーム1a (*orf1a*)をターゲットとします。世界保健機関(WHO)は、MERS-CoV感染例の確定には2つの独立したPCR アッセイを用いることを推奨しています。[5]

両アッセイとも、非相同性の増幅システム(インターナルコントロール)を含み、起こりうるRT-PCR阻害の検出や、キットに含まれる試薬の完全性を確認することができます。

本検査は、リアルタイムRT-PCR技術に基づいた検査であり、RNAを相補的DNA (cDNA)に変換する逆転写 (RT) 反応、ターゲットとする特定の配列を増幅するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、そして増幅DNAの検出のためのターゲットに特異的なプローブ、を活用したものです。プローブは蛍光色素 (レポーター色素とクエンチャー色素) で標識されています。

両アッセイにおいて、MERS-CoV RNA特異的プローブは蛍光色素FAMで標識され、インターナルコントロール(IC)のターゲットに特異的なプローブは蛍光色素JOEで標識されています。

異なる色素と結合したプローブを使用することにより、それぞれに対応するリアルタイムPCR装置の検出チャンネルにおいて、MERS-CoV特異RNAとインターナルコントロールの同時検出が可能となっています。

この2つのアッセイに含まれるオリゴヌクレオチドは、以前にビクター・コーマン (Victor Corman) らにより発表されました (2012a[6], 2012b[7])。ひとつのRT-PCRアッセイでは、*orf1a*をターゲットとし (青色のキャップのマスターA、対応する紫色のキャップのマスターB)、他方のRT-PCRアッセイでは*E* 遺伝子の上流領域 (*upE*) をターゲットとします (青色のキャップのマスターA、対応する紫色のキャップのマスターB)。

WHOによる症例定義 (<http://www.who.int/>) では、検査室での症例の確定には、RT-PCRで、別々のターゲットに対する2つの陽性結果が必要であるとしています。RealStar® MERS-CoV RT-PCR キット1.0に含まれる*upE* アッセイおよび*orf1a*アッセイを用いてサンプルの同時検査を行うことにより、検査室でのMERS-CoV症例確定に必要なWHO要件を満たすことができます。

MERS-CoV の分子集合体およびウイルスの進化により、RT-PCR法に基づく検査システムでは本質的リスクとして、経時的に変異が繰り返されることで偽陰性の結果につながる可能性があります。ゲノム上の異なる2つの領域をターゲットとする2つのアッセイを含むことで、こうしたリスクは大幅に軽減されています。キットに含まれる2つのアッセイのうち、片方のみで陽性結果が出た場合にはサンプルを再検査してください。さらに、**確認試験のため、陽性サンプルを国立のリファレンスラボに送付するようにしてください。**

それでもなお、流行株が進化、変異を繰り返した場合には、プライマー/プローブセットのアップグレードが必要になることがあります。

本検査は以下の3つのプロセスで構成されるシングルチューブアッセイです。

- ターゲットとするRNAのcDNAへの逆転写
- ターゲットcDNAおよびインターナルコントロールのPCR増幅
- 蛍光標識プローブによるPCR増幅産物の同時検出

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0は、以下のリアルタイムPCR装置での使用を目的として開発、検証が行われました。

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- Versant™ kPCR Molecular System AD (Siemens)
- ABI Prism® 7500 SDS および 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene™ 3000/6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene Q 5/6 plex Platform (QIAGEN)

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の構成品は以下の通りです。

- マスター試薬4本 (*orf1a*をターゲットとするマスターAおよびマスターB、*upE*をターゲットとするマスターA およびマスターB)
- テンプレートインターナルコントロール (IC)
- 陽性コントロール1本
- PCRグレードの水

マスターA試薬およびマスターB 試薬には、一回の反応セットアップで、逆転写、PCR法による増幅、そしてターゲット (MERS-CoV特異RNAおよびインターナルコントロール) の検出までを行うことができるすべての要素 (バッファー、酵素、プライマー、プローブ) が含まれています。

