cobas®

＊この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品　　**2024年 3月改訂（第7版）
*2022年11月改訂（第6版）

製造販売承認番号：30200EZX00001000

サイトメガロウイルス核酸キット

コバス 6800/8800 システム CMV

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて、担当医師が総合的に判断してください。

*3. 電子化された添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。

*4. 使用する機器の電子化された添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。また、試薬ごとに設定された反応時間及び温度などは厳守してください。

5. 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
6. キットの試薬を取り扱う際には保護眼鏡、実験着及び使い捨てゴム手袋を着用し、試薬が皮膚、目、粘膜など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、大量の水でじゅうぶんに洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。

【形状・構造等（キットの構成）】

コバス 6800/8800 システム CMV　　192 テスト用 1 カセット

1. プロテアーゼ試液　〔PASE〕
2. DNA 定量標準試液〔DNA-QS〕
3. 溶出試液　〔EB〕
4. マスターミックス 1　〔MMX-R1〕
5. マスターミックス 2　〔CMV MMX-R2〕
   CMV プライマー 1
   CMV プライマー 2
   CMV プライマー 3
   CMV プローブ
   2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
   2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
   2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
   2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(dUTP)
   Z05-D DNA ポリメラーゼ

【使用目的】

血漿中のサイトメガロウイルス(CMV)DNA の測定(CMV 感染の診断の補助)

【測定原理】

1. **本キットの測定は以下の 2 つのステップからなります。試料の調製から増幅及び測定までは「コバス 5800 システム」、「コバス 6800 システム」又は「コバス 8800 システム」が自動で行います。**

(1) 試料の調製

コバス OMNI 検体希釈液を加えた検体又はコントロールにプロテアーゼ試液(PASE)、既知量の定量標準 DNA(QS DNA)を含む DNA 定量標準試液(DNA-QS)、コバス OMNI MGP 試薬及びコバス OMNI ライシス試薬を添加してインキュベーションします。これによりウイルス中の DNA が遊離し、検体中の核酸が磁性粒子に吸着します。核酸が吸着した磁性粒子は、磁石により捕らえられて固定され、タンパク質などの不要な成分は洗浄により除去されます(B/F 分離)。これに溶出試液を加えて核酸を遊離させ試料とします。

(2) 増幅及び測定

(1)に引き続き、増幅及び測定が行われます。リアルタイム PCR(Polymerase Chain Reaction)法[1),2)]を応用し、測定には蛍光色素(レポーター)及び消光物質(クエンチャー)で標識した CMV DNA 用及び QS DNA 用 DNA プローブを用います。このプローブの蛍光色素は、クエンチャーが近くに存在する場合は、クエンチャーにより蛍光が消光され強い蛍光を発することはありませんが、レポーターとクエンチャーが切り離された場合は、レポーターが遊離するために強い蛍光を発するようになります。

初めに、(1)で調製した試料にマスターミックス 1 とマスターミックス 2 を加えます。2 本鎖 DNA を高温で 1 本鎖に変性させた後に温度を下げると CMV DNA 用及び QS DNA 用 DNA プローブが標的配列とハイブリダイズします。また、プライマーが標的配列の 3'末端側へアニールし、Mn^{2+}及びデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)存在下、耐熱性 Z05-D DNA ポリメラーゼの働きにより標的配列に相補的な DNA 鎖が伸長されます。DNA 鎖の伸長と同時に既に標的配列とハイブリダイズしている CMV DNA 用及び QS DNA 用 DNA プローブは Z05-D DNA ポリメラーゼの 5'→3'エクソヌクレアーゼ活性により分解され蛍光を発します。続いてこの蛍光強度を CMV DNA 用蛍光色素及び QS DNA 用蛍光色素それぞれに固有の異なる波長で測定します。この「熱変性」、「DNA プローブと標的配列のハイブリダイズ」、「プライマーのアニーリング」、「耐熱性 Z05-D DNA ポリメラーゼによる相補鎖の伸長と DNA プローブの分解による蛍光発光」、「蛍光強度の測定」を所定のサイクルで連続的に繰り返し、各サイクルの PCR 産物をリアルタイムにモニターしながら増幅曲線を作成します。作成した増幅曲線より蛍光強度が一定量以上となるサイクル数を求め、Ct 値(Cycle-to-threshold value)とします。QS DNA の Ct 値と反応液中 CMV DNA の Ct 値を比較して試料中の CMV DNA 濃度を算出します。

2. **キャリーオーバーコンタミネーションの防止**

本キットでは、以下の方法により増幅された DNA 産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる誤測定を最小限に抑制しています。DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて増幅反応を行うため、増幅された DNA の塩基配列はチミン(T)がウラシル(U)に全て置き換わっています。また、この系で増幅された DNA が新たに試験する試料中へ混入した場合、マスターミックスに含まれているウラシル N-グリコシラーゼ(UNG)が作用し DNA 中の U 塩基は除去されます。塩基を失った DNA は構造上極めて不安定な分子であり、増幅反応の最初の加熱によりリン酸結合が切断され、新たな増幅の鋳型とはなり得ません。UNG は高温で失活するため、それ以後に増幅されてくる U 塩基を含む増幅 DNA は影響を受けません。また、UNG は 6 塩基以上の DNA 上のウラシルのみに反応し、モノマーの dUTP や RNA 上のウラシルには作用しません[3)]。

【操作上の注意】

1. **測定試料の性質、採取法**

**本キットの測定試料には、血漿を用います。抗凝固剤には EDTA を使用してください。ヘパリンは PCR 反応を阻害しますので使用しないでください。採血後、全血を 2～25℃で 24 時間以内に遠心して血漿を分離してください。分離後、血漿検体は以下のいずれかの条件で保存できます。

・2～8℃で採血日より 6 日間保存した後-75±15℃で 6 ヵ月間
・-20±2℃で 6 ヵ月間

凍結融解は 4 回まで可能です。凍結保存融解後はよく混和してから使用してください。

なお、全血は 2～25℃で最大 36 時間まで保存できますが、分離

された血漿検体は保存せずにすみやかに測定してください。採血管の使用に関しては、採血管の製造元の指示に従ってください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

