

体外診断用医薬品

SARSコロナウイルス核酸キット

MEBRIGHT™ SARS-CoV-2 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、医師が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. 添付文書に記載された操作方法に従って使用してください。また、使用する機材の取扱説明書をよく読み、その指示に従ってください。
3. 試薬の使用時には、保護眼鏡や使い捨て手袋（パウダーフリー）などを着用し、試薬が目、皮膚、粘膜に触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合は、大量の水で十分に洗い流してください。また、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。試薬をこぼした場合は、水で希釈してから拭き取ってください。

[形状・構造等（キットの構成）]

構成試薬	容量	数量
① マスターミックス	1 mL	1本
マスターミックス（逆転写酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP）		
② オリゴICミックス	0.5 mL	1本
N-Fプライマー、N-Rプライマー、N2-Fプライマー、N2-Rプライマー、IC-Fプライマー、IC-Rプライマー、N-FAMプローブ、N2-YAKプローブ、IC-Cy5プローブ		
③ 陽性コントロールRNA	20 μL	1本

全て-15℃～-35℃保存品。②は遮光保存品。

[使用目的]

生体試料中のSARS-CoV-2 RNAの検出（SARS-CoV-2感染の診断の補助）

[使用目的に関連する使用上の注意]

[操作上の注意]、＜臨床性能試験結果＞の内容を熟知し、本品の有用性を理解した上で、検体種を選択すること。

[測定原理]

本品は、Quenched qPCRプローブを用いた1step RT-PCR法によって、SARS-CoV-2遺伝子を検出する試薬です。RT-PCRは、Reverse Transcription Polymerase Chain Reactionの略です。

検体から抽出したRNAを試料として、逆転写反応によりcDNAを合成した後、SARS-CoV-2のN遺伝子領域の2箇所（N1-PCR、N2-PCR）において、PCR増幅します。オリ

ゴICミックスにはSARS-CoV-2増幅検出用のプライマー及びプローブに加えて、DNAのインターナルコントロール（IC）とその増幅検出用のプライマー及びプローブが含まれており、このICは試料と同時に増幅されます。

測定には、蛍光色素及び消光物質（クエンチャー）で標識した、SARS-CoV-2の配列に対応するプローブとICの配列に対応するプローブを用います。これらのプローブは異なる波長の蛍光色素で標識されています。蛍光色素は、クエンチャーが近傍に存在すると消光されるため強い蛍光を発生しませんが、プローブがPCR産物にハイブリダイズし、PCRにおける伸長反応の際に耐熱性DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって分解されると、蛍光を発生します。PCRの各サイクルにおける蛍光強度をリアルタイムPCR装置で測定し、SARS-CoV-2を検出する2つのプローブの蛍光色素のCt値と、ICを検出するプローブの蛍光色素のCt値から、試料中のSARS-CoV-2のRNAの有無を判定します。

[操作上の注意]

1. 検体及び試料

検体から抽出したRNAを本品の試料とします。抽出したRNAは、RNaseなどのコンタミネーションを避け、保存する場合は-80℃以下で凍結してください。検体は、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」を参照して取り扱ってください。なお、本品は実検体では十分に検討されていないことを理解した上で、使用してください。

*2. 交差反応性

次の表に示すコロナウイルス、他の呼吸器疾患の原因ウイルス及び細菌のRNA又はDNA（市販品）を測定したところ、以下の結果となりました。

ウイルス名又は細菌名	判定結果
SARS coronavirus（2003年流行）	陽性※
Human coronavirus 229E	陰性
Human coronavirus OC43	陰性
MERS coronavirus	陰性
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	陰性
influenzavirus_newH1N1	陰性
influenzavirus_H1N1	陰性
influenzavirus_H3N2	陰性
influenzavirus_H5N1	陰性
influenzavirus_B	陰性
respiratory syncytial virus_A	陰性
respiratory syncytial virus_B	陰性
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	陰性
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	陰性
<i>Legionella pneumophila</i>	陰性
<i>Haemophilus influenzae</i>	陰性
<i>Staphylococcus aureus</i> （mecA+）	陰性
<i>Staphylococcus aureus</i> （mecA-）	陰性

ウイルス名又は細菌名	判定結果
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	陰性
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	陰性