7. 警告および注意事項

- リアルタイム PCRおよび体外診断の工程について、特別な技術的教育と訓練を受けた方に限り本製品をご使用ください。
- 試料は、常に感染性物質および/またはバイオハザードとして取り扱い、検査室の安全手順に従って処理してください。
- 試料を扱う際は、パウダーフリーの保護手袋（ディスポーザブル）、実験着、セーフティグラスを着用するようにしてください。
- 微生物やヌクレアーゼ(DNase/RNase)による、試料およびキット構成品のコンタミネーションを避けてください。
- 常にDNase/RNaseフリーのエアロゾルバリアピペットチップをお使いください。
- キット構成成分を扱う際は、常にパウダーフリーの保護手袋（ディスポーザブル）を着用するようにしてください。
- ①試料の準備、②反応セットアップ、③増幅/検出の作業には、分離、隔離された作業エリアを使用するようにしてください。検査室でのワークフローは一方方向に流れるようにしてください。各作業エリアでは常にディスポーザブル手袋を着用し、次のエリアに移動する前に交換するようにしてください。
- 器具や機器は各作業エリア専用とし、作業エリア間で移動しないようにしてください。
- 陽性および/または陽性の可能性がある物質は、他のキット構成成分とは別に保管するようにしてください。
- 増幅産物によるコンタミネーションを防ぐため、増幅後の反応チューブ/プレートは開けないようにしてください。
- 地方自治体、州および/または連邦の規制に基づくガイドラインや要求事項、あるいは関係当局によるガイドラインまたは要求事項により、コントロールを用いた追加検査が必要な場合があります。
- 使用期限を過ぎたキット構成成分は使用しないでください。
- サンプルおよびアッセイ廃棄物は、自治体の安全規則に従って廃棄してください。

8. 使用方法

8.1 サンプルの準備

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0では、抽出RNAが出発材料となります。抽出RNAの質は、検査システム全体のパフォーマンスに大きく影響します。必ず、リアルタイム PCR技術と互換性のある核酸抽出システムを使用するようにしてください。

WHOは、MERS-CoVの診断には下気道から採取したサンプルを推奨しています。下気道採取のサンプルが入手できない場合には、上気道から採取したサンプルも使用可能です。[5]

推奨される核酸抽出システムおよびキット

- QIAamp® Viral RNA Mini キット (QIAGEN)

スピンカラムを用いたサンプル準備の工程で、エタノールを含有する洗浄バッファーを使用する場合は、核酸溶出の前に新しいコレクションチューブを用いて約17000xg (~ 13000rpm)で10分間遠心にかける工程を追加してください。

注意

- 抽出効率および抽出核酸の安定性のためにはキャリアRNAの使用が重要になります。**
- エタノールは、リアルタイムPCRでは強力な阻害物質となります。サンプル準備に使用するシステムにおいて、エタノールを含有する洗浄バッファーを使用する場合は、核酸溶出の前にエタノールを完全に除去するようにしてください。**

前処理およびサンプル準備の詳細や技術的サポートについては当社テクニカルサポートまでお問い合わせください。

e-mail: support@altona-diagnostics.com
電話: +49-(0)40-5480676-0

8.2 マスターミックスのセットアップ

ご使用前にすべての試薬とサンプルを完全に解凍し、混和後（ピペッティングまたは緩やかなボルテックスにて）、短く遠心にかけてください。

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0に含まれる両アッセイには、非相同性のインターナルコントロール (IC) が含まれており、RT-PCR阻害の有無を判別するコントロールとして使用することができます。また、サンプル準備工程（核酸抽出）でのコントロールおよびRT-PCR阻害のコントロールの両方の目的で使用することも可能です。

- インターナルコントロール (IC) を、サンプル準備工程でのコントロールとしてではなく、RT-PCR阻害判別用コントロールとしてのみ使用する場合、以下のピペッティングスキームに従ってマスターミックスをセットアップしてください。

反応回数 (rxns)	1	12
マスターA (<i>orf1a</i> または <i>upE</i>)	5 µl	60 µl
マスターB (<i>orf1a</i> または <i>upE</i>)	10 µl	120 µl
インターナルコントロール	1 µl	12 µl
マスターミックスの容量	16 µl	192 µl

インターナルコントロール (IC) を、サンプル準備工程のコントロールおよびRT-PCR阻害のコントロールの両方の目的で使用する場合は、インターナルコントロール (IC) を核酸抽出過程で加えるようにしてください。

- 核酸抽出の方法またはシステムの種類に関わらず、インターナルコントロール (IC) は試料に直接添加しないでください。インターナルコントロール (IC) は、常に試料と溶解バッファーの混合物に対して加えるようにしてください。インターナルコントロール (IC) の添加量は溶出容量により決まり、溶出容量の10%相当となります。例えば、核酸を60µlの溶出バッファー、または水に溶出する場合、サンプルあたり6µlのインターナルコントロール (IC) を試料/溶解バッファー混合物に添加してください。