(1) トリグリセライド 3,450mg/dL、抱合型及び非抱合型ビリルビン 25mg/dL、アルブミン 5.87g/dL、ヘモグロビン 0.29g/dL、ヒト DNA 0.2mg/dL までは、本品の測定に与える影響はありません。

(2) 全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)及び抗核抗体(ANA)などの自己免疫疾患の存在が、本品の測定に与える影響はありません。

(3) 本品の測定に影響を及ぼす可能性のある薬剤について、それぞれ最高血漿中濃度の 3 倍になるよう添加した CMV 陰性 EDTA 血漿検体を、CMV DNA 最終濃度が約 230 IU/mL となるよう調製し本品で検討した結果、測定値への影響は認められませんでした。

薬剤名	薬効分類	最高血漿中濃度 (Cmax)
フルコナゾール	抗真菌薬	6.70 μg/mL
セフォテタン	抗生物質	237.00 μg/mL
クラブラン酸カリウム		8.00 μg/mL
ピペラシリン		**298.00 μg/mL
タゾバクタムナトリウム		34.00 μg/mL
スルファメソキサゾール(SMX)		68.00 μg/mL
チカルシリンナトリウム		324.00 μg/mL
トリメトプリム(TMP)		2.00 μg/mL
バンコマイシン		63.00 μg/mL
ガンシクロビル	DNA ポリメラーゼ阻害薬	9.00 μg/mL
バルガンシクロビル		5.60 μg/mL
シドフォビル		20.00 μg/mL
ホスカルネット		623.00 μmol/L
アザチオプリン	免疫抑制剤	1.00 μg/mL
シクロスポリン		1.80 μg/mL
エベロリムス		4.00 μg/mL
ミコフェノール酸モフェチル		25.00 μg/mL
ミコフェノール酸		37.00 μg/mL
プレドニゾン		12.00 μg/mL
シロリムス		15.00 μg/mL
タクロリムス		0.07 μg/mL

3. 反応特異性

NIBSC WHO Int.std. HCMV、及び糖タンパク B(gB)の 3 種類の遺伝子型(gB-2、gB-3、gB-4)につき、下記のとおり検討しました。

(1) NIBSC WHO Int.std. HCMV(遺伝子型 gB-1)
CMV 陰性 EDTA 血漿に NIBSC WHO Int.std. HCMV を添加し 8 濃度に段階希釈した検体パネル(92.0、46.0、34.5、23.0、11.5、5.8、2.9、1.4 IU/mL)及びブランクの試料を、本品を用いて 189 重測定したところ、23.0 IU/mL まで検出が可能でした。

(2) 遺伝子型 gB-2、gB-3、gB-4
CMV 感染細胞培養上清から精製した試料について、それぞれを 3 濃度(51.75、34.5、17.25 IU/mL)となるように調整し、本品を用いて 63 重測定したところ、gB-2 は 17.25 IU/mL まで、gB-3 と gB-4 は 34.5 IU/mL まで検出が可能でした。

4. 交差反応性

Adenovirus type-5、BK Polyomavirus、Epstein-Barr Virus、Hepatitis B Virus、Hepatitis C Virus、Herpes Simplex Virus type-1、Herpes Simplex Virus type-2、Human Herpes Virus type-6、Human Herpes Virus type-7、Human Herpes Virus type-8、Human Immunodeficiency Virus-1、Human Immunodeficiency Virus-2、Human Papillomavirus、JC virus、Parvovirus B19、Varicella-Zoster Virus、*Propionibacterium acnes*、*Staphylococcus aureus*、*Chlamydia trachomatis*、*Clostridium perfringens*、*Enterococcus faecalis*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Listeria monocytogenes*、*Mycobacterium avium*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus pyogenes*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Salmonella typhimurium*、*Streptococcus pneumoniae*、*Aspergillus niger*、*Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans* について CMV 陰性 EDTA 血漿に添加した試料を本キットで測定したところ、交差反応性は認められませんでした。

5. コンタミネーションに関して

本キットではマスターミックス 2 に UNG が添加されており、また、Z05-D DNA ポリメラーゼによる DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて PCR を行います。したがって、本キットにて増幅された DNA のキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止することはできますが、検体間で発生するクロスコンタミネーションを防止することはできません。クロスコンタミネーションは、主に検体を扱ったピペットなどで発生するエアロゾルやピペット本体の汚染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及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃を徹底することで、クロスコンタミネーションを最小限に防止することができます。したがって、本キットの測定に当たっては次の事項を徹底するようにしてください。

(1) 検体をサンプルチューブに分注する際は、安全キャビネットを利用するなどバイオセーフティー/バイオハザードに準拠した環境で実施してください。専用のピペットとチップなどを用意し、ほかの場所との共用は避けてください。ここで使用する器具や保護衣をほかの場所に持ち込まないでください。また、分注時には、すべて静かに操作してエアロゾルの発生をできる限り防止してください。

(2) 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる RNase や DNase が少量でも検体に混入しますと、RNA や DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。

(3) 実験台及び使用器具などが検体や増幅 DNA で汚染された場合は、用時調製した次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)でよく拭き取るか、紫外線照射をじゅうぶん行ってください。なお、ピペットなどの内部が汚染されたと判断された場合は、直ちにその使用を中止して新しい器具に交換してください。

以上の事項に従っても、クロスコンタミネーションが起こる可能性がありますので、結果の判定にはじゅうぶん注意してください。

なお、陰性サンプル(正常ヒト EDTA 血漿)及び高濃度検体(CMV DNA 濃度 1.00+ 06 IU/mL)を市松模様に配置した測定を合計 5 ラン実施したところ、この検討では検出数 0/陰性サンプル数 240 であり、クロスコンタミネーション発生率は 0%(95%信頼区間:0%～1.5%)でした。

6. その他の留意事項

試料中に PCR の妨害物質が存在すると正しい判定結果が得られないので注意してください。また、試料中に標的 DNA が存在しても最小検出感度以下である場合には Target Not Detected (検出せず)と判定されることがありますので注意してください。

