

BD MAX を用いた 2019-nCoV 検出 ～ One step RT real-time PCR による検査手順書 ～

文書番号:SOP_COVID-19_v.6.0

作成日:2020/02/20

改訂日:2020/04/28

東邦大学医学部微生物・感染症学講座

(v.5.2 からの変更点)

- セット N2 のみの single-plex PCR に変更し、対応する文章を修正しました。
 - セット N が N2 に比較して低感度であるため。
- PCR 条件を改善（サイクル数 45→35, アニーリング/伸長時間の短縮）しました。
 - 非特異反応による偽陽性判定の回避を目的とした変更。
 - LOD および陽性コントロール希釈系列の検討により直線性に影響がないことを確認済み。

はじめに

本プロトコールは国立感染症研究所ホームページで公開されている「病原体検出マニュアル 2019-nCoV」(<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200214.pdf>) を参考に、リアルタイム RT PCR による検出系を BD MAX (日本ベクトン・ディッキンソン) による測定のために最適化したものである。v.5.2 以前は検出標的のセット N およびセット N2 を異なる標識を付して multiplex 化していたが、セット N の検出感度が低いことからセット N2 のみの single-plex とした。なお、この手順書に示す方法で COVID-19 を検査した場合の検出限界値は、「病原体マニュアル 2019-nCoV」に準じて実施された結果と同等であることを確認した (16 コピー/反応)。

COVID-19 の検査実施時の注意事項

1. 検査担当者の感染防止に配慮しなければならない。
検査実施者(検体受付業務担当者を含む)は必要に応じてビニールエプロン、グローブ、サージカルマスク、ゴーグル、およびキャップなどの個人防護具(PPE)を適切に着脱しなければならない。PPEの着脱は必ず二人一組で行い、お互い監視しあわなければならない。検体処理および検体の分注作業はバイオセーフティキャビネット内で行わなければならない。手指消毒液、消毒用アルコールおよび次亜塩素酸水を用いて適切に消毒を行わなければならない。汚染の可能性がある作業をする実験台の天板は、ポリエチレン濾紙を貼り、非汚染区域と区画しなければならない。
作業終了後、ポリエチレン濾紙は医療廃棄物として処理しなければならない。
2. 非検査担当者への感染防止に配慮しなければならない。
汚染区域と非汚染区域は非検査担当者にそれが分かるように示さなければならない。実験室の出入りの際は手指消毒に努めなければならない。
3. 検体間の交叉汚染防止に十分に配慮しなければならない。
検体受付、検体処理から検出までの導線は一方向でなければならない。したがって、検体受付、検体処理や搬送された検体の容器を廃棄する汚染区域、PCR マスターミックスを調整する清浄区域、BD MAX で測定済みのストリップやサンプルチューブなどを廃棄するための領域は同一区画であってはならない。
検体処理や PCR マスターミックスなどの調整・分注に用いるマイクロピペットのチップはフィルター付きのチップを使用しなければならない。
検体が収められていた 1 次容器、スワブ、検体を採取したスポイドなどは滅菌した後に廃棄しなければならない。
4. 精度管理をしなければならない。
内部精度管理は、100 コピー/反応程度の陽性コントロール RNA(後述)を用いて、検査の都度、毎回実施しなければならない。
検査に用いる全ての器具や機器は校正済のものでなければならない。
検査を実施する部屋は、検査開始前後に室温、湿度を記録しなければならない。

目次

○必要設備/物品

○必要試薬/消耗品

○Primer set および TaqMan probe の塩基配列と標的におけるポジション

○BD MAX (本体) の準備

○ポジティブコントロール RNA の調整方法

○PCR プログラムの登録 (初回のみ)

○検体受付

○BD MAX ExK TNA-3 (以下、ストリップ) セット～PCR mixture 調整～検体セット

○BD MAX への検体登録およびラン開始

○精度管理

○必要設備/物品

- BD MAX
- マイクロピペット
- RNase-free フィルター付きチップ
- RNase-free マイクロチューブ

○必要試薬/消耗品

- 検体（鼻腔/咽頭拭いスワブ）
- 陽性コントロール溶液
- BD MAX ExK TNA-3 (Swabs)
- BD MAX Cartridge
- BD MAX TNA MMK (SPC)
- PCR primer set
- TaqMan probe
- ポジティブコントロール
- ポリエチレン濾紙

