

SARS-CoV-2 核酸検出における 感染研法・GENECUBE 核酸増幅検査の施設間比較

Multicenter evaluation of SARS-CoV-2 nucleic acid amplification tests using the conventional real-time RT-PCR methods and GENECUBE methods

畠山慎治^{1,2)}, 草間智香¹⁾, 奥出美穂²⁾, 武田明実奈¹⁾, 津田志乃¹⁾, 小山諒太³⁾, 国井拓弥³⁾, 山崎慎介³⁾, 神田智之³⁾, 宮本英寿⁴⁾, 道渕真史^{5,6)}, 吉兼峻史^{5,6)}, 大木圭子³⁾, 中村浩司⁷⁾, 高梨真樹²⁾, 内藤麻美⁴⁾, 南木 融³⁾, 鈴木広道^{1,6)}

要旨 SARS-CoV-2核酸検出について、ウイルス量の異なる凍結陽性検体60件を用いて、感染研法とGENECUBE専用試薬2試薬の比較検討を4施設で行った。4施設の結果を合算した各法の陽性率はそれぞれ96.7%, 98.3%, 99.6%であった。Ct値及びSp値の中央値[IQR]はそれぞれ22.8[17.1-28.2], 32.9[27.1-38.3], 30.2[25.1-35.7]であり、Ct値とSp値の間には、それぞれ相関係数 $r = 0.84, 0.91$ の強い相関を認めた。

Key words SARS-CoV-2, Nucleic acid amplification test, COVID-19

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症（以下、COVID-19）は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（以下、SARS-CoV-2）によって引き起こされる急性呼吸器症候群である¹⁾。現在、COVID-19の診断において

抗原定性検査が広く用いられているが、感度と特異性の高さから遺伝子検査がSARS-CoV-2検出のゴールドスタンダードに位置づけられている²⁾。

SARS-CoV-2の遺伝子検査のうち、リアルタイムRT-PCR法は算出されるCt（Cycle Threshold）値から検体中のウイルス量を推定することが可能であ

Received Apr. 1, 2024; Accepted May 2, 2024

Shinji HATAKEYAMA^{1,2)}, Tomoka KUSAMA¹⁾, Miho OKUDE²⁾, Amina TAKEDA¹⁾, Shino TSUDA¹⁾, Ryota KOYAMA³⁾, Takuya KUNII³⁾, Shinsuke YAMAZAKI³⁾, Tomoyuki KANDA³⁾, Eiju MIYAMOTO⁴⁾, Masashi MICHIBUCHI^{5,6)}, Takafumi YOSHIKANE^{5,6)}, Keiko OKI³⁾, Koji NAKAMURA⁷⁾, Masaki TAKANASHI²⁾, Asami NAITO⁴⁾, Toru NAMMOKU³⁾, Hiromichi SUZUKI^{1,6)}