【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬の調製方法

すべての試薬はそのまま用います。

2. 別途必要な器具・器材・試薬

コバス 5800 システム、コバス 6800 システム及びコバス 8800 システム共通

(1) コバス 6800/8800 システム CMV コントロールキット※1

(2) コバス 6800/8800 システム NHP 陰性コントロールキット※1

(3) コバス OMNI 廃液タンク※2

(4) コバス OMNI ライシス試薬※1

(5) コバス OMNI MGP 試薬※1
(6) コバス OMNI 検体希釈液※1
(7) コバス OMNI 洗浄試薬※1
(8) サンプルチューブ
(9) 安全キャビネット(陰圧)
(10) ゴム手袋(パウダーフリー)

コバス 5800 システムに用いる器具・器材

(1) コバス OMNI P プレート 24※2
(2) コバス OMNI A プレート 24※2
(3) コバス OMNI 廃液プレート 24※2
(4) コバス OMNI バイオハザードバッグインサート付き又はコバス OMNI バイオハザードバッグ※2
(5) CORE チップ 300μL※2
(6) CORE チップ 1000μL※2
(7) コバス 5800 システム
(8) コバス 5800 システムソフトウエア
(9) x800 Data manager
(10) 検体架設用ラック(用途に応じてコバス 5800 システム 5-ポジションラックキャリア、コバス 5800 システム 16-ポジションサンプルラックキャリア、コバス 5800 システム Cell Collection Media キャリアを用いる)

コバス 6800 システム又はコバス 8800 システムに用いる器具・器材

(1) コバス OMNI P プレート※2
(2) コバス OMNI A プレート※2
(3) コバス OMNI ピペットチップ※2
(4) コバス OMNI バイオハザードバッグインサート付き※2
(5) コバス 6800 システム又はコバス 8800 システム
(6) コバス 6800 システム又はコバス 8800 システムソフトウエア
(7) コバス 6800 システム又はコバス 8800 システム IG サーバー
(8) MPA ラック※2
(9) コラプシブルトレイ※2

※1 別売品の専用試薬を使用してください。
※2 別売品の専用消耗品を使用してください。

検体分注専用として下記を用意してください(安全キャビネット内で使用します)。

(1) 試験管ミキサー
(2) マイクロピペット(1,000μL)及びチップ
(チップは疎水性フィルター付きで、1,000μL 用)
(3) ゴム手袋(パウダーフリー)

3. 操作方法

コバス 5800 システム

**測定に必要な検体量は 500μL(デッドボリューム 150μL+検体使用量 350μL)です。検体架設用ラックにセットする採血管の形状やサイズによっても推奨検体量が異なりますので、詳細はコバス 5800 システム取扱説明書をご参照ください。

(1) 試料の準備

検体を試験管ミキサーにて 3～5 秒間混和しその後、遠心により検体を振り落とします。また、検体を分取する場合は液面の上方より分取し、分離剤付近からは分取しないでください。

(2) コバス 5800 システムの準備

1) 装置右側面スイッチを押し本体の電源を入れます。
2) ユーザーインターフェースにログインします。
3) 必要に応じ保守点検を実施します。

(3) 試薬のロード(セット)

1) コバス 6800/8800 システム CMV を試薬カセットドロワーにロードします。また、必要に応じてコバス 6800/8800 システム CMV コントロールキット、コバス 6800/8800 システム NHP 陰性コントロールキットをコントロールミニラックドロワーにロードします。
2) コバス OMNI MGP 試薬を MGP カセットドロワーにロードします。
3) コバス OMNI ライシス試薬、コバス OMNI 検体希釈液、コバス OMNI 洗浄試薬をバルク試薬ドロワーにロードします。

(4) 消耗品のロード(セット)

1) CORE チップ 300μL を E チップトレイドロワーに、CORE チップ 1000μL を P チップトレイドロワーにそれぞれロードします。
2) コバス OMNI P プレート 24 を P プレートドロワーに、コバス OMNI A プレート 24 を A プレートドロワーにロードします。
3) コバス 廃液プレート 24 を廃液プレートドロワーにロードします。

(5) 試料のオーダー(登録)とロード(セット)

オーダーする方法は、装置ソフトウェアでのマニュアルオーダーとオンラインによるオーダーの二とおりあります。オンラインによるオーダーは上位の検査システムからオーダーを受け取る方法です。

1) 検体架設用のラックにバーコードが付与されたサンプルチューブをのせ、サンプルローディングエリアへロードします。
サンプルチューブに関してはコバス 5800 システムの取扱説明書を参照して下さい。
2) マニュアルオーダー、またはオンラインによるオーダーにより各検体のテストオーダーが作成されます。
3) テストオーダーは同時に測定をする最大 24 テスト(外部コントロールを含む)の組みであるバッチでスケジューリングされます。

(6) コバス 5800 システムによる測定開始

装置操作画面にてバッチが作成されたことを確認し、スタートボタンをクリックして測定を開始します。

(7) 測定の終了

測定が終了したら、結果を印刷、又はオンラインで上位の検査システムへ送信します。サンプルチューブを取り出し、固形廃棄物、廃液の廃棄を行います。

コバス 6800 システム又はコバス 8800 システム

**測定に必要な検体量は 500μL(デッドボリューム 150μL+検体使用量 350μL)です。測定に必要な検体量は MPA ラックにセットするサンプルチューブ、採血管の形状やサイズによっても推奨検体量が異なりますので、詳細はコバス 6800 システム、コバス 8800 システムの取扱説明書を参照してください。1 測定につきコントロールとして、高値(+)コントロール〔CMV H(+)C〕、低値(+)コントロール〔CMV L(+)C〕及び NHP(−)陰性コントロール〔NHP-NC〕を測定し、精度管理を行います。

(1) 試料の準備

検体を試験管ミキサーにて 3～5 秒間混和しその後、遠心により検体を振り落とします。また、検体を分取する場合は液面の上方より分取し、分離剤付近からは分取しないでください。

(2) コバス 6800 システム、コバス 8800 システムの準備

1) タッチスクリーン下部の主電源を押します。
2) サンプルサプライモジュールの電源を ON にします。
3) ユーザーインターフェースにログインします。
4) 必要に応じ保守点検を実施します。
5) ユーザーインターフェース上のスタートボタンをクリックします。