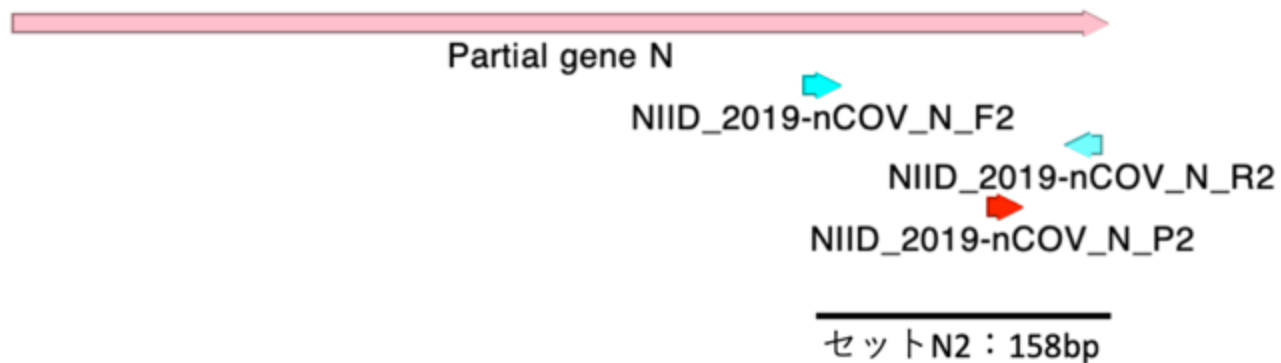
○Primer set および TaqMan probe の塩基配列と標的におけるポジション

セット N2

Primer/Probe	Sequence (5' - 3')	保存濃度	最終濃度/反応
NIID_2019-nCOV_N_F2	AAATTTTGGGGACCAGGAAC	50 μ M	500nM
NIID_2019-nCOV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC	50 μ M	700nM
NIID_2019-nCOV_N_P2	[FAM]-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-[BHQ1]	10 μ M	200nM

増幅産物長: 158bp

図 1. プライマーおよびプローブの位置関係




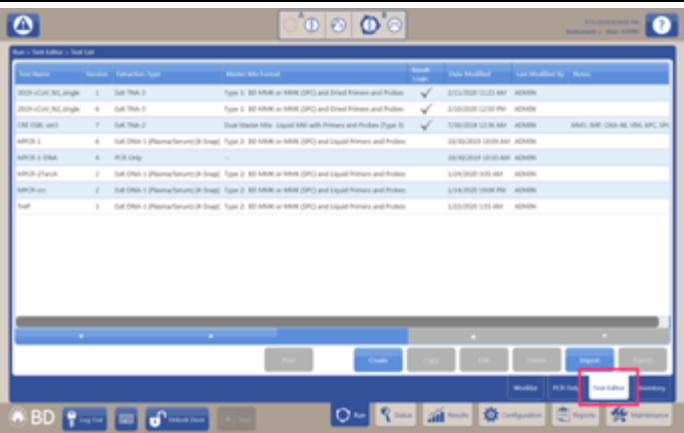
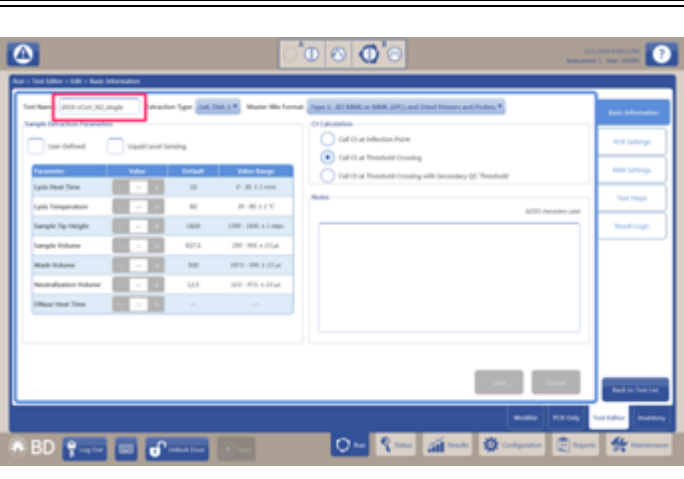
○陽性コントロール RNA の調整方法

1. 上述の標的部位を含む委託合成した partial gene N の相補 DNA をテンプレートに *in vitro* Transcription T7 Kit (TaKaRa) により RNA を得る。
2. RNA を RNAClean XP (ベックマン・コールター) により精製する。
3. Qubit により RNA 濃度を測定
4. RNA 長 (約 700bp) と RNA 濃度からコピー数を算出 (使用ツール: NEBioCalculator [<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ssrnaamt>])
5. Carrier RNA (QIAGEN) および RNase inhibitor (Thermo Fisher Scientific) 添加 DEPC 水で 10^7 コピー/ μL に希釈
6. RNase-free チューブに $100\ \mu\text{L}$ ずつ分注後、 -80°C で保管
7. そのうちの一部を 10^5 コピー/ μL に希釈し、 $20\ \mu\text{L}$ ずつに分注して、 -80°C で保管
8. 一度溶解した RNA は破棄

○BD MAX (本体) の準備

1. 本体電源を入れる
2. PC 電源を入れる
3. ログインする


○PCRプログラムの登録 (初回のみ)