注意

 **試料に直接インターナルコントロール (IC) を添加しないでください!**

- インターナルコントロール (IC) をサンプル準備工程で加える場合、以下のピペッティングスキームに従ってマスターミックスをセットアップしてください。

反応回数 (rxns)	1	12
マスターA (<i>orf1a</i> または <i>upE</i>)	5 µl	60 µl
マスターB (<i>orf1a</i> または <i>upE</i>)	10 µl	120 µl
マスターミックスの容量	15 µl	180 µl

8.3 反応のセットアップ

- 適切な96ウェルオプティカル反応プレートの必要な分の各ウェル、または反応チューブ(オプティカルなもの)に、ピペットを使ってマスターミックスを15μlずつ注入してください。
- サンプル(核酸抽出による溶出物)10μl、または各コントロール(陽性または陰性コントロール)10μlを加えてください。
- 1回のランにつき、各陽性コントロールと、少なくとも一種類の陰性コントロールを使用するようにしてください。
- ピペッティング操作で吸い上げ、排出を行い、サンプルまたはコントロールをマスターミックスと十分に混和させてください。
- 適切な粘着性フィルム(オプティカルなもの)を使って96ウェル反応プレートを密閉し、反応チューブは適切なキャップで閉じてください。
- マイクロタイタープレート用のローターが付属した遠心分離機を使用し、96ウェル反応プレートを約1000xg(～3000rpm)で30秒間遠心してください。

反応セットアップ	
マスターミックス	15 μl
サンプルまたはコントロール	10 μl
総容量	25 μl

9. リアルタイム PCR装置のプログラミング

非推奨のリアルタイムPCR装置のセットアップおよびプログラミングに関する基本情報は、各製品のマニュアルをご参照ください。

推奨するリアルタイムPCR装置でRealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0を使用する場合のプログラミングの詳細については、当社テクニカルサポートまでお問い合わせください。

9.1 設定

- 以下のように設定を行ってください。

設定	
反応容量	25 μl
ランプ・レート	デフォルト
パッシブリファレンス	なし

9.2 蛍光検出器(色素)

- 蛍光検出器(色素)を以下のように設定してください。

検出	ディテクター ネーム	レポーター	クエンチャー
MERS-CoV A 特異RNA (<i>orf1a</i>)	<i>orf1a</i>	FAM	(なし)
MERS-CoV B 特異RNA (<i>upE</i>)	<i>upE</i>	FAM	(なし)
インターナルコントロール(IC)	IC	JOE	(なし)

9.3 温度プロファイルと蛍光データの収集

- 温度プロファイルと蛍光データの収集について設定を行ってください。

	ステージ	サイクル数	蛍光データ 収集	温度	時間
逆転写	ホールド	1	-	55 ° C	20 分
変性	ホールド	1	-	95 ° C	10 分
増幅	サイクリング	45	-	95 ° C	15 秒
			✓	58 ° C	45 秒
			-	72 ° C	15 秒

10. データ分析

推奨するリアルタイムPCR装置でのデータ分析に関する基本的情報は、各製品のマニュアルをご参照ください。

非推奨のリアルタイムPCR装置でRealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0を使用する場合のデータ分析の詳細については、当社テクニカルサポートまでお問い合わせください。

10.1 診断の有効性

10.1.1 有効な診断

診断用として有効であるためには、コントロールで以下の条件を満たす必要があります。

コントロール ID	RealStar® MERS-CoV RT-PCR キット 1.0			
	<i>upE</i> アッセイ		<i>orf1a</i> アッセイ	
	FAM 検出チャンネル	JOE 検出チャンネル	FAM 検出チャンネル	JOE 検出チャンネル
陽性コントロール	陽性	陽性	陽性	陽性
陰性コントロール	陰性	陽性	陰性	陽性

