

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

**2025年 9月改訂(第5版)

*2023年 8月改訂(第4版)

製造販売承認番号:30300EZ00078000

結核菌群リファンピシン耐性遺伝子同定キット

結核菌群イソニアジド耐性遺伝子同定キット

コバス MTB-RIF/INH

【重要な基本的注意】

1. *M. tuberculosis* と同じく結核菌群に属する *M. bovis* BCG、*M. bovis* subsp. *bovis*、*M. africanum*、*M. microti*、*M. canetti*、*M. caprae*、*M. orygis* 及び *M. pinnipedii* の遺伝子変異配列は、本品の検出領域では *M. tuberculosis* と完全に一致します。そのため、本品ではこれらの菌種を原理上区別することはできません。
2. 本品は結核菌リファンピシン(RFP)耐性遺伝子として *rpoB* 遺伝子を検出します。RFP 耐性結核菌の約 95%は本品で検出する *rpoB* 遺伝子領域中に変異を持つ¹⁾とされていますが、残りの約 5%はこの領域中に変異がないため、本品では野生型と判定されます。
3. 本品は結核菌群 *inhA* 遺伝子及び *katG* 遺伝子を検出します。現行の培養法による感受性検査において検出されるイソニアジド(INH)耐性結核菌の約 80%は本品で検出する *inhA* 遺伝子及び *katG* 遺伝子領域中に変異を持つ²⁾とされています。それ以外の変異については、本品では野生型と判定されます。

【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. 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。
6. 本品は *rpoB* 遺伝子変異、*inhA* 遺伝子変異及び *katG* 遺伝子変異を検出対象としたキットです。

【形状・構造等(キットの構成)】

コバス MTB-RIF/INH 192テスト用 1カセット

1. プロテアーゼ試液 [PASE]
2. 検体希釈液 [GSD]
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 [MTB-RIF/INH MMX-R2]
 - INH プライマー 1
 - INH プライマー 2
 - INH プライマー 3
 - INH プライマー 4
 - RIF プライマー 1
 - RIF プライマー 2
 - INH 用蛍光標識 DNA プローブ 1

INH 用蛍光標識 DNA プローブ 2
 INH 用蛍光標識 DNA プローブ 3
 INH 用蛍光標識 DNA プローブ 4
 INH 用蛍光標識 DNA プローブ 5
 INH 用蛍光標識 DNA プローブ 6
 INH 用蛍光標識 DNA プローブ 7
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 1
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 2
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 3
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 4
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 5
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 6
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 7
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 8
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 9
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 10
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 11
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 12
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 13
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 14
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 15
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 16
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 17
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 18
 RIF 用蛍光標識 DNA プローブ 19
 2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
 2'-デオキシチジン-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 DNA ポリメラーゼ

【使用目的】

喀痰中の結核菌群 *rpoB* 遺伝子、*inhA* 遺伝子及び *katG* 遺伝子中の変異の検出(リファンピシン耐性結核菌感染又はイソニアジド耐性結核菌感染の診断補助)

【測定原理】

- **1. 本品の測定は以下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」、「コバス 8800 システム」、「コバス 6800 システム plus」又は「コバス 8800 システム plus」が自動で行います。

(1) 試料の調製

**所定の方法で前処理した検体又はコントロールに、検体希釈液、プロテアーゼ試液、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。これにより菌が溶解し、試料中の核酸は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、溶解した菌のたん白などの不要な成分は洗浄により除去されます(B/F 分離)。洗浄液で磁性粒子を洗浄後、これに溶出試液を加えて核酸を遊離させ試料とし、マスターミックス 1 とマスターミックス 2 を加えて増幅及び測定を行います。

(2) 増幅及び測定

リアルタイム PCR(Polymerase Chain Reaction)法^{3),4)}を応用し、引き続き、自動で行います。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)で標識した結核菌群 RIF 耐性 DNA(以下、RIF DNA)用、結核菌群 INH 耐性 DNA(以下、INH DNA)用及び結核菌群 DNA 中で高い保存性を有する領域(内部コントロールとして使用。以下、MTBc DNA)用プローブを用います。このプローブの蛍光色素は、レポーターと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-