1	右下メニューから「Run」を選択	
2	「Test Editor」を選択	
3	「Test Name」に任意の名前を入力し、「Extraction Type」で「ExK TNA-3」、「Master Mix Format」で「Type 1: BD MMK or MMK (SPC) and Liquid Primers and Probes」を選択	

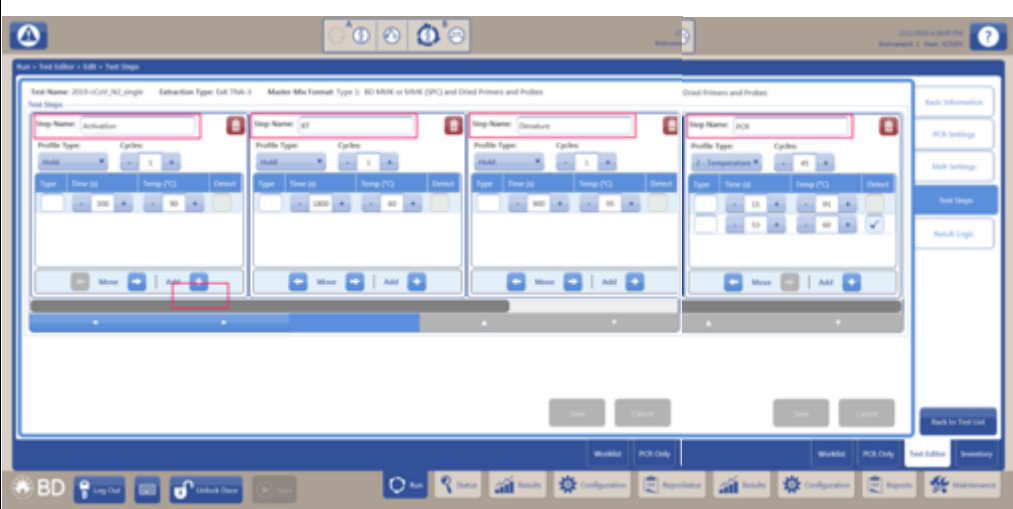
4 右側タブで「PCR setting」を選択
Wavelength
「475/520」Alias に
「NIID_N2」、
「680/715」に「spc」
などを入力する
(Alias に入力する
名称は任意)




5 Alias を入力した項
目の「PCR Gain」は
「50」
Threshold は「spc」
および「NIID_N2」を
「100」にセット

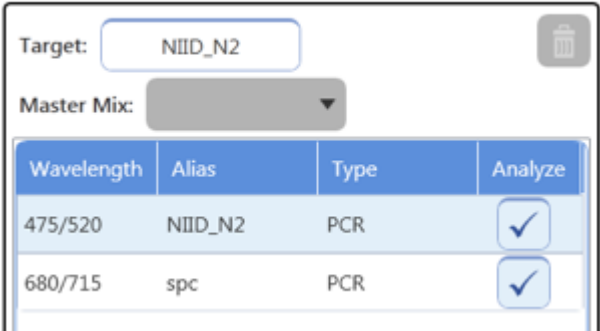
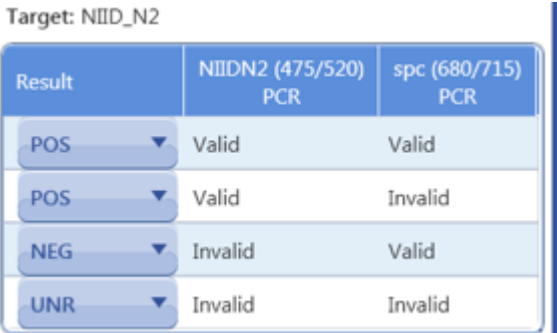


6 「Test Step」を選択
し、「Add」をクリック
して step を増や
す。「Step Name」
は「Activation」、
「RT」、
「Denature」、
「PCR」などとする。



7 「Activation」は
「Cycle」:1、
「Time」:300s、
「Temp (°C)」:90
「RT」は「Cycle」:
1、「Time」:600s、
「Temp (°C)」:60
「Denature」は
「Cycle」:1、