(3) 試薬のロード(セット)

1) コバス 6800/8800 システム CMV、コバス 6800/8800 システム CMV コントロールキット、コバス 6800/8800 システム NHP 陰性コントロールキットをトランスファーモジュールのドロワーから内蔵の冷蔵庫にロードします。
2) コバス OMNI MGP 試薬をプロセスモジュールのドロワー内のマガジンにロードします。

3) コバス OMNI ライシス試薬、コバス OMNI 検体希釈液、コバス OMNI 洗浄試薬をプロセスモジュールのバルク試薬ドロワー、及び洗浄試薬ドロワーへロードします。

(4) 消耗品のロード(セット)

1) コバス OMNI ピペットチップをトランスファーモジュールのドロワー内のマガジンへロードします。

2) コバス OMNI P プレート、コバス OMNI A プレートをプロセスモジュールのドロワー内のマガジンにロードします。

(5) 試料のオーダー(登録)とロード(セット)

オーダーする方法は、ラックベースオーダーとオンラインによるオーダーの二とおりあります。ラックベースオーダーはラック ID に対しあらかじめ検査項目を指定する方法で、ソフトウェア上で設定できます。オンラインによるオーダーは上位の検査システムからオーダーを受け取る方法です。

1) MPA ラックにバーコードが付与されたサンプルチューブをのせ、コラプシブルトレイ(MPA ラックが最大 15 本搭載可能)に MPA ラックを載せて、サンプルサプライモジュールへロードします。

MPA ラック	サンプルチューブ	
	直径 (mm)	高さ (mm)
13 mm	11.5 – 13.0	75 – 100
16 mm	14.5 – 16.0	75 – 100

サンプルチューブに関してはコバス 6800 システム、コバス 8800 システムの取扱説明書を参照してください。

2) ラックベースオーダー、又はオンラインによるオーダーにより検体ごとのテストオーダーが作成されます。

3) テストオーダーは同時に測定をする最大 96 テスト(外部コントロールを含む)の組みであるバッチに割り当てられます。

(6) コバス 6800 システム、コバス 8800 システムによる測定開始

バッチ内のテストオーダー数が 96 に到達した場合、機器は自動で測定を開始します。96 に満たない場合は、ソフトウェア上のマニュアルスタートボタンをクリックして測定を開始します。

(7) 測定の終了

測定が終了したら、結果を印刷、又はオンラインで上位の検査システムへ送信します。サンプルチューブを取り出し、固形廃棄物、廃液の廃棄を行います。

各機器の操作の詳細については、取扱説明書を参照してください。操作の概略は最終ページの図を参照してください。

4. CMV DNA 濃度の算出

検体中の CMV DNA は既知量の定量標準 DNA(QS DNA)と共に PCR により増幅されます。この PCR による増幅産物をサイクルごとにリアルタイムにモニターしながら、反応液中の CMV DNA 及び QS DNA の増幅曲線を作成します。作成した増幅曲線より発光強度が一定量以上となるサイクル数を求め、Ct 値(Cycle-to-threshold value)とします。QS DNA の Ct 値と反応液中の CMV DNA の Ct 値を比較して試料中の CMV DNA 濃度を全自動で算出します。CMV DNA 濃度は、WHO 標準品に基づき IU/mL で表示されます。

【測定結果の判定法】

***1. 測定結果の判定**

コバス 5800 システム、コバス 6800 システム又はコバス 8800 システムでは、検体及びコントロールの CMV DNA 濃度算出を自動で行います。CMV DNA 量は、IU/mL で表示されます。

各コントロールについて、測定画面又は印字用紙に結果とともに記されるフラグ及びコメントをチェックして、測定が正しく行われたことを確認します。コントロールの測定結果のコメントについては下表を参照してください。

コントロールの測定結果

機器における表示	フラグ	解釈
(–)C	Q02	コバス NHP 陰性コントロールにおいて、測定値が陰性として測定されない、又は測定結果無効
CMV L(+)C	Q02	コバス 6800/8800 システム CMV 低値(+)コントロールの測定値が許容範囲から外れている、又は測定無効
CMV H(+)C	Q02	コバス 6800/8800 システム CMV 高値(+)コントロールの測定値が許容範囲から外れている、又は測定無効

各測定検体についても同様にフラグ及びコメントをチェックします。検体の測定結果については以下のとおり表示されます。検体測定結果のフラグにつきましては、各機器の取扱説明書を参照してください。

検体の測定結果

機器における測定結果の“表示”、“印字”	解釈
Target Not Detected	検出せず
＜Titer Min[a)]	検出(定量下限未満)
X.XXe＋XXX IU/mL[b)]	CMV DNA 量の測定値
＞Titer Max[c)]	測定上限を超えた

a) 34.5 IU/mL

b)「1.23e＋005 IU/mL」と表示された場合、「1.23×10^5 IU/mL」を示します。

c) 1.0×10^7 IU/mL

測定結果が測定上限(1.0×10^7 IU/mL)を超えたケースで定量的結果が必要な場合はもとの検体を CMV 陰性 EDTA 血漿にて希釈して測定を実施してください。測定値は、報告された結果を希釈率で乗じた値となります。

2. 結果の判定にかかる注意

(1) 以下の検体では、偽陰性又は有効な結果が得られない可能性がありますので、注意してください。

1) EDTA 血漿以外の検体

2) −18℃より高い温度で長期保存された検体

3) 凍結と融解を 4 回より多く繰り返した検体

4) CMV DNA のコンタミネーションを受けた検体

上記のような検体の場合は、適切な検体を再度採取し測定を行ってください。DNA 抽出操作及び測定操作が不適切であると判断された場合は、再度測定してください。

(2) 本キットのプライマーやプローブの塩基配列と試料中の CMV DNA の塩基配列との相違が大きくなると、測定値が低くなるか測定できない可能性がありますので、判定にはじゅうぶん注意してください。そのほかの原因でも“検出せず”となる可能性がありますので、本キットで“検出せず”と判定されても必ずしも CMV の存在を否定するものではありません。測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。

(3) 反応の阻害などにより PCR における増幅効率が低下した場合、増幅曲線に対してソフトウェアの解析アルゴリズムが対応できないケースが稀に発生する可能性がありますので、注意してください。