¹⁾ 筑波大学附属病院感染症科

Department of Infectious Diseases, University of Tsukuba Hospital

〒305-8576 茨城県つくば市天久保2-1-1

2-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-8576, Japan

²⁾ 株式会社LSIメディエンス

LSI Medience Corporation

〒170-8555 東京都板橋区志村3-30-1

3-30-1 Shimura, Itabashi, Tokyo 174-8555, Japan

³⁾ 筑波大学附属病院検査部

Department of Clinical Laboratory, University of Tsukuba Hospital

〒305-8576 茨城県つくば市天久保2-1-1

2-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-8576, Japan

⁴⁾ つくばi-Laboratory LLP

Tsukuba i-Laboratory LLP

〒305-0005 茨城県つくば市天久保2-1-17

2-1-17 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki, 305-0005, Japan

⁵⁾ 東洋紡株式会社診断システム事業部

Diagnostic System Department, TOYOBO Co., Ltd.,

〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田1-13-1 大阪梅田ツ

インタワーズ・サウス

Osaka Umeda Twin Towers South, 1-13-1 Umeda,

Kita, Osaka, 530-0001, Japan

⁶⁾ 筑波大学医学医療系臨床医学域感染症内科学

Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

⁷⁾ 筑波メディカルセンター病院臨床検査科

Department of Clinical Laboratory, Tsukuba Medical Center Hospital

〒305-8558 茨城県つくば市天久保1-3-1

1-3-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-8558, Japan

連絡責任者：鈴木広道

E-mail：hsuzuki@md.tsukuba.ac.jp

Table 1 Equipment and reagent used in each facility

	Facility				
	A	B	C	D	
RNA Extraction	Extraction equipment	Maxwell®RSC Instrument(Promega)	magLEAD 12gC(PSS)	Maxwell®RSC 48 Instrument(Promega)	magLEAD 12gC(PSS)
	Extraction reagent	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit(Promega)	MagDEA® Dx SV(PSS) Rapid protocol	Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit(Promega)	MagDEA® Dx SV (PSS) Standard protocol
Real-time RT-PCR	Measuring equipment	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher)	LightCycler® 96 System(Roche)	cobas z 480(Roche)	LightCycler® 96 System(Roche)
	Measuring reagent	TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix for qPCR(Thermo Fisher)	THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit(TOYOBO)	QuantiTect Probe RT-PCR Kit(QIAGEN)	THUNDERBIRD® Probe One-step qRT-PCR Kit(TOYOBO)
GENECUBE	Measuring equipment	GENECUBE® (TOYOBO)			
	Measuring reagent	GENECUBE® HQ SARS-CoV-2, GENECUBE®HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0 (TOYOBO)			

る。そのため、SARS-CoV-2核酸検出の有無に加え、感染性を評価する指標として利用できる可能性が示唆されている³⁾。国内では、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに記載されているTaqManプローブを用いたリアルタイムone-step RT-PCR法（以下、感染研法）が代表例として挙げられる。しかしながら、リアルタイムRT-PCR法は検査時間が長く、作業者の手技及び使用する機器や試薬によって施設間差が生じる可能性が指摘されている^{4),5)}。

これに対して、蛍光標識プローブ（Qプローブ）を用いたPCR法を原理とする、全自動遺伝子解析装置GENECUBE（モデルC）[®]（東洋紡株式会社 以下、東洋紡）（以下、GENECUBE）は、試薬の分注混和から核酸増幅、検出までの工程を自動かつ迅速に実施できる方法である。専用試薬であるジーンキューブ[®] HQ SARS-CoV-2（東洋紡）（以下、HQ SARS-CoV-2）を用いた場合、検出感度は感染研法と同等であることが報告されており、迅速かつ高感度なSARS-CoV-2核酸の検出が可能である^{6),7)}。さらに、GENECUBEにより算出されるSp（Standing point）値は、感染研法により算出されるCt値と相関を示すことが報告されている⁸⁾。しかしながら、GENECUBEより算出されるSp値と感染研法により算出されるCt値の相関について十分な検証はこれまで報告されていない。

今回、我々は感染研法、HQ SARS-CoV-2、ジーンキューブ[®]HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0（東洋紡、以下HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0）の3法について、4施設における同一検体を用いたSARS-CoV-2核酸検査を実施し、各施設における3法の施設間差の評価を行った。さらに、複数の施設におけるGENECUBEにより算出されるSp値と感染研法により算出されるCt値の相関解析を実施した。

2. 対象及び方法

1) 対象

2021年4月から2022年2月までに筑波メディカルセンター病院で同意が得られた検体のうち、SARS-CoV-2陽性と判定された凍結鼻咽頭拭い液計60検体（国立感染症研究所による「病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.2.9.1」に記載のN 遺伝子を検出する方法のN2セットでの測定によって得られたCt値が $Ct \leq 20$, $20 < Ct \leq 30$, $30 < Ct$ を20検体ずつ）を使用した。なお本研究は筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号R03-230）。

2) 測定施設、測定試薬および機器

筑波大学附属病院検査部（以下、施設A）、つくばi-Laboratory LLP（以下、施設B）、株式会社LSIメディエンス（以下、施設C）、筑波大学附属病院防災・感染症研究棟（以下、施設D）の4施設において、感染研法及びGENECUBEを用いたPCR法でSARS-CoV-2検出を行った。各施設にて用いた装置及び試薬をTable 1に示す。