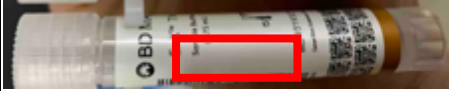
	<p>「Time」: 60s、 「Temp (°C)」: 95</p> <p>「PCR」は「Cycle」: 35、 上段「Time」: 3s、 「Temp (°C)」: 95 下段「Time」: 9.1s、 「Temp (°C)」: 56</p> <p>(システム上、時間 にキリのよい数字 が使えない事があ る。指示に従って 修正。)</p> <p>下段の「Detect」に チェック</p>																
8	<p>「Result Logic」を選 択し、右図のよう に設定</p>	 <table border="1" data-bbox="432 1160 1023 1335"> <thead> <tr> <th>Wavelength</th> <th>Alias</th> <th>Type</th> <th>Analyze</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>475/520</td> <td>NIID_N2</td> <td>PCR</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>680/715</td> <td>spc</td> <td>PCR</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> </tbody> </table>	Wavelength	Alias	Type	Analyze	475/520	NIID_N2	PCR	<input checked="" type="checkbox"/>	680/715	spc	PCR	<input checked="" type="checkbox"/>			
Wavelength	Alias	Type	Analyze														
475/520	NIID_N2	PCR	<input checked="" type="checkbox"/>														
680/715	spc	PCR	<input checked="" type="checkbox"/>														
9	<p>「Edit Logic」をクリ ックし、右図のよ うに設定</p>	 <table border="1" data-bbox="432 1417 975 1700"> <thead> <tr> <th>Result</th> <th>NIIDN2 (475/520) PCR</th> <th>spc (680/715) PCR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>POS</td> <td>Valid</td> <td>Valid</td> </tr> <tr> <td>POS</td> <td>Valid</td> <td>Invalid</td> </tr> <tr> <td>NEG</td> <td>Invalid</td> <td>Valid</td> </tr> <tr> <td>UNR</td> <td>Invalid</td> <td>Invalid</td> </tr> </tbody> </table>	Result	NIIDN2 (475/520) PCR	spc (680/715) PCR	POS	Valid	Valid	POS	Valid	Invalid	NEG	Invalid	Valid	UNR	Invalid	Invalid
Result	NIIDN2 (475/520) PCR	spc (680/715) PCR															
POS	Valid	Valid															
POS	Valid	Invalid															
NEG	Invalid	Valid															
UNR	Invalid	Invalid															
10	<p>「Save」をクリック エラーが表示され たら、指示に従って 修正して Save</p>																

○検体受付

少なくとも3人を要する(検体を取扱う者、検体送付票の検体番号を読み上げる者、および検体リストに情報を記載する者)。検体の外装は汚染されているものとして取扱う。梱包から取り出す作業は適切なPPEを装着した者が実施する。ベンチの汚染には注意し、ディスポーザブルクロスを敷いて実施する。終了後は、クロスを破棄する。


