

CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR Systemシリーズ

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)検査のための操作マニュアル

—SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit Ver.2 (XA0203, XA0191) 専用—

このマニュアルでは、SARS-CoV-2 Direct Detection RT-qPCR Kit Ver.2 (製品コードXA0203, XA0191) を用いてリアルタイムPCRを実施する際の操作方法を説明します。実験操作に関しては、本キットの取扱説明書に従ってください。

また、本装置は研究用機器であり医薬品医療機器等法に定められる医療機器ではありません。

CronoSTAR™ Portable リアルタイムPCR装置の起動とラン

- リアルタイム PCR 装置本体の電源を ON にする。
- コンピューターを起動してソフトウェアを立ち上げる。
- Sample Setup をクリックしサンプル情報を入力する。
 - Experiment Name に試験名を入力する (ラン終了後に行っても良い)。
 - Channel 1 の FAM と Channel 4 の Cy5 にチェック✓を入れる。

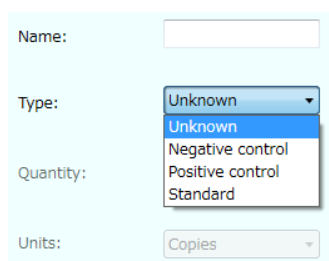


- ウェルをクリックしてサンプル名、タイプを入力する (ラン終了後に行っても良い)。

Negative Control : 陰性コントロール

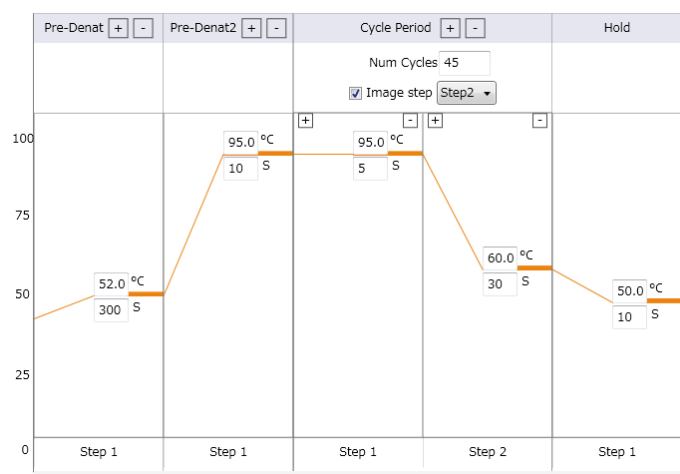
Positive Control : 陽性コントロール

Unknown : 検査対象サンプル



- Cycler Setup を選択してサーマル条件を入力する。
 - Pre-Denat1 は、52°C、300 秒に設定する。
 - Pre-Denat2 は、95°C、10 秒に設定する。
 - Cycle Period Step1 は、95°C、5 秒に設定する。
 - Cycle Period Step2 は、60°C、30 秒に設定する。
 - Cycle Period の Num Cycles は、45 に設定する。
 - Cycle Period の Image step は チェック✓を入れ Step2 に設定する。

4.7. Hold は、50°C、10 秒に設定する。



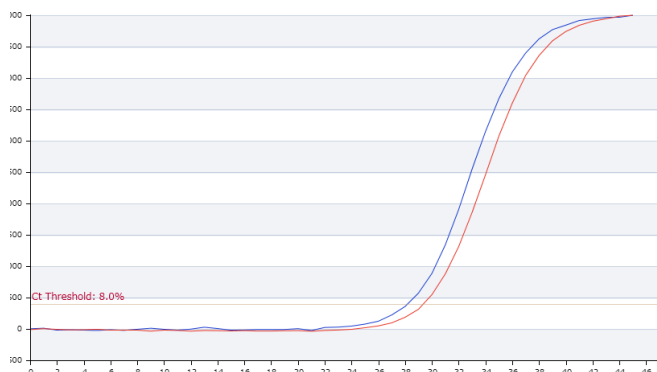
5. 装置にサンプルをセットする。



6. Start ボタンを押しランを開始する。

結果の解析

1. Analysis 画面で増幅曲線を確認する。

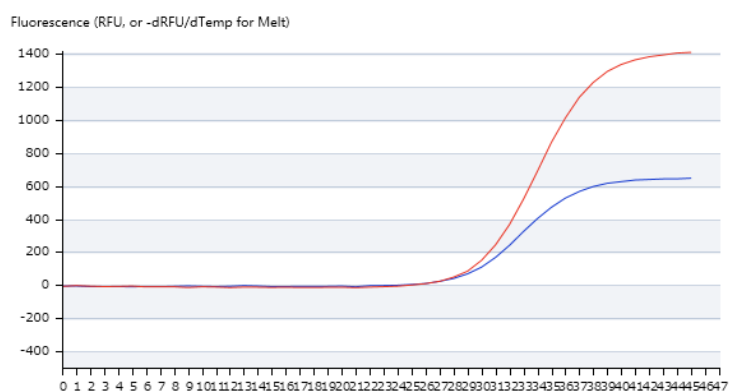


(Analysis 画面の増幅曲線)