【臨床的意義】

CMV 感染症は、先天性 CMV 感染症、幼児期を中心に感染する後天性 CMV 感染症、臓器移植患者など免疫抑制剤投与患者における日和見感染による CMV 感染症があります。特に移植患者では CMV 感染症は極めて注意を要する合併症の一つであり、CMV 感染症の早期診断や早期治療の重要性が認識されています。欧米を中心とした諸外国では QNAT 法を用いた CMV DNA 検査が主流ですが、本邦では CMV 検査はアンチゲネミア法が主に用いられています。しかしながら、CMV 感染症の予防的治療薬が保険適用されるなど新たな治療法が導入され、高感度・迅速性・高精度を実現する CMV DNA 検査のニーズが急速に高まってきています。本品を用いた臨床性能試験では、

本法はアンチゲネミア法に対して良好な相関性を示し、また移植患者のモニタリングにおいてもアンチゲネミア法と同様の変動挙動を示したことから、本品は「CMV 感染の診断の補助」という臨床的意義を有しています(参照:【性能】2. 臨床性能試験成績欄)。

【性能】

1. 性能

【用法・用量(操作方法)】の記載に従い、感度・正確性・同時再現性の各試験を行った場合、下記の規格値に適合します。

(1) 感度試験

「管理用試料 1」を 11 回同時に測定するとき、有効測定数は 10 回以上であり、Hit Rate※は 100%である。ただし、Hit Rate が 90%以上 100%未満の場合は、更に「管理用試料 1」を 21 回同時に測定し、有効測定数は 20 回以上、初回の有効測定結果と合わせた Hit Rate は 96.7%以上であることを確認する。

(2) 正確性試験

「管理用試料 2」及び「管理用試料 3」を 11 回同時に測定するとき、有効測定数は 10 回以上であり、対数変換した有効測定値が既知濃度の対数変換値の±0.5 の範囲内となる割合は 100%である。ただし、90%以上 100%未満の場合は、更に「管理用試料 2」及び「管理用試料 3」を 41 回同時に測定し、有効測定数は 40 回以上、初回の有効測定結果と合わせた対数変換した有効測定値が既知濃度の対数変換値の±0.5 の範囲内となる割合は 98%以上であることを確認する。

「陰性管理用試料」を 11 回同時に測定するとき、有効測定数は 10 回以上であり、Hit Rate※は 0%である。ただし、Hit Rate が 0%より大きく 10%以下の場合は、更に「陰性管理用試料」を 21 回同時に測定し、有効測定数は 20 回以上、初回の有効測定結果と合わせた Hit Rate は 3.3%未満であることを確認する。

(3) 同時再現性試験

「管理用試料 2」及び「管理用試料 3」を 11 回同時に測定するとき、有効測定数は 10 回以上であり、対数変換した有効測定値の SD 値は 0.15 以下である。

ただし、SD 値が 0.15 より大きく 0.19 以下の場合は、更に「管理用試料 2」及び「管理用試料 3」を 41 回同時に測定し、有効測定数は 40 回以上、初回の有効測定結果と合わせた SD 値は 0.15 以下であることを確認する。

※Hit Rate: シグナルが検出された測定数／有効測定数×100 %

管理用試料

管理用試料 1、管理用試料 2 及び管理用試料 3 は CMV 塩基配列含有プラスミド DNA とヒト陰性血漿を用い作製したものです。CMV DNA 濃度は管理用試料 1 が約 2.30×10^2 IU/mL、管理用試料 2 が約 4.95×10^6 IU/mL、管理用試料 3 が約 1.89×10^3 IU/mL となるよう調製します。

陰性管理用試料はヒト陰性血漿を用い調製したものです。

(4) 測定範囲

$34.5\sim1.0\times10^7$ IU/mL

測定範囲の下限は最小検出感度※です。

※ 95%以上の検出率が得られる濃度

2. 臨床性能試験成績

国内で臓器移植患者又は造血幹細胞移植(HSCT)患者から採取された 1,936 検体を解析対象とし、以下の評価を行いました。

(1) アンチゲネミア法との判定一致率

全検体を対象として、本品とアンチゲネミア法との相関性を判定一致率で評価しました。本品は測定試薬であるため、以下の 2 パターンで測定結果から仮の定性結果を求め、アンチゲネミア法との陽性一致率、陰性一致率及び全体一致率を算出しました。

1) 本品「Target Not Detected」となった検体を陰性相当(1)とした場合

本品で「＜Titer Min」あるいは「定量値あり」となった検体を陽性相当(1)、「Target Not Detected(TND)」となった検体を陰性相当(1)とし、アンチゲネミア法との一致率をそれぞれ算出しました。その結果、陽性一致率は 96.7%(378/391)と非常に良好な一致率を示しましたが、陰性一致率は 69.1%(1,068/1,545)であり、陽性一致率に比べて低い値を示しました。これは、リアルタイム PCR 法である本品が非常に高感度な検査であり、本設定では極めて低濃度と考えられる検体も陽性相当群に分類されるため、本品「陽性相当(1)」アンチゲネミア法「陰性」を示す検体が多くなり、陰性一致率が低くなったと考えられました。なお、全体一致率は 74.7%(1,446/1,936)でした。

		アンチゲネミア法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性相当① (定量値あり、＜Titer Min)	378	477	855
	陰性相当① (TND)	13	1,068	1,081
計		391	1,545	1,936

陽性一致率 96.7%(378/391)
陰性一致率 69.1%(1,068/1,545)
全体一致率 74.7%(1,446/1,936)