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。
はじめに2本鎖DNAを高温で1本鎖に変性させます。温度を下げるとRIF DNA用、INH DNA用及びMTBc DNA用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'末端側に結合し、Mn²⁺及びデオキシヌクレオシド三リン酸(dNTP)存在下、耐熱性Z05 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RIF DNA用、INH DNA用及びMTBc DNA用プローブはZ05 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。この蛍光強度をRIF DNA用蛍光色素、INH DNA用蛍光色素及びMTBc DNA用蛍光色素それぞれに固有の異なる波長で同時に測定します。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 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」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反応液中のRIF DNA、INH DNA及びMTBc DNAの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。RIF DNA及びINH DNAのCt値が得られた場合を陽性、得られなかった場合を陰性と判定します。

2. キャリーオーバーコンタミネーションの防止

**本品では、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⁵⁾。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

本品の測定試料には、喀痰を用いてください。
なお、溶血により血液成分が多量に混在する検体では、反応が阻害され偽陰性となることがありますので注意してください。

2. 検体の前処理方法

検体は未処理の喀痰(以下、生喀痰)又は米国のCDCが推奨しているNALC-NaOH法で処理を行うことをお勧めします。NALC-NaOH法で処理した後は、次のステップに移る前に軽く遠心処理を行うことをお勧めします。

次に、別売のマイクロバイアル インアクチベーション ソリューション(Microbial Inactivation Solution、以下、MIS)を用いて以下の方法により不活化を行います。

- (1) 凍結保存した検体の場合は、融解し室温に戻します。
- (2) 検体が生喀痰の場合0.4 mL以上、NALC処理済み検体の場合0.2 mL以上容器に入っていることを確認します。MISボトルを2~4回転倒混和します。検体とMISを1:2の割合(生喀痰)又は1:5の割合(NALC-NaOH処理済み検体)で量り取り、加えます。
- (3) 激しく振とうするか、試験管ミキサーで30~60秒振とうさせ、その後15~30℃で少なくとも60分間インキュベートします。
- (4) 再度、激しく振とうするか、試験管ミキサーで30~60秒振とうさせ完全にホモジナイズさせます。
- (5) 軽くスピンドダウン後開栓し、1.2~3.6 mLを耐熱性バーコー

ドラベルが貼付された指定の5 mLポリプロピレンチューブに移し変え、キャップをしっかりと閉じます。

- (6) 指定のチューブソニケーターを使用し、超音波処理をします。MPAラックにチューブをセットし、所定のプロファイルにて処理を実施します。チューブソニケーターの使用方法は製造元の取扱説明書に従ってください。

3. 検体の保存安定性

MIS処理前の検体の保存安定性は以下のとおりです。

＜生喀痰＞

**・2~35℃で最長3日間保存後、2~8℃で7日間

＜NALC-NaOH処理済み検体＞

**・2~8℃で7日間

**・-20℃以下で9ヵ月間(凍結融解は2回まで)

MIS処理後の検体の保存安定性は以下のとおりです。

＜生喀痰及びNALC-NaOH処理済み検体＞

**・15~35℃で最長12時間保存後、更に2~8℃で最長7日間保存後、-20℃以下で30日間(凍結融解は2回まで)

4. 妨害物質・妨害薬剤

- (1) 内因性妨害物質による検討結果

採取した検体に含まれる可能性のある7種の物質について検討した結果、下表の濃度までは本品の結果への影響は認められませんでした。

物質	濃度	物質	濃度
胃液	10% (v/v)	ムチン	5% (w/v)
ヘモグロビン	2 g/L	膿	5% (v/v)
全血	5% (v/v)	唾液	10% (v/v)
ヒトDNA	4 mg/L		