2. Analysis 画面の結果のテーブルで Channel1(FAM) 、 Channel4(Cy5)の Ct 値を確認する。

	Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4				
A	1	2	3	4	5	6	7	8
Chan 1				28.12				
Chan 2								
Chan 3								
N1/N2				29.20				

3. Run 画面で増幅曲線を確認する。



(Run 画面の増幅曲線)

結果の判定方法（詳細はキット（XA0203）の説明書を参照）

【コントロール反応の判定】

結果が以下の条件を満たすことを確認する。条件を満たさない場合は再測定を推奨する。

	SARS-CoV-2 (Cy5)	IC (FAM)
陰性コントロール	不検出	不検出
陽性コントロール	Ct ≤ 30	Ct ≤ 30

- ・陰性コントロールは、不検出であることを確認する。

Ct 値が算出された場合は、コンタミネーションの疑いがある。反応液の調製場所や器具類を
除染したうえで再反応を行う。

- ・陽性コントロールは、Ct 値が 30 以下であることを確認する。

Ct 値が 30 より大きい場合、または不検出となる場合は、何らかの原因でリアルタイム RT-PCR 反応や検出が正常に行われていない。再反応を行う。

【検体の測定結果の判定】

算出された Ct 値を用いて以下の判定表に従って陽性／陰性を判定する。

		SARS-CoV-2 (Cy5)	
		Ct ≤ 40	Ct > 40 または不検出
IC (FAM)	Ct ≤ 40	陽性	陰性
	Ct > 40 または不検出	陽性	別法での 再測定を推奨*

* : IC (FAM)の Ct 値が 40 より大きい場合、検体量の不足や劣化または PCR 阻害の疑いがあります。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 精製を行う手法等の別法での再測定により判定することを推奨します。

※判定の際の注意（重要）

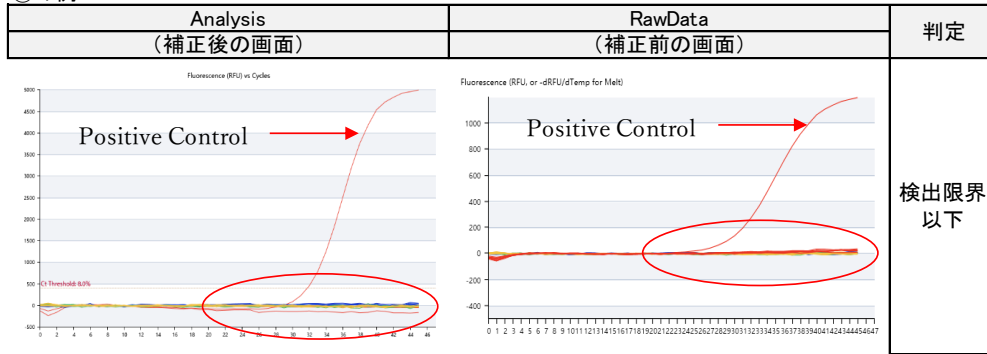
本機器には、シグナルを自動補正する機能があります。これは、シグナルの絶対値が低い場合でも、シグナル強度を自動補正して、フルスケールが揃った増幅曲線として描くための機能です。この機能のために、まれに、ほとんどシグナルが出ていないにもかかわらず、シグナルのわずかな変化をとらえて、あたかも増幅したような曲線に補正し、Ct 値を算出する事例が見られます。

そのため、判定の際には、以下の手順にしたがって、上述の自動補正による影響の有無を必ずご確認ください。

判定例

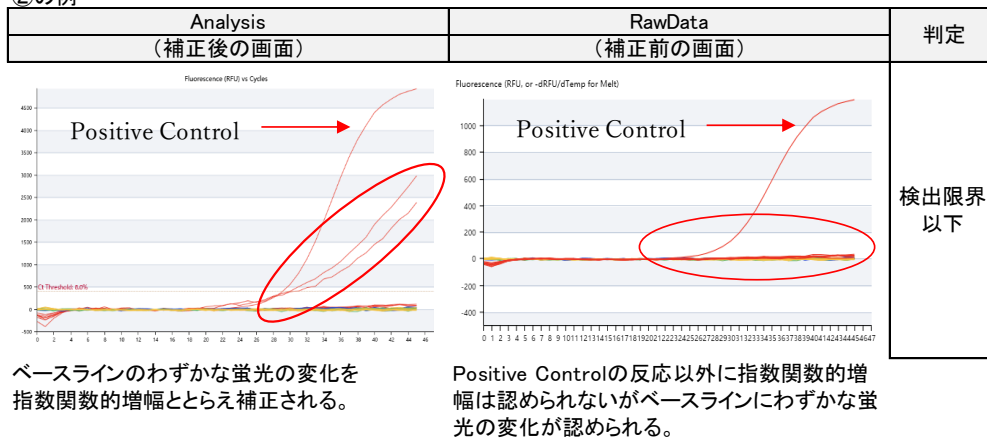
- ① Analysis、RawData の画面でともにシグナルの上昇が見られない場合
検出限界以下と判断します。

