

ご使用前に必ず本電子添文をよくお読みください。

体外診断用医薬品

製造販売承認番号：22900EZ00044000

**2023年12月改訂（第3版）

*2023年10月改訂（第2版）

結核菌群ピラジナミド耐性遺伝子同定キット

ジェノスカラー[®]・PZA-TB II

【重要な基本的注意】

1. 本品は結核菌群pncA遺伝子を検出します。ピラジナミド（PZA）耐性結核菌の72～97%がpncA遺伝子中に変異を持つとされていますが、残りの数%はこの遺伝子中に変異がないため、本品では野生型と判定されます¹⁻⁴。
2. *M. tuberculosis*と同じく結核菌群に属する他の菌種のpncA遺伝子配列は、*M. bovis*では1塩基異なるのみであり、*M. africanum*、*M. microti*では完全に一致します。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。（*M. bovis*は本品では変異型（Δ15-16）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、それ以外の目的に使用しないでください。
2. この電子添文に記載された操作方法に従って使用してください。記載された使用方法及び使用目的以外の使用については、測定結果の信頼性を保証いたしかねます。
3. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果等と合わせて担当医師が総合的に判断してください。
4. 使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. 構成試薬並びにその成分

構成試薬	主成分	表示
増幅試液Z	pncAプライマーF/pncAプライマーR	Z
ポリメラーゼ溶液	KOD DNAポリメラーゼ	P
プローブ結合ストリップ	pncAプローブ1～48	1
変性液		2
ハイブリダイズ液		3
濃厚リンス液		4
コンジュゲート液	アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン	C1
コンジュゲート希釈液		C2
基質液	プロモクロロインドリルリン酸、ニトロテトラゾリウムブルー	S1
基質希釈液		S2

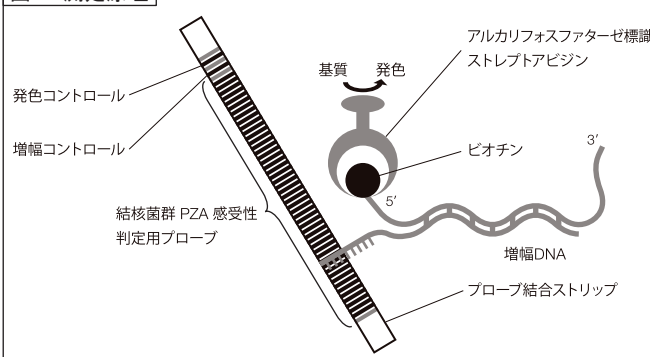
【使用目的】

喀痰又は抗酸菌用培地で培養した培養菌株中の結核菌群pncA遺伝子中の変異の検出（ピラジナミド耐性結核菌感染の診断補助等）

【測定原理】

本品では、喀痰や培養菌株から抽出した結核菌群DNAを検体とします。抽出した結核菌群DNAを増幅試液Z・ポリメラーゼ溶液を用いて増幅します。増幅された結核菌群pncA遺伝子をプローブ結合ストリップにハイブリダイズさせ、コンジュゲート試液を加えアビジン-ビオチン反応をさせます。ビオチンと結合したアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンと基質との反応によりプローブ結合ストリップが発色します（図1参照）。

図1 測定原理



結核菌群pncA遺伝子は全長561bpの遺伝子であり、プローブ結合ストリップ上に固定された48本のプローブはpncA遺伝子の全領域に対応しています。pncA遺伝子中に変異がない場合48本全てのプローブが発色します。

pncA遺伝子中に変異がある場合にはその変異箇所に対応したプローブ部位での発色は起こりません。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

- 1) 前処理前の検体は感染のおそれがあります。喀痰及び培養菌株の操作は熟練した技術者が行い、ゴム手袋や安全ゴーグルを着用するなど、取扱いには十分注意してください。
- 2) 血液成分が多量に含まれている検体では、増幅反応が阻害されて検出できないことがあるため、使用を避けてください。
- 3) 検体を長期に保存する場合には-80℃以下で凍結してください。また、前処理済みの検体、増幅済みのDNAは凍結保存することができます。この場合、-20℃以下で保存し、凍結融解はできるだけ避けてください。凍結した検体は室温に戻し、よく混ぜてからご使用ください。

2. 菌種特異性

M. tuberculosis、*M. bovis* BCG及び下記に記載した30菌種の培養菌株から抽出したゲノムDNAを試料として操作したところ、本品では*M. tuberculosis*は野生型（WT）、*M. bovis* BCGは変異型（Δ16）と判定され、他の30菌種では陰性となりました。なお、*M. bovis*による感染は稀であり、PZA耐性であることが知られています。