2) 本品「TND」あるいは「＜Titer Min」となった検体を陰性相当(2)とした場合

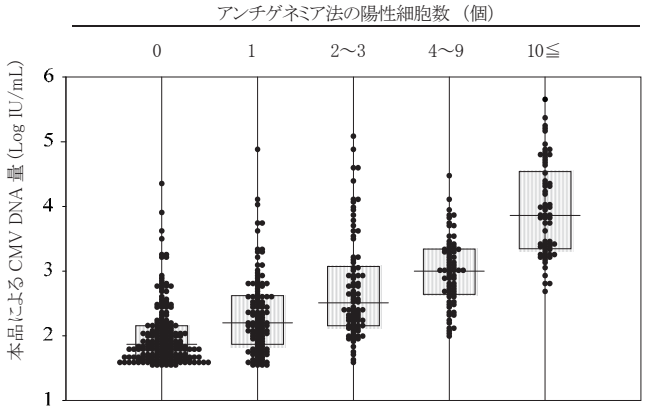
本品で「TND」あるいは「＜Titer Min」となった検体を陰性相当(2)、「定量値あり」となった検体を陽性相当(2)とし、アンチゲネミア法との一致率をそれぞれ算出しました。その結果、陽性一致率は 87.5%(342/391)、陰性一致率は 87.3%(1,349/1,545)、全体一致率は 87.3%(1,691/1,936)と良好な一致率が示されました。したがって、本品で「TND」あるいは「＜Titer Min」を陰性相当、「定量値あり」を陽性相当と設定することで、アンチゲネミア法の定性結果に対する一致率が高くなることが示されました。

		アンチゲネミア法		計
		陽性	陰性	
本品	陽性相当② (定量値あり)	342	196	538
	陰性相当② (＜Titer Min、TND)	49	1,349	1,398
計		391	1,545	1,936

陽性一致率 87.5% (342/391)
陰性一致率 87.3% (1,349/1,545)
全体一致率 87.3% (1,691/1,936)

(2) アンチゲネミア法の陽性細胞数に対する本品の CMV DNA 量の分布状況

全検体のうち本品の定量値を有する 538 検体を対象として、アンチゲネミア法の陽性細胞数に対する本品の CMV DNA 量の分布範囲及びその中央値を算出しました。その結果、アンチゲネミア法の陽性細胞数の増加に伴い、本品の中央値も 74.4、159、320、1,005、7,200 IU/mL と上昇する傾向が認められました。



本品による CMV DNA 量(IU/mL)

中央値	74.4	159	320	1,005	7,200
第 1 四分位値	47.7	73.9	144	434	2,198
第 3 四分位値	144	417	1,195	2,210	34,775
検体数	196	118	85	74	65

**(3) アンチゲネミア法のカットオフ値に相当する本品の定量値

実臨床での CMV 感染管理は、アンチゲネミア法の陽性細胞数が参照されています。画一的なカットオフ値は定められていないものの、患者の臨床背景や状態に基づき、各施設での設定が行われています。そこで、国内で用いられているアンチゲネミア法の主なカットオフ値(陽性細胞数:1、2、4、10 個)に相当する本品の定量値を、臨床運用上の参考情報として算出しました。なお、本解析は全検体(1,936 検体)、臓器移植患者検体(1,754 検体)及び HSCT 患者検体(182 検体)を対象に、それぞれ実施しました。その結果、全症例では、アンチゲネミア法の陽性細胞数に相当する本品の定量値は、陽性細胞 1 個の場合は 35.6 IU/mL(感度 87%、特異度 88%)、2 個の場合は 86.6 IU/mL(感度 95%、特異度 90%)、4 個の場合は 182 IU/mL(感度 94%、特異度 92%)、10 個の場合は 492 IU/mL(感度 100%、特異度 93%)でした。臓器移植患者検体では、アンチゲネミア法の陽性細胞数に相当する本品の定量値は、陽性細胞 1 個の場合は 35.6 IU/mL(感度 88%、特異度 88%)、2 個の場合は 86.6 IU/mL(感度 95%、特異度 90%)、4 個の場合は 182 IU/mL(感度 95%、特異度 92%)、10 個の場合は 492 IU/mL(感度 100%、特異度 93%)でした。

また、HSCT 患者検体では、アンチゲネミア法の陽性細胞数に相当する本品の定量値は、陽性細胞 1 個の場合は 52.2 IU/mL(感度 82%、特異度 87%)、2 個の場合は 84.3 IU/mL(感度 89%、特異度 88%)、4 個の場合は 95.4 IU/mL(感度 100%、特異度 85%)でした(10 個以上の陽性細胞を示す検体数が少なく 10 個の場合を算出することはできませんでした)。上記結果は参考値ではあるものの、アンチゲネミア法の陽性細胞数に相当する本品の測定値は、陽性細胞数 1 個は定量下限値(34.5 IU/mL)付近、2 個は 90 IU/mL 付近、4 個は 100〜200 IU/mL、10 個は 500 IU/mL 付近になると考えられました。

		アンチゲネミア法のカットオフ値			
		1 個	2 個	4 個	10 個
全検体 (n=1,936)	参考カットオフ(IU/mL)	35.6	**86.6	182	492
	感度	87%	95%	94%	100%
	特異度	88%	90%	92%	93%
臓器移植患者検体 (n=1,754)	参考カットオフ(IU/mL)	35.6	86.6	182	492
	感度	88%	95%	95%	100%
	特異度	88%	90%	92%	93%
HSCT 患者検体 (n=182)	参考カットオフ(IU/mL)	52.2	84.3	95.4	−
	感度	82%	89%	100%	−
	特異度	87%	88%	85%	−

3. 較正用基準物質

NIBSC WHO Int. std. HCMV

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意

(1) 検体及び本キットの取扱いには、使い捨て手袋、実験着などの保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。また、測定終了後はよく手を洗ってください。

(2) ピペットは口で吸わないでください。

(3) 試薬が誤って目や口に入った場合には、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。

(4) 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。

(5) 試薬をこぼした場合には水で希釈してから拭き取ってください。

(6) 検体又はヒト血液由来成分を含むコバス 6800/8800 システム CMV コントロールキット及びコバス 6800/8800 システム NHP 陰性コントロールキットをこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。

(7) 検体及び本キットを取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。

(8) 検体又はヒト血液由来成分を含むコバス 6800/8800 システム CMV コントロールキット及びコバス 6800/8800 システム NHP 陰性コントロールキットは感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。

(9) 検体又はヒト血液由来成分を含むコバス 6800/8800 システム CMV コントロールキット及びコバス 6800/8800 システム NHP 陰性コントロールキットを取り扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分間以上加熱滅菌処理をするか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に 1 時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中はじゅうぶんに換気を行ってください。