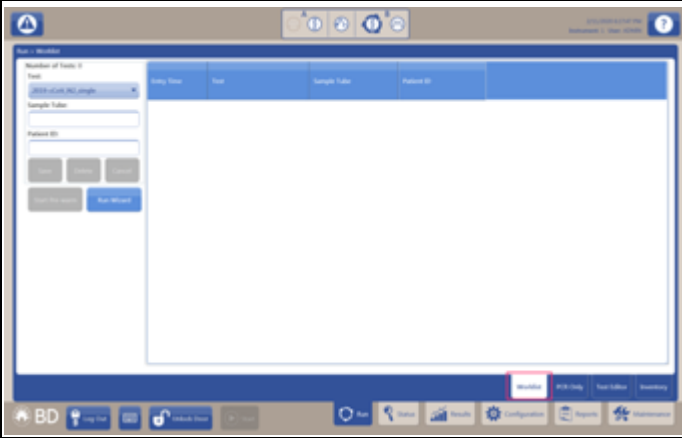
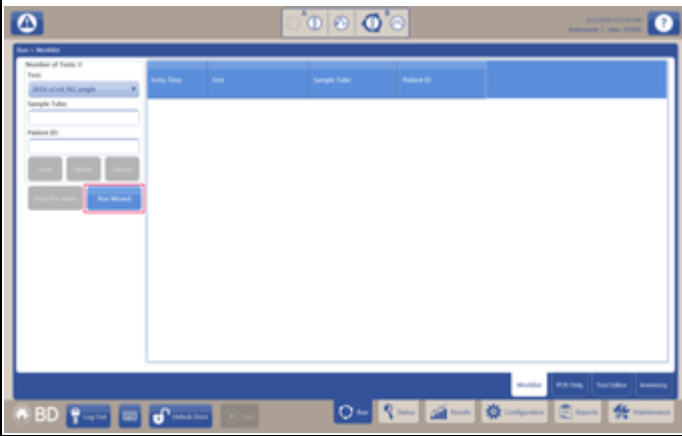
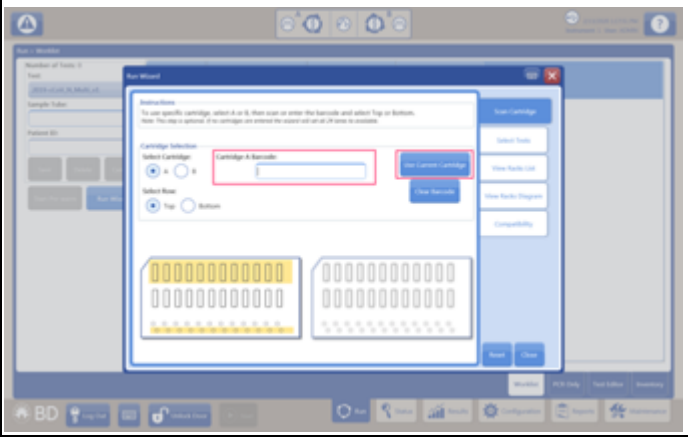
1	PPE 装着	マスク、グローブ、ガウン等																								
2	梱包を解き、取り扱い易い順番に並べる																									
3	検体リストにある検査番号を、検体チューブに付す (簡易的に区別出来ればよい)	<p style="text-align: center;">BD MAX COVID-19 検査検体リスト (検査台帳) 検査実施場</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Seq no. (検査番号)</th> <th>受付 年/月/日</th> <th>受付時刻</th> <th>受付 担当者</th> <th>依頼元 管理番号</th> <th>検査材料 (○を付す)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>COV0001</td> <td>/ /</td> <td>:</td> <td></td> <td></td> <td>スワブ・喀痰 ・他()</td> </tr> <tr> <td>COV0002</td> <td>/ /</td> <td>:</td> <td></td> <td></td> <td>スワブ・喀痰 ・他()</td> </tr> <tr> <td>COV0003</td> <td>/ /</td> <td>:</td> <td></td> <td></td> <td>スワブ・喀痰 ・他()</td> </tr> </tbody> </table>	Seq no. (検査番号)	受付 年/月/日	受付時刻	受付 担当者	依頼元 管理番号	検査材料 (○を付す)	COV0001	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()	COV0002	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()	COV0003	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()
Seq no. (検査番号)	受付 年/月/日	受付時刻	受付 担当者	依頼元 管理番号	検査材料 (○を付す)																					
COV0001	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()																					
COV0002	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()																					
COV0003	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()																					
4	検体リストに「受付年月日」、「受付時間」、「受付担当者」、「依頼元管理番号」、「検査材料」を記録	<p style="text-align: center;">BD MAX COVID-19 検査検体リスト (検査台帳) 検査実施場</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Seq no. (検査番号)</th> <th>受付 年/月/日</th> <th>受付時刻</th> <th>受付 担当者</th> <th>依頼元 管理番号</th> <th>検査材料 (○を付す)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>COV0001</td> <td>/ /</td> <td>:</td> <td></td> <td></td> <td>スワブ・喀痰 ・他()</td> </tr> <tr> <td>COV0002</td> <td>/ /</td> <td>:</td> <td></td> <td></td> <td>スワブ・喀痰 ・他()</td> </tr> <tr> <td>COV0003</td> <td>/ /</td> <td>:</td> <td></td> <td></td> <td>スワブ・喀痰 ・他()</td> </tr> </tbody> </table>	Seq no. (検査番号)	受付 年/月/日	受付時刻	受付 担当者	依頼元 管理番号	検査材料 (○を付す)	COV0001	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()	COV0002	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()	COV0003	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()
Seq no. (検査番号)	受付 年/月/日	受付時刻	受付 担当者	依頼元 管理番号	検査材料 (○を付す)																					
COV0001	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()																					
COV0002	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()																					
COV0003	/ /	:			スワブ・喀痰 ・他()																					

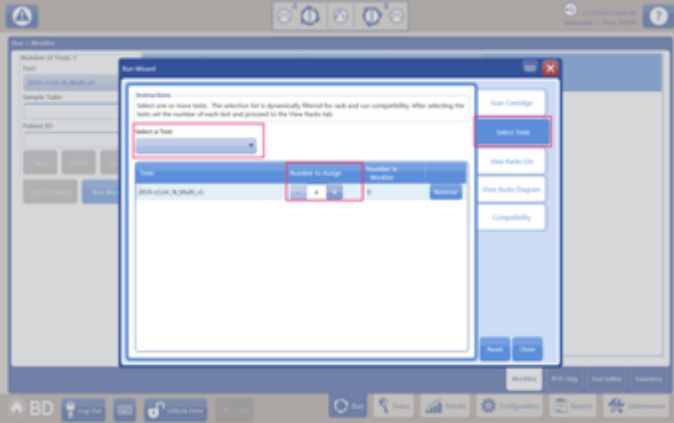
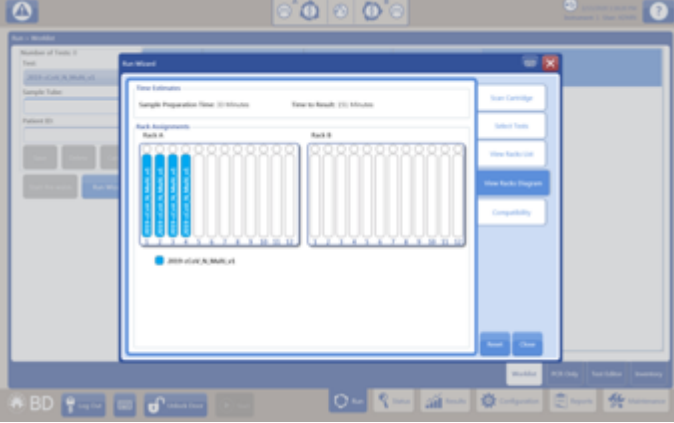