3) 方法

-80℃で凍結保管していた鼻咽頭拭い液計60検体を用い、盲検化した後に約300 μLずつ分注、再凍結を行い各施設に輸送した。検体の融解、核酸抽出、感染研法及びGENECUBEを用いたPCR法による測定は各施設で同日に実施した。なお、感染研法は、国立感染症研究所による「病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.2.9.1」に記載の「TaqManプローブを用いたリアルタイムone-step RT-PCR法による2019-nCoVの検出」に従って、N 遺伝子を検出する方法のN2セットのN = 2測定で行った。GENECUBEを用いたPCR法はGENECUBE専用試薬であるHQ SARS-CoV-2及びHQ SARS-CoV-2/RSV 2.0の2試薬

を使用し、添付文書の記載に基づいて測定を行った。

4) 判定及び解析方法

感染研法については、国立感染症研究所による「病原体検出マニュアル2019-nCoV Ver.2.9.1」の記載に基づき、N2セット2つのウェルのうち、一方あるいは両方で40サイクル以内に増幅曲線の立ち上がりが見られた場合に陽性とみなした。各検体の測定について、一方のみ陽性の場合にはそのウェルのCt値を、両方が陽性の場合には2つのウェルの平均値を各検体のCt値とした。HQ SARS-CoV-2、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0については、添付文書の記載に基づき、各検体をN = 1で測定した結果を記載した。またSp値はGENECUBEに表示された値を使用した。上記で得られた結果について、感染研法、HQ SARS-CoV-2、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0それぞれの陽性率の施設間比較、感染研法により算出されるCt値及びGENECUBEにより算出されるSp値の中央値、IQR（四分位範囲）の施設間比較、Ct値とSp値の相関及びその施設間比較を行った。

統計解析には統計解析フリーソフト「EZRV version 1.63」⁹⁾を使用した。陽性率の施設間比較にはFisherの正確検定を用い、4施設全体で陽性率に有意な差が確認された場合には、各施設間に対してBonferroni法で補正するFisherの正確検定を行った。Ct値及びSp値の施設間比較にはKruskal-Wallis検定を用い、4施設全体で有意な差が確認された場合には、各施設間に対してBonferroni法で補正するMann-WhitneyのU検定を行った。Ct値とSp値の間の相関係数はSpearmanの順位相関係数を算出した。有意水準はいずれも $p < 0.05$ とした。

3. 結果

1) 感染研法とHQ SARS-CoV-2, HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0の各施設間の陽性率比較

各施設における感染研法、HQ SARS-CoV-2、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0の陽性率をFig. 1に示す。測定した60検体の各施設での陽性率は、感染研法ではそれぞれ100%、100%、91.7%、95.0%、HQ SARS-CoV-2では100%、98.3%、96.7%、98.3%、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0では100%、100%、98.3%、100%であった。感染研法で、4施設全体では有意な差が確認されたが($p < 0.05$)、各施設間における有意な差は確認されなかった(施設A-B, A-D, B-D, C-Dで $p = 1.00$ 、施設A-C, B-Cで $p = 0.34$)。また、HQ SARS-CoV-2、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0では4施設全体で陽性率に有意な差はなかった(HQ SARS-CoV-2で $p = 0.90$ 、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0で $p = 1.00$)。すべての施設を合算した感染研法、HQ SARS-CoV-2、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0の陽性率はそれぞれ96.7%、98.3%、99.6%であった。

2) 感染研法のCt値, HQ SARS-CoV-2, HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値の施設間差及びCt値, Sp値中央値の差

感染研法のCt値、HQ SARS-CoV-2及びHQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値の中央値[IQR]をTable 2に示す。感染研法のCt値について、施設CでのCt値は施設AでのCt値より有意に高値となった($p < 0.05$)。また、HQ SARS-CoV-2、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0でのSp値は施設間に有意な差はなかった(HQ SARS-CoV-2で $p = 0.223$ 、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0で $p = 0.335$)。