2. 使用上の注意

(1) プライマー及びプローブは、測定するウイルスの遺伝子の中でも保存性が高く変異が少ない遺伝子領域を反応のターゲットとしておりますが、稀に起こる遺伝子の変異や欠損/挿入などにより、反応性が低下し正確に測定できない場合や検出できない場合があります。

(2) ウイルス DNA の測定・検出の結果は、検体採取の方法や感染の進行度などの患者因子の影響を受ける場合があります。

(3) 従来の測定方法から新しい測定方法に変更する場合は、変更前後の測定方法の相関性などを確認のうえご利用ください。

(4) 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。

(5) 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結させるなど指定の条件以外で保存したものや使用期限を過ぎたものは使用しないでください。

(6) ロットの異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないでください。

(7) コバス OMNI 検体希釈液とコバス OMNI ライシス試薬は、室温に戻してから装置にセットしてください。

(8) 使用開始後の試薬は微生物の汚染にご注意ください。

(9) 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃

などを徹底して行ってください。

(10) 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる RNase 又は DNase が少量でも検体に混入しますと、RNA や DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。

(11) プロテアーゼ試液、DNA 定量標準試液、溶出試液、マスターミックス 1 及びマスターミックス 2 について、一度使用した試薬は、2～8℃で 90 日又は使用期限のうち、短い日付まで安定です。これらの試薬は、コバス 5800 システムでは測定合計回数 40 回又は機器上で合計 36 日間まで使用が可能です。コバス 6800 システム又はコバス 8800 システムでは測定合計回数 40 回又は機器上で合計 40 時間まで使用が可能です。

3. **廃棄上の注意**

(1) 測定により生じた廃液については、検体などと同様に滅菌又は消毒の処理を行ってください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。

(2) 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。

(3) 廃棄する際は、水質汚濁法等の規制に留意して処理してください。

(4) 検体及び試薬をこぼした場合は、次亜塩素剤(有効塩素濃度 5,000ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶん拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。

(5) コバス OMNI ライシス試薬、及び装置から出た廃液はグアニジンチオシアン酸塩を含みます。グアニジンチオシアン酸塩は次亜塩素酸剤と反応して有毒ガスを発生することがありますので、次亜塩素酸剤と接触させないでください。

(6) DNA 定量標準試液、マスターミックス 1、マスターミックス 2、コバス OMNI MGP 試薬及びコバス OMNI 検体希釈液は 0.1%未満のアジ化ナトリウムを含みます。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性のある金属アジドを生成することがあるため、廃棄の際には多量の水で洗い流してください。

(7) 使用済みコバス OMNI P プレート 24 及びコバス OMNI P プレート、ピペットチップはグアニジンチオシアン酸塩を含みます。グアニジンチオシアン酸塩は次亜塩素酸剤と反応して有毒ガスを発生することがありますので、次亜塩素酸剤と接触させないでください。

4. **その他の注意**

本品による測定値は既存製品と高い相関性を示しますが、系統的な誤差を生じる場合がありますので、必要に応じて相関性について検討されることをお勧めします。

【貯蔵方法・有効期間】

1. **貯蔵方法**

2～8℃

2. **有効期間**

*20 ヵ月

使用期限(Exp.)は外箱に記載してあります。

【包装単位】

コバス 6800/8800 システム CMV 増幅・検出用試薬セット 192

192 テスト

1. プロテアーゼ試液	〔PASE〕	1×22.3 mL
2. DNA 定量標準試液	〔DNA-QS〕	1×21.2 mL
3. 溶出試液	〔EB〕	1×21.2 mL
4. マスターミックス 1	〔MMX-R1〕	1×7.5 mL
5. マスターミックス 2	〔CMV MMX-R2〕	1×9.7 mL

【主要文献】

1) Higuchi, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (N Y). 1992, 10, p.413～417.

2) Heid, C.A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Research. 1996, 6, p.986～994.

3) Longo, M.C. et al. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990, 93, p.125～128.

【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
カスタマーソリューションセンター
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所等】