※ 7.0×10^4 コピー/反応で測定した結果、陽性を示しました。

また、本品のSARS-CoV-2以外への反応性をPrimer-BLAST (NCBI) を用いて検証したところ、SARS coronavirus (2003年流行)、Pangolin coronavirus及びBat coronavirusについては検出する可能性を認めました。一方で、次に示すヒトコロナウイルス、発熱の臨床症状を伴うウイルス、ならびに呼吸器に感染が認められるウイルス及び細菌については、交差反応性は認められませんでした。

- ・ Human coronavirus HKU1, NL63
- ・ 季節性インフルエンザウイルスA型 H7N9
- ・ パラインフルエンザウイルス 1、2、3型
- ・ ライノウイルス A、B、C型
- ・ アデノウイルス 1、2、3、4、5、7、55型
- ・ エンテロウイルス A、B、C、D
- ・ ヒトメタニューモウイルス、エプスタインバーウイルス、麻疹ウイルス、サイトメガロウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、ムンプスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス
- ・ 百日咳菌、化膿レンサ球菌、*Aspergillus fumigatus*、*Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Cryptococcus neoformans*

3. コンタミネーションの防止方法

本品はPCR増幅を伴うため、コンタミネーションに十分に注意する必要があります。エアロゾルの混入や検体で汚染されたピペットの使用などが原因となりますので、検査区域の分割やピペットの専用化がコンタミネーションの防止に効果的です。更に、紫外線照射や0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 約1,000 ppm）などを用いて作業環境を清浄化することで、コンタミネーションの危険を最小限にすることができます。また、PCR産物のキャリーオーバーコンタミネーションや検体間のクロスコンタミネーションを防止するために、次の事項に従うことを推奨します。

- (1) 検体や試料は、安全キャビネットなど、バイオセーフティレベルに対応した環境で扱ってください。専用のピペットやチップなどの器具を用意し、他の場所との共用はしないでください。チップはフィルター付きのものを用いてください。ここで使用する器具や保護衣等は、他の場所に持ち込まないでください。
- (2) 本品を扱う場所は、微生物や核酸分解酵素の混入を避けてください。紫外線照射可能なクリーンベンチなどを利用すると便利です。
- (3) 測定後のPCR産物は、キャリーオーバーコンタミネーションの原因となります。検体や試料を扱う場所や、本品を扱う場所で、反応後の容器を開封しないでください。
- (4) 実験台、使用器具などが検体やPCR産物で汚染された場合は、用時調製した0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液でよく拭き取ってください。ピペットなどの器具外部の汚染には、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液などによる拭き取り、あるいは紫外線照射を行ってください。ピペットなどの内部が汚染された場合は、直ちに使用を中止してください。
- (5) 使い捨ての手袋はパウダーフリーの製品を使用してください。手袋のパウダーには酵素反応を阻害する物質を含むものがあり、反応溶液に混入すると結果に影響を与える可能性があります。

以上の事項に従ってもコンタミネーションが起こる可能性がありますので、十分に注意してください。

*4. 共存物質

次表の共存物質については、試料中に混入した際に本品の判定結果に影響がないことを確認しています。

共存物質		添加濃度※
鼻用スプレー又は点鼻薬	フェニレフリン塩酸塩	2 mg/mL
	オキシメタズリン	2 mg/mL
	塩化ナトリウム	20 mg/mL
ステロイド剤	ベクロメタゾン	20 mg/mL
	デキサメタゾン	20 mg/mL
	フルニソリド	20 μ g/mL
	トリアムシノロンアセトニド	2 mg/mL
	ブデソニド	2 mg/mL
	モメタゾン	2 mg/mL
	フルチカゾン	2 mg/mL
アレルギー疾患治療薬	ヒスタミン二塩酸塩	5 mg/mL
抗ウイルス薬	ザナミビル	20 mg/mL
	リバビリン	10 mg/mL
	オセルタミビル	60 ng/mL
	リトナビル	60 mg/mL
抗菌薬	ムピロシシン	20 mg/mL
	アジスロマイシン	1 mg/mL
	メロペネム	200 mg/mL
	レボフロキサシン	10 μ g/mL
血液	ビリルビン・F	19 mg/dL
	ビリルビン・C	20.8 mg/dL
	溶血ヘモグロビン	460 mg/dL
	乳ビ	2,290 ホルマジン濁度