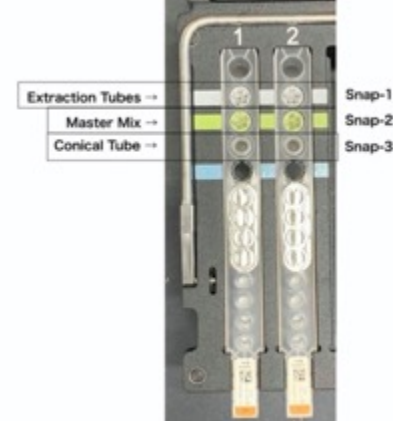
○検体処理（セーフティキャビネット内）

		BD MAX COVID-19 検査検体リスト (検査台帳) 検査実施場					
		Seq no. (検査番号)	受付 年/月/日	受付時刻	受付 担当者	依頼元 管理番号	検査材料 (○を付す)
1	BD MAX の「Sample buffer tube」に検体番号を付す ※バーコード上に被らないように注意	COV0001	/	:			スワブ・喀痰 ・他()
		COV0002	/	:			スワブ・喀痰 ・他()
		COV0003	/	:			スワブ・喀痰 ・他()
							
2a-1 [スワブ懸濁液の場合]	750 μL のスワブ懸濁液を「Sample buffer tube」に加える						
2b-1 [スワブの場合]	500 μL の DEPC 水を 1.5mL の RNase-free tube に分注						
2b-2	DEPC 水にスワブを懸濁						
2b-3	スピンドウン						
2b-4	全量のスワブ懸濁液を「Sample buffer tube」に加える						
2c-1 [喀痰の場合]	1.5mLRNase-free チューブに約 200uL の喀痰を分取	喀痰が扱いにくい場合は 1mL の針なしシリンジで採取					
2c-2	等量の 10% (w/v) DTT を添加	<ul style="list-style-type: none"> ・DDT (ジチオスレイトール) の溶媒は DEPC 水 ・溶解した 10% (w/v) DTT は 0.22 μm のフィルター (関東化学) で濾過 					
2c-3	室温で 15 分インキュベート						

2c-4	スピンドウン後、全量を「Sample buffer tube」に添加	
3	青色のキャップをして5秒間ボルテックス	
4	セーフティキャビネットから持ち出す	

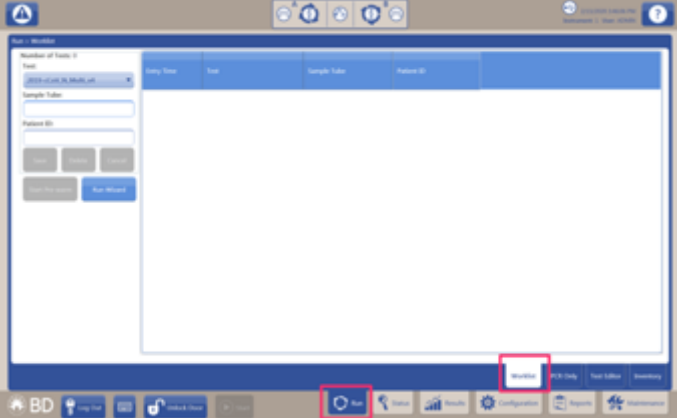
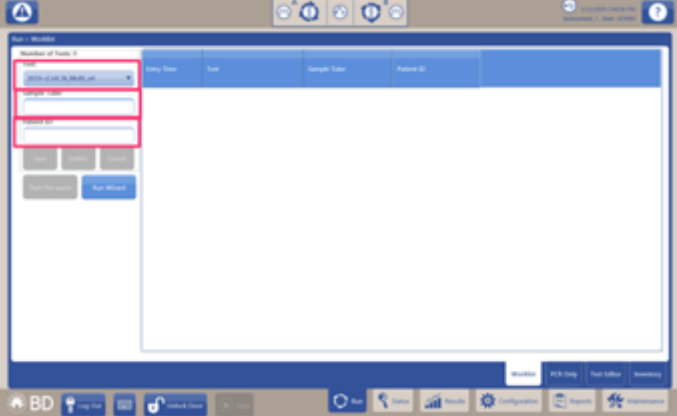
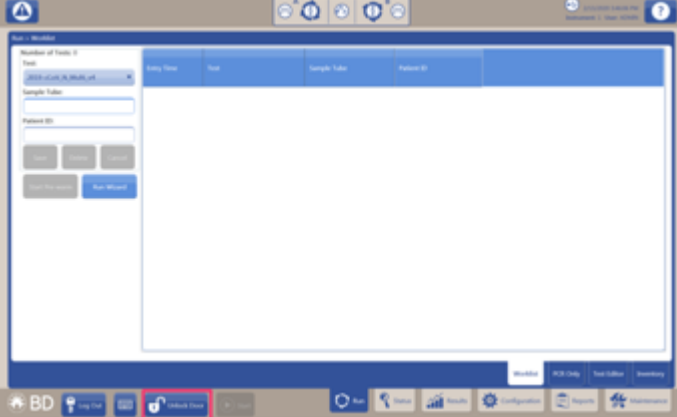
○BD MAX ExK TNA-3 (以下、ストリップ) セット～PCR mixture 調整～検体セット