- (2) 外因性妨害物質による検討結果

本品の測定結果に影響を与える可能性のある48種の成分について検討した結果、下表の濃度までは本品の結果への影響は認められませんでした。

	成分	濃度	成分	濃度
**	サルブタモール	0.5 μg/mL	カナマイシン-硫酸塩	240 μg/mL
	アミカシン	80.1 μg/mL	レボフロキサシン	5 mg/mL
**	アモキシシリン	86.4 μg/mL	リドカイン塩酸塩	1.2% (w/v)
	ベクロメタゾン	3.5 ng/mL	メントール	0.50% (w/v)
	ベンゾカイン	1.2% (w/v)	サリチル酸メチル	0.06% (v/v)
	ブデソニド	3 mg/mL	モメタゾン	100 μg/mL
	Butterbur extract	2.5 mg/mL	モキシフロキサシン	15 μg/mL
	カプレオマイシン	80 μg/mL	ムピロシン	0.05% (w/v)
	塩化セチルビリジニウム	0.5% (w/v)	塩化ナトリウム	5% (w/v)
**	クロヘキシジノグルコ酸塩	1% (v/v)	ニコチン	1 μg/mL
	シクロセリン(サイクロセリン)	105 μg/mL	ナイスタチン	1% (v/v)
	クラリスロマイシン	20 μg/mL	オキシメタゾリン	12 ng/mL
	デキサメタゾン	601 ng/mL	ペンタミジン	* 1.4 μg/mL
**	エフェドリン塩酸塩	1 mg/mL	フェニレフリン	5 mg/mL
**	エビネフリン or アドレナリン	100 pg/mL	ブレドニゾロン	3 μg/mL
	エタンプトール	50 μg/mL	ピラジナミド	240 μg/mL
**	エチオナミド or ツベルミン	15 μg/mL	リファンピシン	25 μg/mL
	ユーカリプトール	0.002% (v/v)	Stinging Nettle Extract (500 mg)	5 mg/mL
	フルニソリド	400 μg/mL	ストレプトマイシン	240 μg/mL
	フルチナノプロピオン酸エステル	5 μg/mL	硫黄	0.01% (w/v)
**	ホルモテロール fumarate水和物	66 μg/mL	Tea Tree Oil	0.50% (v/v)
**	ゴールデンシール (カプセル剤 570mg)	5.7 mg/mL	デオフィリン	20 μg/mL
	グアイフェネシン	2.5 mg/mL	トブラマイシン	24.1 μg/mL
	イソニアジド	50 μg/mL	ザナミビル	0.1 mg/mL

5. 反応特異性

結核菌群に属する9種類の菌種(10株)を本品で測定したところ、結核菌群 DNA 陽性と判定されました(最小検出感度の3倍の濃度で検出)。

- *M. tuberculosis* (H37 ATCC® 25177™)
- *M. bovis* BCG (substrain Tokyo 172 NIBSC 07/272 WHO 及び substrain Moscow NIBSC 07/274 WHO)
- *M. africanum* (ATCC® 25420™)
- *M. bovis* subsp. *bovis* (ATCC® 19210™)
- *M. canettii* (NLA 000016778)
- *M. caprae* (ATCC® BAA-824™)
- *M. microti* (ATCC® 19422™)
- *M. orygis* (NLA 001300863)
- *M. pinnipedii* (ATCC® BAA-688™)

リファンピシン耐性に関与する *rpoB* 遺伝子変異、イソニアジド耐性に関与する *katG* 遺伝子変異及び *inhA* 遺伝子変異に対する本品の反応特異性を検討したところ、以下の変異を有する耐性結核菌 DNA は陽性と判定されました。

- *・*rpoB* 遺伝子変異：L511P、Q513K、Q513L、Q513P、D516G、D516V、D516Y、S522L、S522Q、S522W、H526D、H526L、H526N、H526R、H526Y、S531L、S531W、L533P
- *katG* 遺伝子変異：S315I、S315N、S315T、S315T2
- *inhA* 遺伝子変異：T-8A、T-8C、C-15T