※実験的に影響がないことを確認した濃度

5. その他の留意事項

- (1) オリゴCミックスには、蛍光色素が含まれています。光によって退色するため、試薬調製時以外は遮光してください。
- (2) マスターミックスには、逆転写酵素、耐熱性DNAポリメラーゼが含まれています。未使用の試薬は、試薬調製時以外は、貯蔵方法に従って保管してください。
- (3) 陽性コントロールRNAは、RNA分解による断片化の影響を受けやすいため、試薬調製時以外は貯蔵方法に従って保管してください。

[用法・用量（操作方法）]

1. 本品以外に必要な機材・試薬

- (1) RNA抽出
 - 1) 安全キャビネット
 - 2) RNA抽出用試薬
 - 3) RNA抽出に必要な器具・機材
 - 4) RNA溶解液
- (2) リアルタイムPCR
 - 1) クリーンベンチ（試薬調製用）
 - 2) マイクロピペット
 - 3) フィルター付きチップ（RNase/DNase free）
 - 4) マイクロチューブ（RNase/DNase free）
- **5) PCRプレート（※）
- **6) プレートシール（※）
- 7) リアルタイムPCR装置（QuantStudio5 Dx Real-Time PCR System（サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社）など）
- 8) プレートミキサー又はボルテックスミキサー

- 9) 遠心機
 (3) 滅菌蒸留水 (RNA、RNase、DNA及びDNase Free)
 (4) その他
 1) 紫外線照射箱 (コンタミネーション防止用)
 2) 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (コンタミネーション防止用)
 **※使用するリアルタイムPCR装置のメーカーが推奨するものを使用してください。
 **必要な機材・試薬の詳細については [問い合わせ先] にお問い合わせください。

2. 試料の調製

検体から抽出したRNAを本品の試料として用います。試料の調製については、国立感染症研究所の「病原体検出マニュアル」に従ってください。

3. リアルタイムPCRシステムの設定

- (1) 反応設定
 (Stage 1 : RT reaction) 50℃ 5分
 (Stage 2 : Pre Heat) 95℃ 10秒
 (Stage 3 : PCR Cycle) 95℃ 5秒, 60℃ 60秒(Data collection) (45サイクル)
- (2) 検出設定
 PCR Cycle ステージの60℃のアニーリング・伸長反応時に下記の蛍光を検出できるように設定してください。
 FAM SARS-CoV-2_N1-PCR検出用
 YAK SARS-CoV-2_N2-PCR検出用
 CY5 IC検出用
 ROX Reference

注意：リアルタイムPCRシステムによって、蛍光検出の設定が異なる場合があります。使用するシステムの取扱説明書等を確認してください。

例：QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR Systemの場合
 <Properties /Experiment Properties>
 Experiment Type : Standard Curve
 Chemistry : TaqMan® Reagents
 Run mode : Standard
 <Plate /Assign Targets and Samples /Advanced Setup>
 Passive Reference : ROX
 Target 1/N1-PCR (FAM) Reporter : FAM, Quencher : None
 Target 2/N2-PCR (YAK) Reporter : VIC, Quencher : None
 Target 3/IC (CY5) Reporter : CY5, Quencher : None

4. 操作法

- (1) 試薬の調製
 ① 試薬の準備
 使用前に完全に融解していることを確認してください。また、オリゴICミックスは蛍光物質を含みますので、試薬調製時以外は遮光してください。陽性コントロールRNAは完全に融解させた後、よく混和し、必要量を滅菌蒸留水 (RNA、RNase、DNA及びDNase Free) で1,000倍に希釈してください。なお、希釈後の陽性コントロールRNAは速やかに使用してください。
 ② 反応液の調製
 1テストあたり、マスターミックス10 µLにオリゴICミックス5 µLを加えて、よく混和します。調製後はすぐに使用してください。
 ③ 反応液の分注
 反作用PCRプレートに、②で調製した反応液を1ウェルあたり15 µL分注します。
- (2) 試料の添加
 反応液を分注した増幅反作用PCRプレートの各ウェルに、試料又は陽性コントロールRNA (※) 5 µLを加え、蓋をして十分に混和し、軽い遠心などで溶液