10.1.2 無効な診断

以下の場合、測定は診断用として無効です。

- 測定が完了しない。
- 上記の有効な測定に関するコントロールの条件のうち、いずれかを満たさない。

測定が無効な場合は、精製した核酸の残りを使用して再テストを行うか、または元試料から検査をやり直してください。

10.2 結果の解釈

サンプル ID	RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0				結果の解釈
	upE アッセイ		orf1a アッセイ		
	FAM	JOE	FAM	JOE	
A	陽性	陽性*	陽性	陽性*	MERS-CoV upE および orf1a 特異 RNA が検出されました。確認試験のため陽性サンプルを国立のリファレンスラボに送付してください。
B	陽性	陽性*	陰性	陽性*	MERS-CoV upE 特異 RNA が検出されました。MERS-CoV orf1a 特異 RNA は検出されませんでした。テストを繰り返してください。確認試験のため陽性サンプルを国立のリファレンスラボに送付してください。
C	陰性	陽性*	陽性	陽性*	MERS-CoV orf1a 特異 RNA が検出されました。MERS-CoV upE 特異 RNA は検出されませんでした。テストを繰り返してください。確認試験のため陽性サンプルを国立のリファレンスラボに送付してください。

サンプル ID	RealStar® MERS-CoV RT-PCR キット 1.0				結果の解釈
	upE アッセイ		orf1a アッセイ		
	FAM	JOE	FAM	JOE	
D	陰性	陽性	陰性	陽性	MERS-CoV upE および orf1a 特異 RNA は検出されませんでした。サンプルは検出可能な量の MERS-CoV 特異 RNA を含んでいません。
E	陰性	陰性	陰性	陰性	RT-PCR 阻害、または試薬に不具合があります。元試料からテストを繰り返すか、または新しいサンプルを採取し再テストしてください。

* FAM 検出チャンネルでの陽性結果について、JOE 検出チャンネルでのインターナルコントロールの検出は必要要件ではありません。サンプル中の MERS-CoV 量が多い場合、インターナルコントロールシグナルが減弱、または消失する可能性があります。

11. 性能評価

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の性能評価は、ドイツ・ボン大学医療センター、ウイルス学教授のクリスチャン・ドローステン博士（Prof. Dr. Christian Drosten, Department of Virology, University of Bonn Medical Center, Bonn, Germany）のグループのコロナウイルス専門家らと共同で実施しました。ドイツ、ミュンヘンでの輸入症例から採取した患者サンプル、および細胞培養から抽出したMERS-CoV RNAを特徴の明らかな陽性物質として用いました。MERS-CoV upE および $orf1a$ に特異的な既知濃度の $in vitro$ 転写産物を定量的な目的で用いました。

11.1 分析感度

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の分析感度を、陽性率95%以上で検出可能な $orf1a$ 特異または upE 特異RNA分子の濃度（溶出液1 μ lあたりのコピー数）として定義しました。分析感度は、 $orf1a$ および upE に特異的な既知濃度の $in vitro$ 転写産物（IVT）の希釈液を分析することにより測定しました。

表 1: RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0、 $orf1a$ 特異システムの分析感度の計算に使用したRT-PCR結果

インプット濃度 [コピー数/ μ l]	レプリカ数	陽性サンプル数	検出率 [%]	インターナル コントロール
10.000	13	13	100	有効
3.162	13	13	100	有効
1.000	13	12	92	有効
0.316	13	7	54	有効
0.100	13	1	7.7	有効
0.032	13	1	7.7	有効
0.010	13	0	0	有効
0.003	13	0	0	有効
NTC	13	0	0	有効

表 2: RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0、 upE 特異システムの分析感度の計算に使用したRT-PCR結果

インプット濃度 [コピー数/ μ l]	レプリカ数	陽性サンプル数	検出率 [%]	インターナル コントロール
10.000	13	13	100	有効
3.162	13	13	100	有効
1.000	13	13	100	有効
0.316	13	6	46	有効
0.100	13	3	23	有効
0.032	13	0	0	有効
0.010	13	0	0	有効
0.003	13	0	0	有効
NTC	13	0	0	有効

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の分析感度の測定にはプロビット解析を用いました。*orf1a*特異システムの分析感度は0.93コピー/μl(95%信頼区間:0.70~1.41コピー/μl)に達し、*upE*特異システムにおいては0.54コピー/μl(95%信頼区間:0.40~0.97コピー/μl)となりました。

11.2 分析特異性

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキットの分析特異性は、慎重に選定されたオリゴヌクレオチド(プライマーおよびプローブ)により確保されています。すべての既知のMERS-CoV変異株を確実に検出できるようにするため、本キットのオリゴヌクレオチドと、一般的に入手可能な配列との配列比較分析が行われました。

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の分析特異性の評価として、MERS-CoV近縁病原体および/またはMERS-CoVと類似の症状を引き起こしうる病原体から抽出したゲノムRNA/DNAパネルを本キットを用いて検査しました。