6. 交差反応性

145種の微生物のうち129種類については、細菌・真菌は約1.0E+06 各単位/mL、ウイルスは約1.0E+05 各単位/mLまで、本品との交差反応性は確認されませんでした。また、*Mycobacterium asiaticum*、*Mycobacterium fuerth*、*Mycobacterium intermedium*、*Mycobacterium marseillense*、*Mycobacterium peregrinum*、*Mycobacterium szulgai*、*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*、*Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*、*Mycobacterium colombiense*、*Mycobacterium gastri*、*Mycobacterium lentiflavum*、*Mycobacterium marinum* は約1.0E+05 CFU/mLまで、*Mycobacterium chubuense*、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*、*Mycobacterium bouchardurhonense*、*Mycobacterium vulneris* は約1.0E+04 CFU/mLまで、本品との交差反応性は確認されませんでした。

Histoplasma capsulatum、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium mantenii* 及び *Mycobacterium timonense* は in-silico 解析によるシミュレーションを実施し、本品の検出結果への潜在的な交差反応の可能性は低いと考えられました。

7. コンタミネーションに関して

本品ではマスターミックス2にウラシル N-グリコシラーゼ(UNG)が添加されており、また Z05 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⁵⁾。したがって、本品にて増幅されたDNAのキャリア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、本品の測定にあたっては、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^{6),7),8),9)}。
専用のピペットチップなどを用意し、ほかのエリア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

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) 本品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、紫外線照射を十分に行ってください。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、陰性サンプル及び陽性サンプルを市松模様状に配置した判定を複数回実施したところ、この検討では0.0% (0/240)でした。

8. 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陰性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、コバス 8800 システム、コバス 6800 システム plus 及びコバス 8800 システム plus 共通**

- (1) コバス MTB-RIF/INH コントロールキット^{*1}
- (2) コバス 6800/8800 システム バッファ陰性コントロールキット^{*1}
- (3) マイクロバイアル インアクチベーション ソリューション^{*1 *2}
- (4) ソニケーター TS5 (Rinco Ultrasonics 社製 (P/N46690))^{*1}
- (5) コバス OMNI 廃液タンク^{*2}
- (6) コバス OMNI ライシス試薬^{*1}
- (7) コバス OMNI MGP 試薬^{*1}
- (8) コバス OMNI 洗浄試薬^{*1}
- (9) コバス OMNI 検体希釈液^{*1}
- (10) ポリプロピレン 5 mL スクリューキャップチューブ 75 × 13 mm (Sarstedt 社製 (P/N 60.504.010))
- (11) ポリプロピレン 5 mL スクリューキャップチューブ 75 × 13 mm 用キャップ (Sarstedt 社製 (P/N 65.163))
- (12) 耐熱性バーコードラベル
- (13) 安全キャビネット(陰圧)
- (14) ゴム手袋(パウダーフリー)
- (15) 試験管ミキサー
- (16) マイクロピペット(1,000 µL)及びチップ
(チップは疎水性フィルター付きで、1,000 µL 用)

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) CORE チップ 300 µL^{*2}
- (5) CORE チップ 1000 µL^{*2}
- (6) コバス OMNI バイオハザードバック又はコバス OMNI バイオハザードバックインサート付き^{*2}
- (7) コバス 5800 システム
- (8) 検体架設用ラック(用途に応じてコバス 5800 システム 5 連ポジションラックキャリア又はコバス 5800 システム 16 ポジションチューブキャリアを用いる)

****コバス 6800 システム、コバス 8800 システム、コバス 6800 システム plus 及びコバス 8800 システム plus 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ク インサート付き※2
- (5) コバス 6800 システム、コバス 8800 システム、コバス 6800 システム plus 又はコバス 8800 システム plus
- (6) 検体架設用ラック(MPA ラック)※2
- (7) コラブシブルトレイ

※1 別売品の試薬を使用してください。

※2 別売品の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(1,000 μ L)及び(チップは疎水性フィルター付きで、1,000 μ L 用)
- (3) ゴム手袋(パウダーフリー)