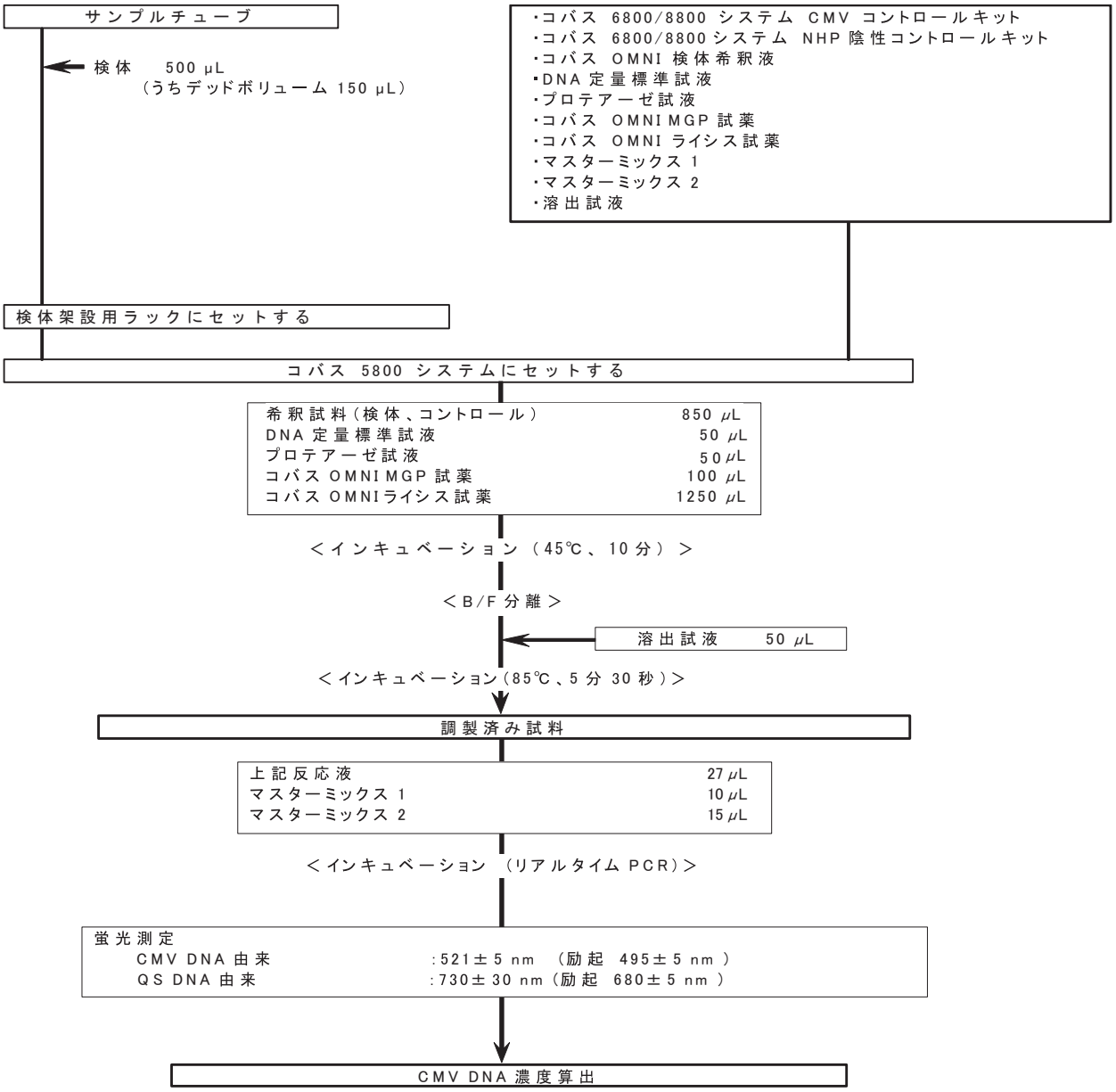
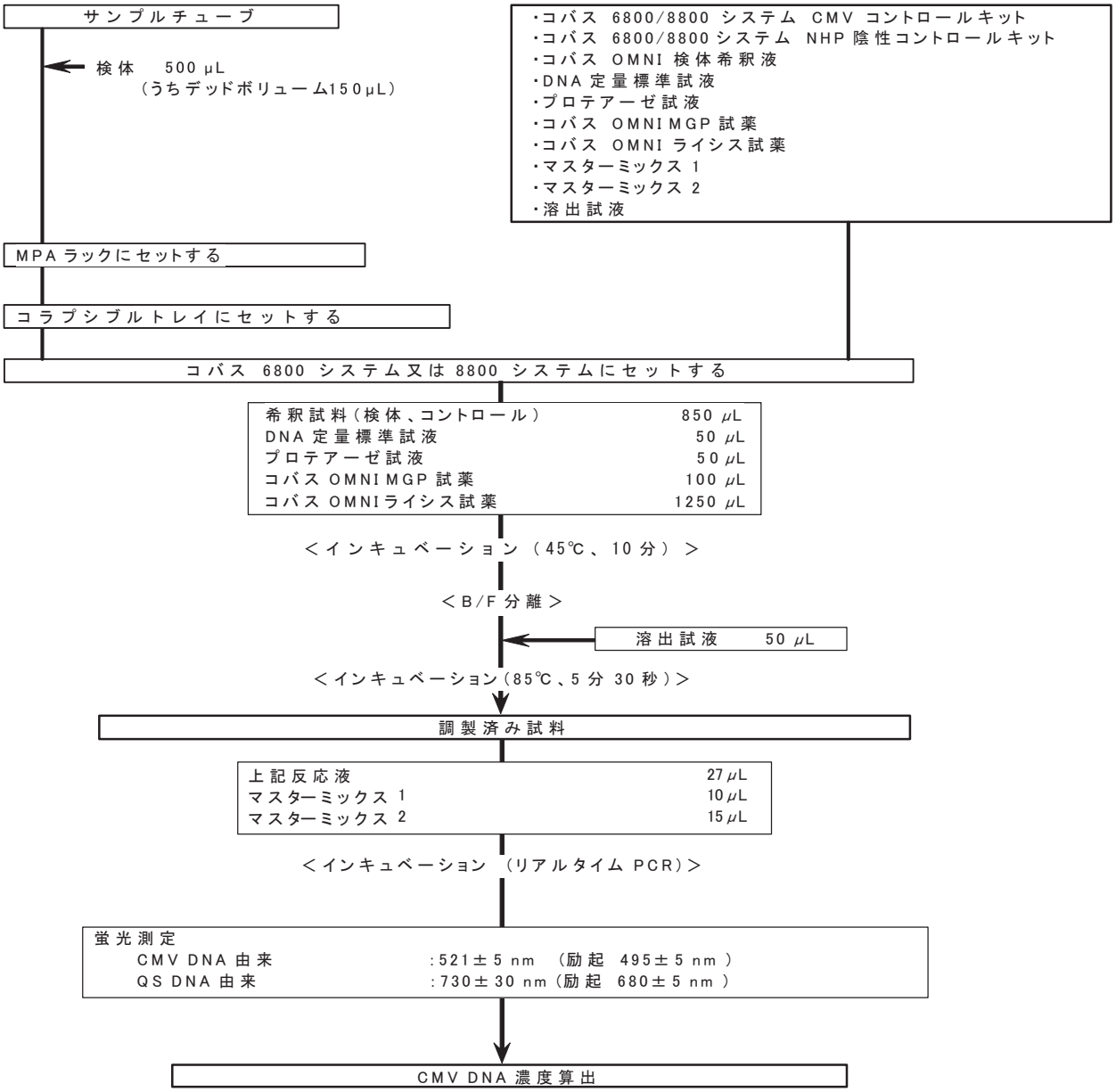
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

《特許に関連するお知らせ》

本製品をご購入頂きましたお客様は、これら製品をヒトの体外診断目的における PCR による核酸配列の増幅と検出、及びその関連工程に使用することが許諾されています。この特定された使用許諾権以外には、いかなる種類の特許権又はライセンスも許諾されているものではありません。

コバスは Roche の登録商標です。
その他の全ての製品名及び商標は、各所有者に帰属します。

**《コバス 5800 操作概略》



**《コバス 6800/8800 操作概略》