1	右下メニューから「Run」を選択	
2	「Work list」を選択	
3	「Run Wizard」を選択	
4	使用する PCR cartridge のバーコードを読み取り、「Use Current Cartridge」をクリック	

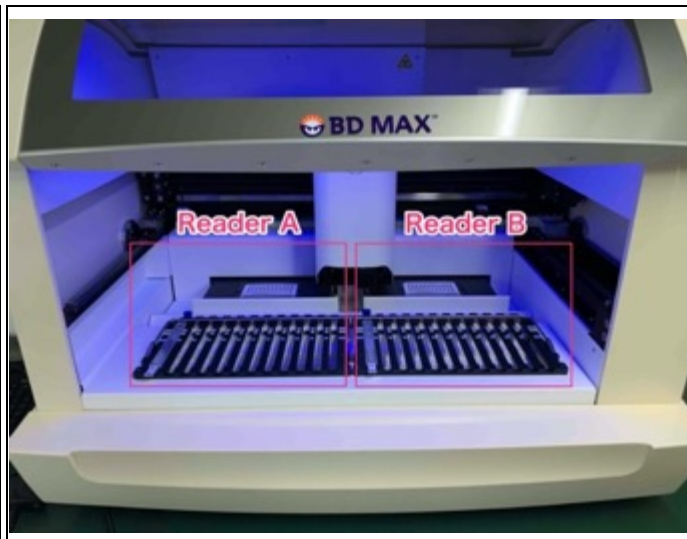
5	<p>「Select test」タブをクリックし、「Select a Test」から使用する PCR プログラムを選択後、「Number of Assign」に検査する検体数を入力</p>	
6	<p>「View Racks Diagram」タブをクリックし、ストリップをセットするラックの位置を確認</p>	
7	<p>ストリップを軽くたたき全ての溶液がチューブの底に落ちている状態にし、ラックにセット (ストリップの持ち手側から先端方向に押し込んで、沈み込ませてから離す)</p>	
8	<p>「Extraction Tubes (B4)」、「Master Mix (C1)」、「Conical Tubes」を所定の位置にセット (パチンと音がするまで押し込む)</p>	

9	右表の組成で PCR master mix を調整	<table border="1"> <thead> <tr> <th>試薬</th> <th>Master mix 中の濃度</th> <th>uL/反応</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BD Primers and Probes Diluent</td> <td></td> <td>4.25</td> </tr> <tr> <td>NIID_2019-nCoV_N_F2 (50uM)</td> <td>1000nM</td> <td>0.25</td> </tr> <tr> <td>NIID_2019-nCoV_N_R2 (50uM)</td> <td>1400nM</td> <td>0.35</td> </tr> <tr> <td>NIID_2019-nCoV_N_P2 (10uM) (5'-FAM)</td> <td>400nM</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Nuclease-free or DPEC-treated water</td> <td></td> <td>7.15</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td></td> <td>12.5</td> </tr> </tbody> </table>	試薬	Master mix 中の濃度	uL/反応	BD Primers and Probes Diluent		4.25	NIID_2019-nCoV_N_F2 (50uM)	1000nM	0.25	NIID_2019-nCoV_N_R2 (50uM)	1400nM	0.35	NIID_2019-nCoV_N_P2 (10uM) (5'-FAM)	400nM	0.5	Nuclease-free or DPEC-treated water		7.15	Total		12.5
		試薬	Master mix 中の濃度	uL/反応																			
		BD Primers and Probes Diluent		4.25																			
		NIID_2019-nCoV_N_F2 (50uM)	1000nM	0.25																			
		NIID_2019-nCoV_N_R2 (50uM)	1400nM	0.35																			
		NIID_2019-nCoV_N_P2 (10uM) (5'-FAM)	400nM	0.5																			
		Nuclease-free or DPEC-treated water		7.15																			
Total		12.5																					
10	12.5 μ L の PCR master mix を Snap-3 に分注 (チップの先端を tube の底につけて吐き出す。 気泡が残らないように注意)																						
11	検体処理を終えた「Sample Buffer tube」をバーコードが見えるようにラックにセット																						