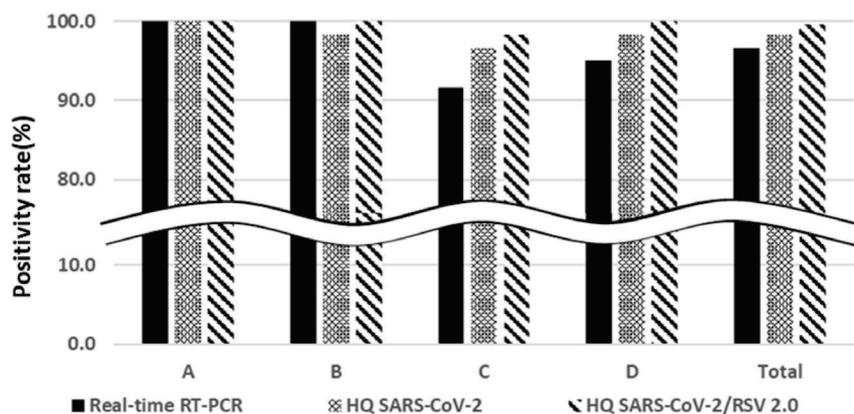


Fig. 1 Positivity rate at each facility and total for each method

すべての施設の結果を合算すると感染研法のCt値の中央値[IQR]は22.8[17.1-28.2], HQ SARS-CoV-2, HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値の中央値[IQR]はそれぞれ32.9[27.1-38.3], 30.2[25.1-35.7]であり, 各検体におけるSp値及びCt値の差の中央値[IQR]はHQ SARS-CoV-2で10.6[8.1-12.1], HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0で8.4[6.6-9.4]であった。

3) HQ SARS-CoV-2, HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値の感染研法のCt値との相関

感染研法のCt値とHQ SARS-CoV-2, HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値の相関について, 各施設における結果をFig. 2, 全ての施設の結果を合算した結果をFig. 3に示す。感染研法のCt値とHQ SARS-CoV-2のSp値の相関係数(r)は, 施設A, B, C, Dそれぞれr = 0.96, 0.93, 0.78, 0.79, 全施設合算した場合はr = 0.85といずれも強い正の相関を認めた(いずれもp < 0.05)。また, 感染研法のCt値と

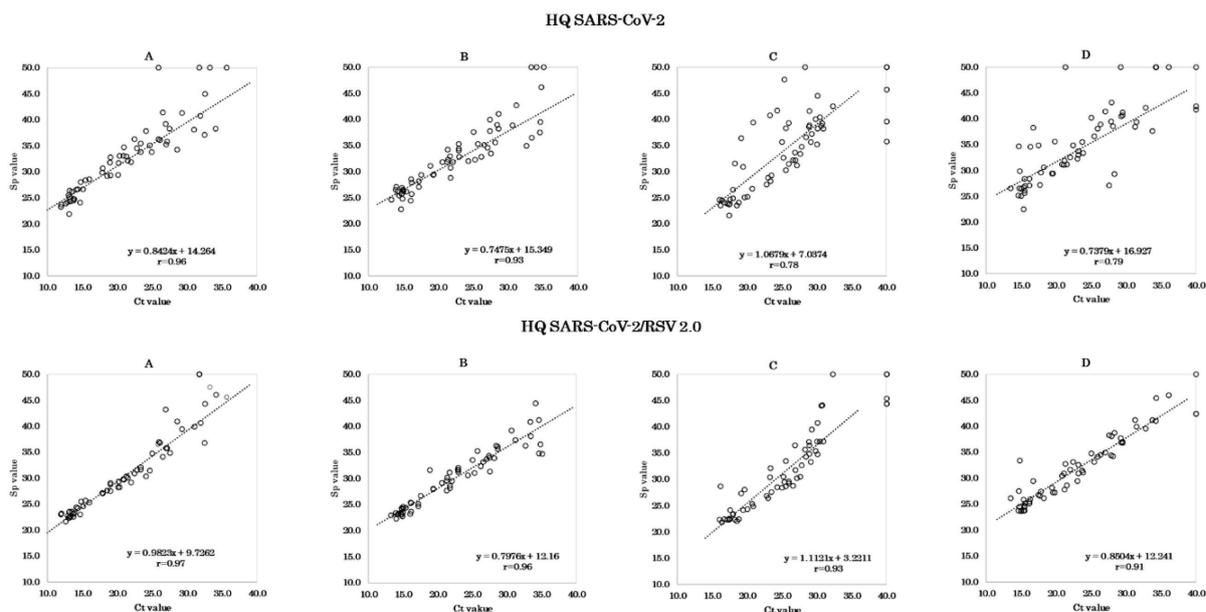
HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値の相関係数は施設A, B, C, Dそれぞれr = 0.97, 0.96, 0.93, 0.91, 全施設合算した場合はr = 0.91といずれも非常に強い正の相関を認めた(いずれもp < 0.05)。