を底に集めます。この時、ウェルの底に空気が入らないようにしてください。

※必要に応じて、陰性コントロール検体 (滅菌蒸留水 (RNA、RNase、DNA及びDNase Free)) を測定し、陰性であることを確認してください。

- (3) 測定
 「3. リアルタイムPCRシステムの設定」で設定した条件で測定します。
 (4) データ解析及び出力
 リアルタイムPCRシステムの制御・解析ソフトウェアで蛍光検出のCt値を算出してください。

【測定結果の判定法】

1. プローブの判定
 3つの検出領域 (N1-PCR、N2-PCR、IC) について、Ct値が40以下のとき、当該検出領域を陽性 (+) と判断します。Ct値が算出されない又は40より大きいときは、その検出領域を陰性 (-) と判断します。
2. 判定パターン
 3つの検出領域 (N1-PCR、N2-PCR、IC) におけるプローブの陽陰性を組み合わせて検出結果を判定します。なお、下表に該当しない組み合わせの場合には、判定保留とします。

N1-PCR (N-FAMプローブ)	N2-PCR (N2-YAKプローブ)	IC (IC-Cy5プローブ)	判定結果
+	+	+	陽性
+	+	-	陽性
+	-	+	陽性
-	+	+	陽性
-	-	+	陰性

3. 検査の妥当性確認
 陽性コントロールRNAについて、N1-PCR及びN2-PCR領域が陽性と判断された場合に、当該検査を検査成立とします。
4. 検出結果の判定
 各検体の検出結果について、上表に従って判定します。

【判定上の注意】

1. リアルタイムPCRシステムでの測定が正常に終了したことを確認してから判定してください。増幅曲線のベースラインが一定でない場合、正しい判定結果を得られない可能性があります。
2. 判定保留の場合は再測定し、複数の結果から判断してください。また、国立感染症研究所の「新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 検査法の運用についてのガイドライン」等を参考に判断してください。
3. 試料中に標的のRNAが存在しても、最小検出感度未満の場合や、プライマー又はプローブ設定部位に変異がある場合等は、本品の判定結果が陰性を示す可能性があります。

【臨床的意義】

コロナウイルスとは、人や動物の間で広く感染症を引き起こすウイルスで、このうち人に感染症を引き起こすものはこれまでに6種類が知られています。その中でも深刻な呼吸器疾患を引き起こすことがあるSARS-CoV (重症急性呼吸器症候群コロナウイルス) とMERS-CoV (中東呼吸器症候群コロナウイルス) 以外は、感染した場合でも重度でない症状にとどまるとされてきました¹⁾。しかし、2019年12月以降、中華人民共和国湖北省武漢市において、原因不明の肺炎患者が急増し、世界保健機関は、新種のコロナウイルスがその原因であることを発表しました。

この新種のコロナウイルスは、国際ウイルス分類委員会において「SARS-CoV-2」と命名されました²⁾。SARS-CoV-2による感染症は、世界各地に急速に広まり、多数の

患者と死者を出し、世界的に迅速かつ有効な対策が必要です。

SARS-CoV-2による感染症の診断において、臨床症状や画像所見のみから、同様の症状を示す類縁疾患との鑑別を行うことは困難です。そのため、確定診断を行うためには、原因であるウイルスを検出・特定し、臨床症状等と併せて診断することが重要です。また、適切な診断は、隔離措置や対症療法など適切な患者管理を行うことにも繋がります。

本品は、Quenched qPCRプローブを用いた1step RT-PCR法によって、患者の検体中のSARS-CoV-2を検出する試薬です。本品は患者の検体から抽出したRNAを用いてSARS-CoV-2を検出することで、その有無を確認することができます。

本品を用いてSARS-CoV-2の有無を確認することは、SARS-CoV-2感染の診断の補助に有用です。

<臨床性能試験結果>

(1) 本品と国立感染症研究所における診断結果との判定一致率

国立感染症研究所から提供された臨床検体(25例)を用いて、感染研の病原体検出マニュアルに基づく方法と本品を比較した結果、陽性一致率及び陰性一致率はいずれも100%でした³⁾。

		国立感染症研究所 診断結果		合計
		陽性	陰性	
本品	陽性	10	0	10
	陰性	0	15	15
合計		10	15	25

全体一致率：100% (25/25)

陽性一致率：100% (10/10)