3. 操作方法

本品の測定には、前処理した検体が、1 測定あたり 1,200 μ L (デッドボリューム 350 μ L を含む)が必要です。また本品による測定に際し外部コントロールとして、コバス MTB-RIF/INH コントロールキット及びコバス 6800/8800 システム バッファ陰性コントロールキットを測定し、精度管理を実施します。

****コバス 5800 システム、コバス 6800 システム、コバス 8800 システム、コバス 6800 システム plus 及びコバス 8800 システム plus の操作方法**

****各機器の取扱説明書を参照ください。**

操作の概略は最終頁の図を参照してください。

【測定結果の判定法】

1. 測定結果の判定及び精度管理

****「コバス 5800 システム」、「コバス 6800 システム」、「コバス 8800 システム」、「コバス 6800 システム plus」及び「コバス 8800 システム plus」では検体及び外部コントロールの測定結果判定を自動で行います。各コントロールが正しく測定され各検体が判定可能な場合は、測定結果は次のように表示されます。なお、測定結果が判定不能の場合は測定画面又は印字用紙に“Invalid”の結果とともにフラグが表示されるので、各機器の取扱説明書を参照してください。**

コントロールの測定結果

コントロールの種類	表示
コバス MTB-RIF/INH コントロールキット	Valid
コバス 6800/8800 システム バッファ陰性コントロールキット	Valid

検体の測定結果

Target 1 INH	Target 2 RIF1	Target 3 RIF2	Target 4 RIF3	解釈
Negative	Negative	Negative	Negative	INH 陰性 RIF 陰性
Negative	いずれか一つ以上が Positive			INH 陰性 RIF 陽性
Positive	Negative	Negative	Negative	INH 陽性 RIF 陰性
Positive	いずれか一つ以上が Positive			INH 陽性 RIF 陽性
Positive	Invalid	Invalid	Invalid	INH 陽性 RIF 判定不能
Invalid	いずれか一つ以上が Positive			INH 判定不能 RIF 陽性
Invalid	Invalid	Invalid	Invalid	INH 判定不能 RIF 判定不能

2. 結果の判定にかかる注意

- (1) 以下の検体を測定した場合、偽陰性又は有効な結果が得られない場合がありますので注意してください。

- 1) 血液が大量に混入している検体
- 2) 唾液が多く喀痰成分が少ない検体
- 3) 塗抹陰性、もしくは弱陽性で菌量の少ない検体
- 4) 不適当な検体前処理により、DNA 抽出が不十分な場合

上記のような検体の場合は、血液の混入がなく、喀痰成分が多い検体を採取し、再度測定を行ってください。DNA 抽出操作及び集菌操作が不適切であると判断された場合は、再度検体の処理をしてから測定してください。

**** (2) *Mycobacterium tuberculosis* (以下、MTB) 感染後、ある程度以上の MTB DNA 濃度となるまで検出することができない場合があります。**

- (3) 本品のプライマーやプローブの塩基配列と試料中の MTB 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検出できない可能性もありますので、判定にはじゅうぶん注意してください。
- (4) (1)～(3)以外の原因でも偽陰性となる可能性があり、本品で陰性と判定されても必ずしも薬剤耐性結核菌群の存在を否定するものではありません。
- (5) 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。

【性能】

1. 性能

【用法・用量(操作方法)】の記載に従い以下の試験を行った場合、下記の規格値に適合します。

- (1) 「管理用試料 1」を 8 回同時に測定するとき、すべて有効測定値となり、その Ct 値は以下の範囲内にある。
INH DNA(Target 1)の Ct 値:33.7～41.3
RIF DNA(Target 2)の Ct 値:34.7～41.8
RIF DNA(Target 3)の Ct 値:34.6～44.5
RIF DNA(Target 4)の Ct 値:34.8～41.8
MTBc DNA(Target 5)の Ct 値:36.0～44.7