4. 考察

今回我々は, SARS-CoV-2核酸検出について低, 中, 高Ct値の凍結鼻咽頭拭い検体60件を用いて, 感染研法, HQ SARS-CoV-2, HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0の3法による測定施設の施設間差及び感染研法により算出されるCt値とGENECUBEにより算出されるSp値の相関について評価を行った。3法の陽性率はいずれの施設においても90%以上であり, 施設間に有意な差はなかった。感染研法のCt値は一部施設間で有意な差を認めたが, Sp値はいずれの施設間にも有意な差は認めなかった。さらに, 感染研法により算出されるCt値とGENECUBEにより算出さ

Table 2 Median for each method at each facility and total

	Median(IQR)				
	A	B	C	D	Total
Real-Time RT-PCR	20.6 (14.3 - 26.2)	21.8 (16.1 - 27.5)	25.6 (19.3 - 29.2)	22.2 (16.3 - 28.2)	22.8 (17.1 - 28.2)
HQ SARS-CoV-2	32.5 (26.6 - 36.3)	32.2 (27.1 - 35.8)	34.3 (26.7 - 39.2)	34.2 (29.1 - 39.7)	32.9 (27.1 - 38.3)
HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0	29.3 (24.1 - 35.8)	30.4 (24.6 - 34.1)	29.9 (24.8 - 36.5)	31.3 (26.5 - 36.9)	30.2 (25.1 - 35.7)



*Samples for which Ct or Sp values were not calculated were plotted at 40 and 50, respectively.

Fig. 2 Correlation between Ct value of Real-time RT-PCR method and Sp value of GENECUBE method in each facility

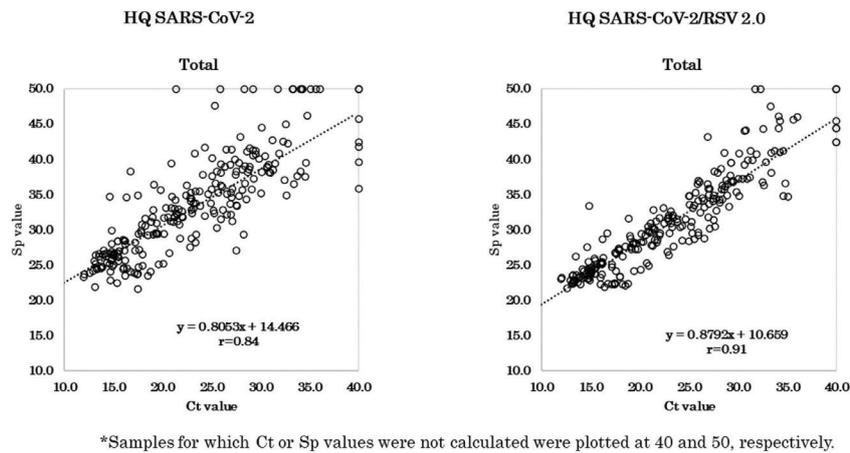


Fig. 3 Correlation between Ct value of Real-time RT-PCR method and Sp value of GENECUBE method in total

れるSp値の相関について、HQ SARS-CoV-2で相関係数 $r = 0.84$ の強い正の相関、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0では相関係数 $r = 0.91$ の非常に強い正の相関を認めた（いずれの相関係数も4施設合算値）。