陰性一致率：100% (15/15)

[性能]

1. 性能

性能試験には、以下の管理検体を用いました。

管理検体1(陽性)

較正用基準物質が 1.0×10^5 コピー/ μ Lの濃度で含まれる試料(RNA)

管理検体2(陰性)

較正用基準物質を含まない試料(滅菌蒸留水(RNA、RNase、DNA及びDNase Free))

(1) 感度試験

管理検体1を10コピー/ μ Lの濃度で試料として操作した場合、N1-PCR及びN2-PCRのCt値は40以下で、陽性と判定される。

管理検体2を試料として操作した場合、N1-PCR及びN2-PCRのCt値は算出されない又は40より大きい、ICのCt値は40以下で、陰性と判定される。

(2) 正確性試験

管理検体1を10コピー/ μ Lの濃度で試料として操作した場合、陽性と判定される。

管理検体2を試料として操作した場合、陰性と判定される。

(3) 同時再現性試験

管理検体1を10コピー/ μ Lの濃度で試料として3回同時に操作した場合、全て陽性と判定される。

管理検体2を試料として3回同時に操作した場合、全て陰性と判定される。

(4) 最小検出感度

50コピー/反応(RNAとして)

2. 較正用基準物質

較正用基準物質は、SARS-CoV-2のN遺伝子配列の約1,000塩基配列を人工合成したRNAです。較正用基準物質のコピー数は、国立感染症研究所のN2セット陽性コントロールv2に基づいて確認しました。

[使用上又は取扱い上の注意]

1. 取扱い上の注意

- (1) コンタミネーションを防止するために紫外線を照射する場合は、紫外線ランプを直視しないでください。また、紫外線を照射したままで作業しないでください。
- (2) 試薬が目や口に入った場合は、大量の水で十分に洗い流してください。また、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
- (3) 試薬及び試料を調製する際に、口でピペットを扱わないでください。

2. 使用上の注意

- (1) 外箱記載の使用期限を過ぎた試薬は、結果の信頼性を保証できませんので、使用しないでください。
- (2) 異なる製品ロットの試薬を混合したり、組み合わせたりして使用しないでください。また、同一の製品ロットであっても試薬を注ぎ足すことはしないでください。
- (3) 開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は蓋を閉めて指定の方法で保存してください。試薬の凍結融解回数は5回以内としてください。本品は室温に放置すると失活する可能性がありますので、 $-15^{\circ}\text{C} \sim -35^{\circ}\text{C}$ で保存してください。
- (4) 試薬の調製に使用する容器や器具は、清浄なものを使用してください。

3. 廃棄上の注意

検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。

測定に使用した試料及び器具は、次のいずれかの方法で処理してください。

- ① 2%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
- ② 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸漬する。
- ③ 121°C で20分以上高圧蒸気滅菌する。

また、試薬や器具などを廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法などの規定に従ってください。

[貯蔵方法・有効期間]

1. 貯蔵方法

構成試薬は全て $-15^{\circ}\text{C} \sim -35^{\circ}\text{C}$ で保存してください。オリゴICミックスは遮光保存してください。

2. 有効期間

製造後6箇月(使用期限は外箱に記載されています)。

[包装単位]

製品コード	製品名	包装
GS-R0201	MEBRIGHT SARS-CoV-2 キット	96回包装

[主要文献]

1. 国立感染症研究所ウェブサイト「コロナウイルスとは」(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/9303-coronavirus.html>)
2. Alexander, E. G. et al. Nature Microbiology. 2020, vol. 5, p. 536-544.
3. 臨床検体を用いた評価結果が取得された2019-nCoV遺伝子検査方法について. 国立感染症研究所.

*[承認条件]

承認時のデータが極めて限られていることから、製造販売後に臨床性能を評価可能な適切な試験を実施すること。

[問い合わせ先]

株式会社医学生物学研究所 学術部
〒105-0012 東京都港区芝大門2丁目11番8号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL: 03-6854-3613 E-mail: kensa@mbl.co.jp

[製造販売元]

株式会社医学生物学研究所
〒396-0002 長野県伊那市手良沢岡1063-103
TEL：0265-76-1777 FAX：0265-76-0584

「MEBRIGHT」は、株式会社医学生物学研究所の登録商標です。（登録商標 第6303746号）