○BD MAX への検体登録およびラン開始

1 「Run」タブの「Worklist」をクリック	
2 <ul style="list-style-type: none">・「Test」より登録した PCR プログラムを選択・「Sample Tube」に Sample buffer tube のバーコードを読み取って入力・「Patient ID」に任意の Sample ID を入力・Enter キー・測定サンプル分を繰り返す	
3 <ul style="list-style-type: none">・Unlock Door をクリック後、ドアを開ける	

4 Reader A (左側) あるいは Reader B (右側) に PCR cartridge およびラックをセット



5 ドアを閉め、「Run」をクリック
Run ID を入力して「OK」



6 セットした「PCR cartridge」、「ストリップ」、
「Sample tube」、「Extraction Tubes (B4)」、
「Master Mix (C1)」のバーコードが正常に取り
られ、Run の残り時間が表示されるのを確認



7 Run の進捗状況を確認するには、「Results」タブ
から該当する Run をダブルクリック



8 「Plotting」をクリックして蛍光の立ち上がりを確認



9 Run 終了後、「Result」タブの一覧から Export したい Run を選択し、「Export」をクリックすると Result ファイルが USB に出力される

* F10 キーを押すとスクリーンショットが USB に保存される

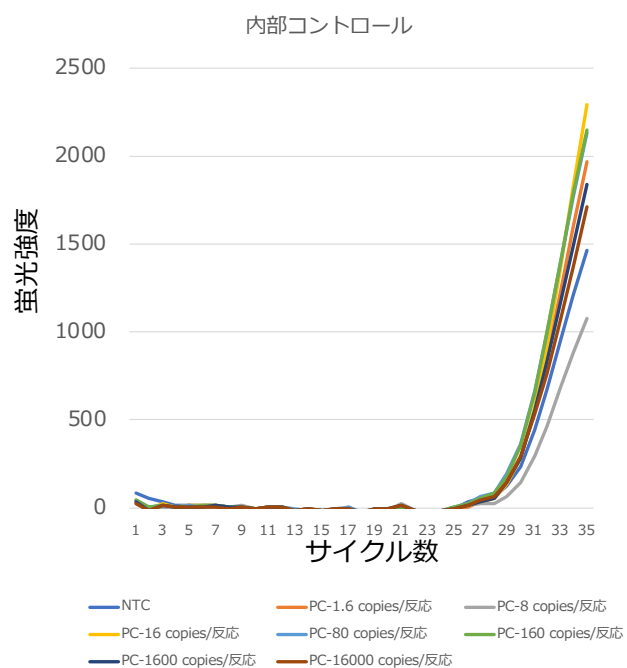
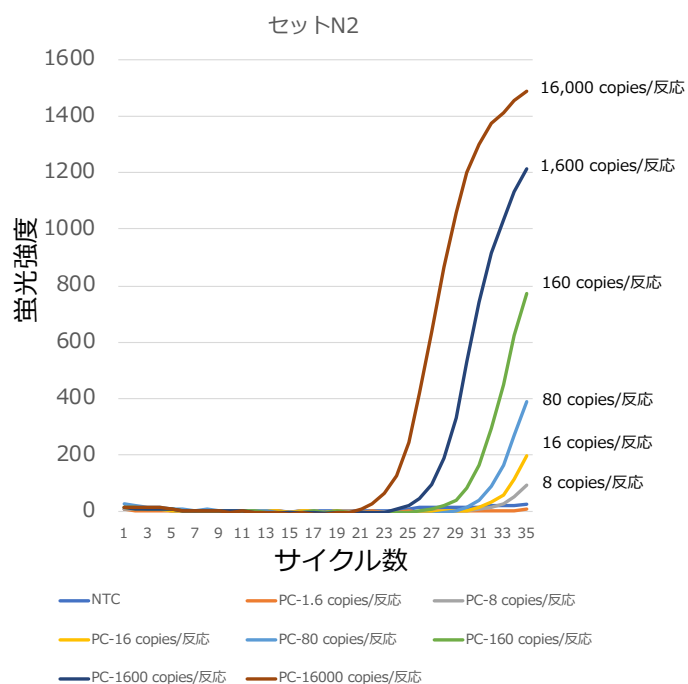
Run Name	Time	Year	# Cycles	Status
006_00000001_0001	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0002	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0003	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0004	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0005	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0006	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0007	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0008	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0009	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0010	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0011	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0012	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0013	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0014	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0015	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0016	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0017	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0018	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0019	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success
006_00000001_0020	21:11:00 0:00 PM	2020	0	Success

○精度管理

精度管理は 50~100 コピー/反応の陽性コントロールを用いて、適正に検査が行えることを確認しなければならない。

・検出限界値 (Limit of Detection: LOD) の確認(例)

本手順書にしたがって、概算コピー数が明らかな RNA テンプレートを 16,000, 1,600, 160, 80, 16, 8, あるいは 1.6 コピー/反応になるように PCR mixture にスパイクし測定した。蛍光強度 100 を検出閾値とした場合、セット N2 の LOD は 16 コピー/反応であった。



以上