ただし、有効測定値の 1 つが上記範囲外であった場合は、更に「管理用試料 1」を 16 回同時に測定し、すべて有効測定値となり、初回の有効測定結果と合わせた 24 回の有効測定値のうち 23 回が、以下の範囲内にあることを確認する。

- INH DNA(Target 1)の Ct 値:33.7～41.3
RIF DNA(Target 2)の Ct 値:34.7～41.8
RIF DNA(Target 3)の Ct 値:34.6～44.5
RIF DNA(Target 4)の Ct 値:34.8～41.8
MTBc DNA(Target 5)の Ct 値:36.0～44.7

- (2) 「管理用試料 2」を 8 回同時に測定するとき、すべて有効測定値となり、その Ct 値は以下の範囲内にある。

- NH DNA(Target 1)の Ct 値:Ct 値は得られない
RIF DNA(Target 2)の Ct 値:Ct 値は得られない
RIF DNA(Target 3)の Ct 値:Ct 値は得られない
RIF DNA(Target 4)の Ct 値:Ct 値は得られない
MTBc DNA(Target 5)の Ct 値:Ct 値は得られない

ただし、有効測定値の 1 つが上記範囲外であった場合は、更に「管理用試料 2」を 16 回同時に測定し、すべて有効測定値となり、初回の有効測定結果と合わせた 24 回の有効測定値のうち 23 回が、以下の範囲内にあることを確認する。

- INH DNA(Target 1)の Ct 値:Ct 値は得られない
RIF DNA(Target 2)の Ct 値:Ct 値は得られない
RIF DNA(Target 3)の Ct 値:Ct 値は得られない
RIF DNA(Target 4)の Ct 値:Ct 値は得られない
MTBc DNA(Target 5)の Ct 値:Ct 値は得られない

管理用物質

「管理用試料 1」は、以下の成分を含む液である。

INH DNA 塩基配列含有プラスミド 約 148 コピー/mL

RIF DNA 塩基配列含有プラスミド 約 155 コピー/mL

MTBc DNA 塩基配列含有プラスミド 約 130 コピー/mL

「管理用試料 2」は、緩衝剤等を含む液である。

2. 最小検出感度

NALC-NaOH 処理済み検体を使用した際の、N1448 株(RIF 耐性に関与する *rpoB* 遺伝子の S531L 変異及び INH 耐性に関与する *katG* 遺伝子の S315T 変異を有する *M. tuberculosis*)に対する本品の最小検出感度は、以下のとおりでした。

INH DNA に対する最小検出感度:12.6 CFU/mL

RIF DNA に対する最小検出感度:94.0 CFU/mL

MTBc DNA に対する最小検出感度:42.2 CFU/mL

3. 臨床性能試験成績

本品は、臨床検体による海外臨床性能試験および国内分離株を用いた国内臨床性能試験によって、臨床的有用性が示されています。

＜海外臨床性能試験＞

本品が測定対象とする NALC-NaOH 処理済みの臨床検体 RIF 耐性 243 症例、INH 耐性 244 症例を用いて、本品の薬剤感受性試験に対する臨床的感度および特異度を検討した結果、RIF の臨床的感度は 100%、臨床的特異度は 99.5%、INH の臨床的感度は 94.6%、臨床的特異度は 99.5%であり、臨床的有用性が示されました。

	RIF	INH
感度	100% (23/23)	94.6% (35/37)
特異度	99.5% (220/221)	99.5% (206/207)

＜国内臨床性能試験＞

日本国内で分離された RIF/INH 両耐性菌株、RIF 単独耐性菌株及び INH 単独耐性菌株を、結核菌群陰性喀痰のプールにスパイクして作製した検体を用いて、国内における薬剤耐性結核菌に対する本品の検出率を確認した。その結果、RIF 耐性菌株 91.8%、INH 耐性菌株 77.8%の検出率が得られました。

		薬剤感受性試験	
		耐性	感受性
本品	陽性	67	3
	陰性	6	43

RIF 感度(%) :91.8% (67/73)

RIF 特異度(%) :93.5% (43/46)