感染研法はSARS-CoV-2核酸検出について高い感度を有することが報告されている¹⁰⁾。一方で、感染研法をはじめとしたリアルタイムRT-PCR法は、抽出工程や測定工程によって測定結果にばらつきが生じる可能性が指摘されている¹¹⁾。抽出工程に関して、3種類の抽出システムを比較した研究では、使用する抽出システムによって測定Ct値に有意な差が生じることが報告されており、それぞれに設定された濃縮率に起因するものであると考察されている¹²⁾。測定工程に関しては、臨床でのSARS-CoV-2陽性検体の希釈サンプルについて、CDC及びCharitéより公開されているプライマープローブセットの検出性能を比較した研究では、使用するプライマープローブセットの配列や標的領域によって10倍ほどの感度差が認められている¹³⁾。また、測定機器のみが異なる条件で4種の測定機器を比較した研究では、使用する測定機器によって得られるCt値に有意な差が生じることが報告されており¹⁴⁾、各機器の平均Ct値の間には最大で2~3の差が認められている。測定機器によりサーマルサイクラーの温度制御能に差はあり、ベースライン及び閾値(Threshold line)の設定方法は異なる。ベースライン、閾値を手動で設定した場合には作業員ごとに得られるCt値にばらつきが生じる可能性があり、自動で設定された場合のCt値との間にも乖離が生じる可能性も考えられる。加えて、感染研法及び感染研法と同一のプライマープローブセットを用いた測定試薬の比

較を行った研究では、2法の陽性率[95%信頼区間]はそれぞれ95.5%[77.2%-99.9%]、81.8%[59.7%-94.8%]であり、2法間で判定が一致した検体のCt値には最大で3.70[範囲:-1.79~2.19]($n = 17$)の差が認められている¹⁵⁾。この結果より、測定試薬の組成や試薬に用いられる酵素、各試薬に設定された反応条件が検出結果に影響を与える可能性が示唆されている。これらの先行研究の結果を踏まえると、本研究において施設A、C間にのみCt値に有意な差が認められたのは、両施設で測定機器、測定試薬が異なっていたことが要因として考えられる。

HQ SARS-CoV-2でのSp値が感染研法でのCt値との間に相関係数 $r = 0.81$ と強い相関を示すことは無症候者の唾液検体を対象とした先行研究で既に報告されている⁸⁾。一方で、各検体のCt値とSp値の差について先行研究での中央値[IQR]は4.5[3.0-5.8]($n = 73$)であり、本研究のCt値とSp値の差(中央値[IQR]: 10.6[8.1-12.1])との間に乖離がみられた。これらの乖離についてはいくつかの原因があると考えられる。1点目として、先行研究の測定は単施設かつ、測定された検体のCt値の中央値[IQR]は30.1[27.8-31.6]($n = 73$)と、使用した検体の約半数が $Ct \geq 30$ であったことが挙げられる。本研究では低Ct値を含む幅広い検体(Ct値範囲: $Ct \leq 20$, $20 < Ct \leq 30$, $30 < Ct$: 各20件)を4施設で測定しており、Ct値の中央値[IQR]は22.8[17.1-28.2]($n = 240$)であった。一般的にリアルタイムPCRにおいて、低コピー数($30 < Ct$)の検体ではサンプリングした検体中に標的核酸が含まれる確率、プライマーが標的核酸と結合する確率の低下が原因となり、測定Ct値にばらつきが生じやすいとされている¹⁶⁾。し

たがって、高Ct値の検体が多かった先行研究では、測定により得られた感染研法のCt値の正確度、精度は全体として低かったことが予想される。さらに、2点目としては、先行研究では感染研法とHQ SARS-CoV-2の測定は異なる抽出機器を用いて得られた核酸抽出物について、別日に測定を行っていることが挙げられる。本研究では両法ともに同日に同一の核酸抽出物の測定を行ったため、同一検体におけるCt値とSp値の関係をより正確に反映していると考えられる。これらの理由から、本研究により得られたCt値とSp値はより普遍的な数値であり、それらから算出されるCt値とSp値の差及び相関係数も信頼性の高い数値であると考えられる。さらに、本研究においてHQ SARS-CoV-2/RSV 2.0のSp値はいずれの施設においても感染研法のCt値との間に、HQ SARS-CoV-2のSp値以上の非常に強い相関を示し、Ct値とSp値の間により強い直線性が確認された。このことから、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0により得られるSp値はHQ SARS-CoV-2により得られるSp値よりも正確にCt値の推定が可能であることが示唆された。