①の例



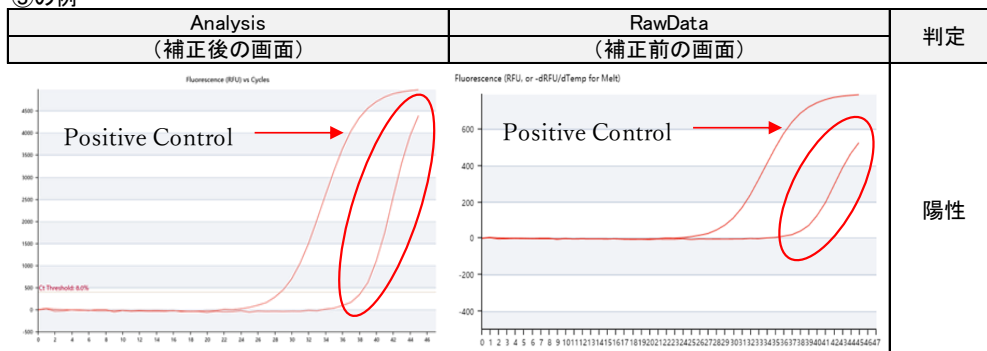
- ② Analysis の画面でシグナルの上昇が見られるが、RawData では上昇が見られない場合
自動補正の影響によるものですので、検出限界以下と判断します。

②の例



- ③ Analysis、RawData の画面でともにシグナルの上昇が見られる場合
陽性と判断します。

③の例



結果の保存と解析結果の出力

1. Report画面をクリックする。
2. Print Reportをクリックし、結果を保存場所とファイル名を指定してCSV形式で保存する。

Print Report (.CSV)

3. Save Experimentをクリックし、保存場所とファイル名を指定して保存する。Save as templateにチェック✓をいれるとテンプレートとして保存する。

Save Experiment

Save as template

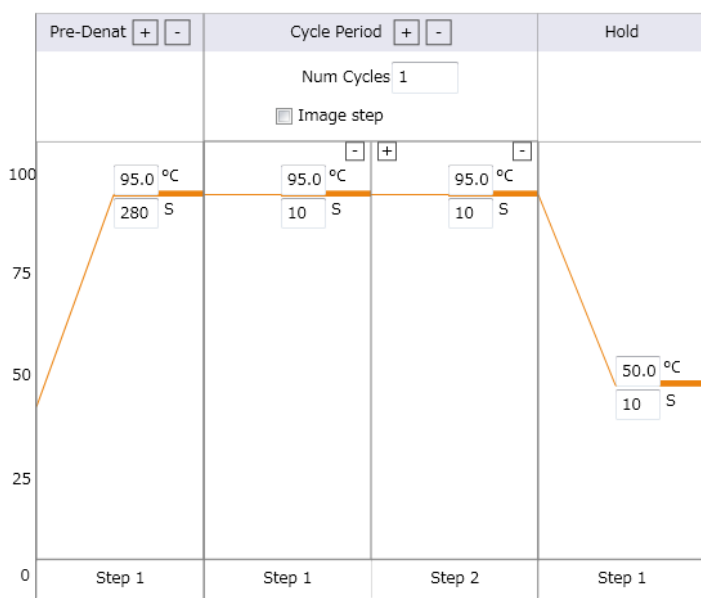
ソフトウェアと装置の終了

1. ソフトウェアを終了する。
2. コンピューターを終了させて、電源を切る。
3. 本体の電源を切る。

【補足】

前処理（核酸の簡易抽出）をリアルタイムPCR装置で実施する場合

1. リアルタイムPCR装置本体の電源をONにする。
2. コンピューターを起動してソフトウェアを立ち上げる。
3. Sample Setupをクリックする。
4. Cyclor Setupを選択してサーマル条件を入力する。
 - 4.1. Pre-Denat1は、95°C、280秒に設定する。
 - 4.3. Cycle Period Step1は、95°C、10秒に設定する。
 - 4.4. Cycle Period Step2は、95°C、10秒に設定する。
 - 4.5. Cycle Period のNum Cyclesは、1に設定する。
 - 4.6. Cycle Period のImage stepは チェック✓を外す。
 - 4.7. Holdは、50°C、10秒に設定する。



5. 装置にサンプルをセットする
6. Start ボタンを押しランを開始する。
7. 測定終了したあとチューブを取り出し氷上で保存する。