全体一致率(%) :92.4% (110/119)

		薬剤感受性試験	
		耐性	感受性
本品	陽性	77	2
	陰性	22	18

INH 感度(%) :77.8% (77/99)

INH 特異度(%) :90.0% (18/20)

全体一致率(%) :79.8% (95/119)

【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) 検体及び本品の取扱いには、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) MIS 処理前の検体をこぼした場合は、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) MIS を含む検体をこぼした場合は、次亜塩素酸ナトリウム又は次亜塩素酸カリウムと接触させないようにしてください。MIS はグアニジンチオシアン酸塩を含み、次亜塩素酸ナトリウムや次亜塩素酸カリウムと接触させると毒性の高いガスを発生する可能性があります。MIS を含む検体がこぼれた場合、まず検査室用の適切な洗剤と水等で洗浄し、次に 70% エタノールで洗浄してください。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。

- (8) 検体及び本品を取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。
- (9) 検体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。
- (10) 検体を取り扱う際に使用した器具類は医療廃棄物として廃棄するか高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分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。
- (11) 検体を取り扱う際に使用する機器等の故障による不適正な検体分注、前処理にご注意ください。正しい結果が得られない場合があります。検査に使用する機器・備品類の定期的な点検を行ってください。

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いますが、まれ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) 細菌の 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利用してください。
- **(4) 本品の検査の有効性は、本品で使用されることを意図した弊社の試薬、消耗品及び別売品にて検証されています。また、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) コパス OMNI 検体希釈液及びコパス OMNI ライス試薬は、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) 本品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) 本品の構成試薬について、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、「コパス 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。「コパス 6800 システム」、「コパス 8800 システム」、「コパス 6800 シ

システム plus」又は「コバス 8800 システム plus」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。

**(12) プロテアーゼ試液にはアレルギー反応を起こすおそれがあるサチライシンが含まれていますので、取扱いはじゅうぶんに注意してください。

**(13) プロテアーゼ試液には 1%未満のホウ酸が含まれています。ホウ酸は皮膚腐食性及び皮膚刺激性があります。また、目に対する重篤な損傷又は刺激を与えるおそれがありますので、必要に応じて保護衣や保護眼鏡を用いてください。誤って皮膚に付着したり、目に入ったりした場合には、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。

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) コバス OMNI ライシス試薬、マイクロバイアルインアクチベーションソリューション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。

**(5) 検体希釈液、マスターミックス 1、マスターミックス 2、コバス MTB-RIF/INH コントロールキット、コバス 6800/8800 パッファ陰性コントロールキット、コバス OMNI MGP 試薬及びコバス OMNI 検体希釈液は保存剤として 0.1%以下のアジ化ナトリウムを、コバス含みます。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。

**(6) 使用済みコバス OMNI プレート 24、コバス OMNI プレート及び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。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

2～8℃で凍結を避けて保存してください。

2. 有効期間

24 ヶ月

使用期限(Exp.)は外箱に記載してあります。

【包装単位】

コバス MTB-RIF/INH 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. 検体希釈液	[GSD]	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	[MTB-RIF/INH MMX-R2]	1×9.7 mL

【主要文献】

- 1) 御手洗聡,「医学検査のあゆみ-21」結核菌群遺伝子の臨床検査の進歩, モダンメディア 59(7), 194-199, 2013
- 2) Marva Seifert, Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Systematic Review, PLOS ONE, March 23, 2015
- 3) Higuchi R, Dollinger, G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.

Biotechnology (NY). 1992;10:413-7.

- 4) Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Research. 1996;6:986-94.
- 5) Longo MC, Berninger, MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene. 1990;93:125-8.
- 6) Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory: Atlanta, GA; U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 1985.
- 7) Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline—Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
- 9) World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual. Geneva, Switzerland; WHO, 2012.