ここで本研究の考慮すべき限界点について述べる。第一に、使用した検体は臨床における残余検体を凍結、融解したものであった。検体の凍結及び融解が検体のウイルス量に影響を与えることが報告されている¹⁷⁾ことから、今回の結果は新鮮検体を用いて測定を行った場合の結果とは異なる可能性がある。第二に、本研究には抽出機器を用いた核酸抽出物を使用した。そのためHQ SARS-CoV-2添付文書に記載の「プロテイナーゼK溶液及び加熱による核酸抽出法」で得られる核酸抽出物からの測定で算出されるSp値もCt値と相関を示すかについて追加の検討が必要である。第三に、HQ SARS-CoV-2/RSV 2.0はSARS-CoV-2とRSVの同時検出が可能な試薬である。SARS-CoV-2の検出に関して十分な性能を有することを確認したが、本研究ではRSVの検出性能評価は対象としていないため、今後RSV検出性能を含めた試薬の有用性について評価を行う必要がある。最後に、本研究の対象は4施設のみであり、各測定法の施設間差及びCt値とSp値の相関をより正確に評価するために、より多くの施設で同様の検討を行う必要がある。

5. 結論

HQ SARS-CoV-2及びHQ SARS-CoV-2/RSV 2.0の測定により得られるSp値はCt値の代用となる可能性が示された。

COI申告

連絡責任者の鈴木広道は東洋紡株式会社より共同研究費の受け取りがある。また、本研究で用いた試薬は東洋紡株式会社より提供されたものである。

文献

- 1) Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-544.
- 2) Hanson KE, Altayar O, Caliendo AM, et al. The Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019(COVID-19): Antigen Testing. *Clin Infect Dis.* 2021;ciab557.
- 3) Singanayagam A, Patel M, Charlett A, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(32):2001483.
- 4) Yang T, Wang YC, Shen CF, et al. Point-of-Care RNA-Based Diagnostic Device for COVID-19. *Diagnostics(Basel).* 2020;10(3):165.
- 5) Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12(6):582.
- 6) Naito A, Kiyasu Y, Akashi Y, et al. The evaluation of the utility of the GENECUBE HQ SARS-CoV-2 for anterior nasal samples and saliva samples with a new rapid examination protocol. *PLoS One.* 2021;16(12):e0262159.
- 7) Kiyasu Y, Akashi Y, Sugiyama A, et al. A Prospective Evaluation of the Analytical Performance of GENECUBE® HQ SARS-CoV-2 and GENECUBE® FLU A/B. *Mol Diagn Ther.* 2021;25(4):495-504.
- 8) Okude M, Suzuki K, Naito A, et al. Development of a mobile laboratory system in hydrogen fuel cell buses and evaluation of the performance for COVID-19 RT-PCR testing. *Sci Rep.* 2023;13(1):17456.
- 9) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(3):452-8.

- 10) Matsumura Y, Shimizu T, Noguchi T, et al. Comparison of 12 Molecular Detection Assays for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Mol Diagn.* 2021;23(2):164-170.
- 11) Malecki M, Luesebrink J, Wendel AF, et al. Analysis of external quality assessment samples revealed crucial performance differences between commercial RT-PCR assays for SARS-CoV-2 detection when taking extraction methods and real-time-PCR instruments into account. *J Virol Methods.* 2021:114202.
- 12) Ransom EM, Potter RF, Wallace MA, et al. Comparison of Extraction Methods and Thermocyclers for SARS-CoV-2 Molecular Detection Using Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2020;58(10):e201622-20.
- 13) Nalla AK, Casto AM, Huang MW, et al. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):e00557-20.
- 14) Fan G, Jin Y, Wang Q, et al. Assessing the comparability of cycle threshold values derived from five external quality assessment rounds for omicron nucleic acid testing. *Virol J.* 2023;20(1):119.
- 15) Mizoguchi M, Harada S, Okamoto K, et al. Comparative performance and cycle threshold values of 10 nucleic acid amplification tests for SARS-CoV-2 on clinical samples. *PLoS One.* 2021;16(6):e0252757.
- 16) Taylor AC, Nadeau K, Abbasi M, et al. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol.* 2019;37(7):761-774.
- 17) Dzung A, Cheng PF, Stoffel C, et al. Prolonged Unfrozen Storage and Repeated Freeze-Thawing of SARS-CoV-2 Patient Samples Have Minor Effects on SARS-CoV-2 Detectability by RT-PCR. *J Mol Diagn.* 2021;23(6):691-697.