表 3: RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の分析特異性を示す目的で検査した有機体

有機体	RealStar® MERS-CoV RT-PCR Kit 1.0		
	FAM (<i>upE</i>)	FAM (<i>orf1a</i>)	JOE (IC)
コロナウイルス NL63 (n=2)	陰性	陰性	有効
コロナウイルス OC43 (n=2)	陰性	陰性	有効
コロナウイルス 229E (n=2)	陰性	陰性	有効
コロナウイルス HKU-1 (n=1)	陰性	陰性	有効
インフルエンザ A 型/H3N2 (n=2)	陰性	陰性	有効
インフルエンザ A 型/H1N1 (n=2)	陰性	陰性	有効
インフルエンザ B 型(n=2)	陰性	陰性	有効
エンテロウイルス (n=3)	陰性	陰性	有効
ライノウイルス (n=5)	陰性	陰性	有効
パラインフルエンザ 1 型 (n=2)	陰性	陰性	有効
パラインフルエンザ 2 型 (n=3)	陰性	陰性	有効
パラインフルエンザ 3 型 (n=2)	陰性	陰性	有効
パラインフルエンザ 4 型 (n=2)	陰性	陰性	有効
RS ウイルス (n=5)	陰性	陰性	有効
ヒト・メタニューモウイルス (n=2)	陰性	陰性	有効

RealStar® MERS-CoV RT-PCR キット1.0では、上記の特定の有機体との交差反応は認められませんでした。

11.3 診断性能の評価

ドイツ・ボン大学医療センターウイルス学研究所にて、RealStar® MERS-CoV RT-PCRキットの診断性能の評価を実施しました。

1名の患者から採取した19の異なるサンプルをインハウスの*upE* 特異アッセイおよび*orf1a* 特異アッセイ、RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の*upE* 特異アッセイおよび*orf1a* 特異アッセイで分析しました。検査サンプルのうち、8サンプルはインハウスアッセイとRealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の両方で陽性結果を示し、7サンプルはインハウスアッセイとRealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の両方で陰性を示しました。4サンプルに関しては結果に相違が見られました(3サンプルはRealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0においてのみ陽性、1サンプルはインハウスアッセイにおいてのみ陽性)。こうした相違は、高Ct値を示したウイルス量が極めて低いサンプルにおいて発生していることから、両アッセイの感度の差というより、検出限界における統計的変動によるものであると考えられます。

表 4: インハウスの MERS-CoV 特異 RT-PCR、および RealStar® MERS-CoV RT-PCR キット 1.0 で検査した患者サンプル

サンプル	発症後 日数	インハウス (<i>upE</i>) ¹	RealStar® MERS-CoV (<i>upE</i>) ¹	RealStar® MERS-CoV (<i>orf1a</i>) ¹
吸引チューブ (PBSにて洗 浄後のもの)	16	40.00	40.00	37.74
吸引チューブ、フィルター部	16	35.80	35.00	36.17
BAL (気管支肺胞洗浄)	12	34.06	31.82	32.44
BAL (気管支肺胞洗浄)	12	34.96	32.67	33.16
BAL (気管支肺胞洗浄)	14	35.99	34.60	34.82
BAL (気管支肺胞洗浄)	13	-	-	-
滲出液、口腔 ²	16	-	36.60	-
滲出液、口腔	16	-	-	-
滲出液、口腔	16	-	-	-
滲出液、鼻腔 ³	16	38.38	-	-
滲出液、鼻腔 ²	16	-	40.00	40.00
滲出液、口腔	16	-	-	-
便	12	38.98	31.69	31.78
便	12	39.37	40.00	-
便	16	40.00	40.00	-
尿 ²	12	-	40.00	37.86
尿 (カテーテル)	12	-	-	-
尿 (カテーテル)	13	-	-	-
中心静脈カテーテル (洗浄後のもの)	12	-	-	-

¹ 表中の数字は、陽性結果が出たリアルタイム RT-PCR ランの各 Ct 値を示す。

² 商業用アッセイにおいてのみ陽性結果が出たもの

³ インハウスアッセイにおいてのみ陽性結果が出たもの

11.4 精度

RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0の精度データの作成にあたり、アッセイ内変動(実験内での変動性)、アッセイ間変動(実験間での変動性)、およびロット間変動(異なる製品ロット間での変動性)を測定しました。