【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
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】

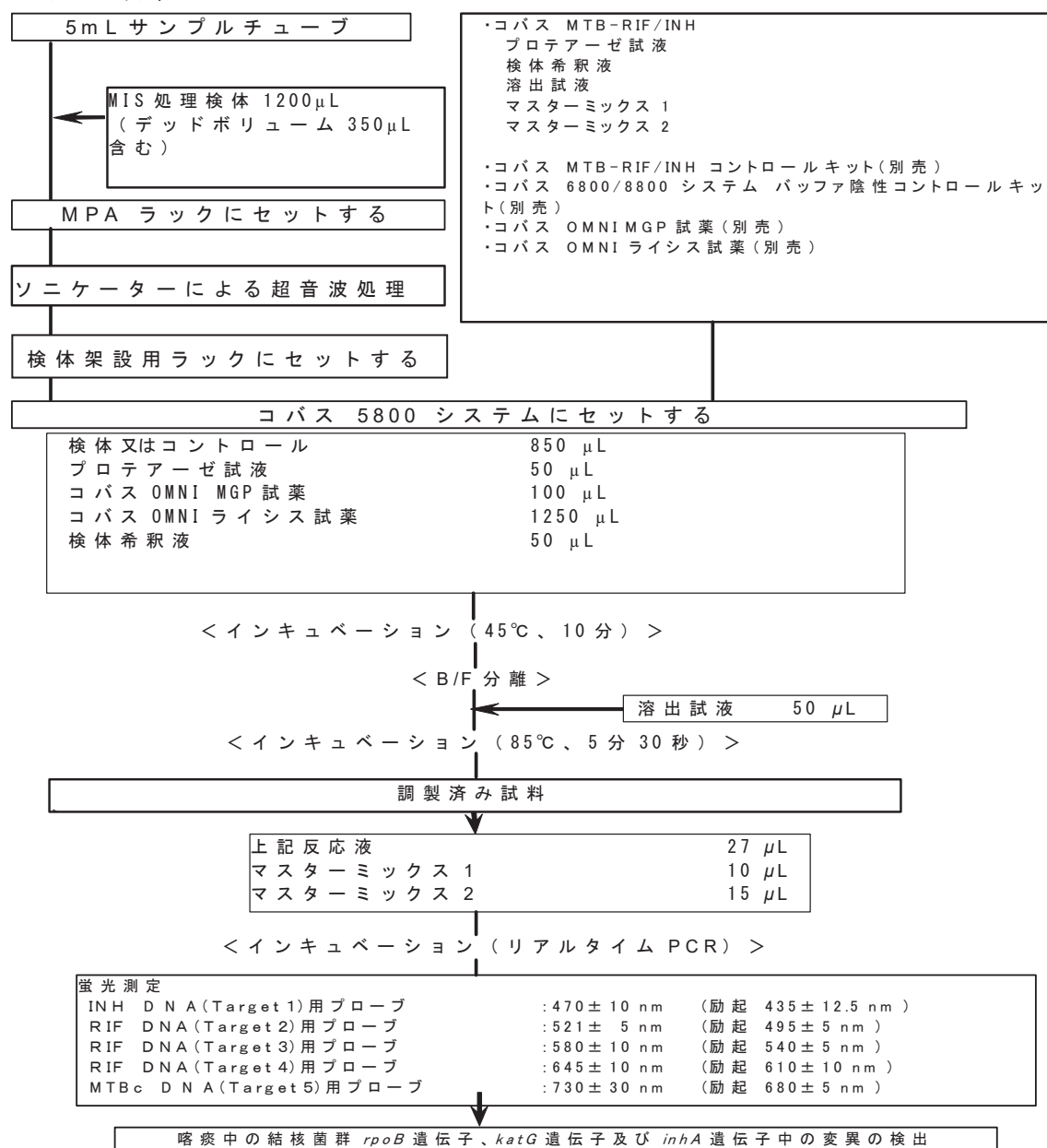
ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

《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、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。

《操作概略》
コバス 5800 システム



※《操作概略》

コバス 6800 システム、コバス 8800 システム、コバス 6800 システム plus又はコバス 8800 システム plus