変動性データを、Ct値をもとに平均値、標準偏差、分散および変動係数によって表わしました。アッセイ内変動、アッセイ間変動、およびロット間変動について、サンプルあたり少なくとも6レプリカの分析を行い、これら3つの分析結果を合わせ全分散を計算しました。

表 5: RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0のMERS-CoV特異システムに関する精度データ

精度		Ct値平均	標準偏差	分布	変動係数(%)
アッセイ内変動	<i>orf1a</i> 特異システム	28.96	0.084	0.007	0.29
	<i>upE</i> 特異システム	29.35	0.084	0.007	0.28
アッセイ間変動	<i>orf1a</i> 特異システム	28.69	0.310	0.096	1.08
	<i>upE</i> 特異システム	29.43	0.118	0.014	0.40
Lot間変動	<i>orf1a</i> 特異システム	28.49	0.141	0.020	0.49
	<i>upE</i> 特異システム	29.14	0.391	0.153	1.34
全分布	<i>orf1a</i> 特異システム	28.71	0.178	0.041	0.62
	<i>upE</i> 特異システム	29.31	0.194	0.058	0.67

表 6: RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット1.0のインターナルコントロールに関する精度データ(Ct値)

精度		Ct値平均	標準偏差	分布	変動係数(%)
アッセイ内変動	インターナルコントロール	29.39	0.160	0.030	0.56
アッセイ間変動	インターナルコントロール	29.80	0.558	0.312	1.87
Lot間変動	インターナルコントロール	29.72	0.632	0.400	2.13
全分布	インターナルコントロール	29.64	0.450	0.247	1.52

12. 制限・注意事項

- リアルタイムPCRおよび試験研究(RUO)の工程について、特別な技術的教育と訓練をうけた方に限り本製品をご使用ください。
- 本アッセイで適切なパフォーマンスを得るためには、検査室での優れた実践法が不可欠です。キット構成および反応セットアップでの純度の保持には十分にご注意ください。不純物混入やコンタミネーションに関して、すべての試薬の管理を厳重に行ってください。疑わしい試薬は廃棄してください。
- 本検査で最適なパフォーマンスを得るためには、試料の採取、輸送、保管および処理手順が適切に行われる必要があります。
- 本アッセイは試料に直接使用しないでください。本アッセイをご使用になる前に適切な核酸抽出法を実施する必要があります。
- RT-PCR阻害物質が存在する場合、偽陰性の結果、または無効な結果が出る可能性があります。
- 本検査のプライマーおよび/またはプローブがカバーするウイルスゲノムのターゲット領域内で変異が起こる可能性があります、その場合病原体の存在を検出できないことがあります。
- 他の診断検査と同様、RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット 1.0 による結果については、あらゆる臨床所見および検査所見を考慮の上、判断を行うようにしてください。

13. 品質管理

アルトナ・ダイアグノスティクス(altona Diagnostics GmbH)社の、ISO EN 13485 認証を取得した品質管理システムのもと、RealStar® MERS-CoV RT-PCRキット 1.0 の各ロットは既定の製品仕様に照らし検査され、それにより一貫した製品品質が確保されています。

14. 技術的なサポートについて

カスタマーサポートについては当社テクニカルサポートまでお問い合わせください。

e-mail:	support@altona-diagnostics.com
電話:	+49-(0)40-5480676-0

15. 商標権および免責事項

RealStar® (アルトナ・ダイアグノスティクス: altona Diagnostics GmbH)、Mx 3005P™ (Stratagene)、ABI Prism® (Applied Biosystems)、LightCycler® (Roche)、Rotor-Gene™、QIAamp® (QIAGEN)、VERSANT™ (Siemens)

本文書内で使用されている登録商標または商標等は、特に記載のない場合においても法律による保護の対象となります。

RealStar® MERS-CoV RT-PCR キット 1.0 は、試験研究用試薬(RUO)に関するEU指令 98/79/ECに基つきCEマークを取得した診断キットです。

お住まいの国により本製品を入手いただけない場合があります。


© 2013 altona Diagnostics GmbH; all rights reserved.

16. シンボルマークの説明


RUO 試験研究用試薬(RUO)


REF 製品番号

LOT バッチコード


 n 回分のテスト・反応に十分な量を含む (rxns)

 温度範囲

 バージョン

 使用期限

 注意

 ご使用に際しお問い合わせください

 製造元

メモ