〈非結核性抗酸菌〉

M. abscessus、*M. avium*、*M. celatum* II、*M. chelonae*、*M. fortuitum*、*M. gastri*、*M. gordonae*、*M. intracellulare*、*M. kansasii*、*M. kansasii* type II、*M. marinum*、*M. nonchromogenicum*、*M. peregrinum*、*M. phlei*、*M. rhodesiae*、*M. scrofulaceum*、*M. simiae*、*M. smegmatis*、*M. szulgai*、*M. terrae*、*M. triplex*

〈その他〉

Escherichia coli、*Haemophilus influenzae*、*Klebsiella pneumoniae*、*Rhodococcus equi*、*Legionella pneumophila*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*

3. その他

- 1) 増幅DNAによる汚染を避けるため、増幅前のサンプルと増幅後のサンプルは別々の場所に保管してください。増幅試液Z及びポリメラーゼ溶液も増幅されたDNAサンプルとは別の場所に保管してください。

2) 増幅前の操作と増幅後の操作は別々の場所で行ってください。また、増幅操作に使用するピペットチップ、チューブ等は滅菌したものを使用し、手袋を着用する等DNAの汚染防止に心がけてください。疎水性フィルター付のピペットチップの使用は汚染防止になります。

【用法・用量（操作方法）】

1. 別途必要な器具・器材・試薬

- 1) 安全キャビネット
- 2) DNA増幅装置及び専用の備品・消耗品
- 3) 振とう機能付恒温水槽（62±0.5℃を保持できるもの）
- 4) 振とう機
- 5) 遠心機
- 6) ゴム手袋・安全ゴーグル
- 7) マイクロピペット及び疎水性フィルター付チップ
- 8) メスシリンダー・ビーカー等
- 9) 滅菌精製水
- 10) TE buffer（10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0）
- 11) ピンセット

2. 検体の前処理

本品で使用する検体の前処理は以下の方法で行ってください。他の方法で処理された検体では十分な性能が得られないことがあります。

1) 喀痰の場合

- (1) NALC-NaOH処理した検体全量を12,000rpmで15分間遠心します。
- (2) 上清を捨て、100 μ LのTE bufferを加え、よく混和します。
- (3) 12,000rpmで15分間遠心します。
- (4) 上清を捨て、50 μ LのTE bufferを加え、よく混和します。
- (5) 95～100℃で15～30分間加熱します。
- (6) 30分間凍結します。
- (7) 室温に戻し、よく混ぜます。
- (8) 増幅には10 μ Lを使用します。保存する場合には-20℃以下で保存します。

2) 固形培地で培養された菌株の場合

- (1) 1mLのTE bufferを蓋付きのチューブに用意します。
- (2) 培養した菌を白金耳等で採取し、用意したTE buffer中に懸濁します。
(注) 培地上から採取する場合、培地全面から取るようにしてください。また、採取する量は1/2白金耳量（約1mg）を目安としますが、目で確認される量であれば十分です。
- (3) 95～100℃で15～30分間加熱します。
- (4) 30分間凍結します。
- (5) 室温に戻し、よく混ぜます。
- (6) 増幅には5 μ Lを使用します。保存する場合には-20℃以下で保存します。

3) 液体培地で培養された菌株の場合

- (1) 遠心チューブに培地1.0mLを採取します。
- (2) 12,000rpmで15分間遠心し、上清を捨てます。
- (3) 再度(2)同様に遠心し、残っている余分な液を捨てます。
- (4) 残っているペレットにTE buffer 20 μ Lを加え、懸濁します。
- (5) 95～100℃で15～30分間加熱します。
- (6) 30分間凍結します。
- (7) 室温に戻し、よく混ぜます。
- (8) 増幅には10 μ Lを使用します。保存する場合には-20℃以下で保存します。

3. 増幅ステップ（pncA遺伝子）

1) 増幅に使用する試薬

増幅試液Z [Z]、ポリメラーゼ溶液[P]；そのまま使用します。
(注) 本品には滅菌精製水は含まれておりません。別途ご用意ください。

2) 操作方法（PCR）

- (1) N数（テストサンプル数+陰性対照）に応じて、滅菌済みの容器に下記のとおりマスターミックスを調製します。
① 検体を喀痰、又は液体培地で培養された菌株から用意した場合（10 μ Lを増幅に使用する場合）

(N+1) × 30 μ L 増幅試液Z
(N+1) × 1 μ L ポリメラーゼ溶液
(N+1) × 9 μ L 滅菌精製水
PCRチューブに40 μ Lずつ分注します。
前処理した検体、又は陰性対照としての滅菌精製水を10 μ L添加します。

② 検体を固形培地で培養された菌株から用意した場合

(5 μ Lを増幅に使用する場合)
(N+1) × 30 μ L 増幅試液Z
(N+1) × 1 μ L ポリメラーゼ溶液
(N+1) × 14 μ L 滅菌精製水
PCRチューブに45 μ Lずつ分注します。
前処理した検体、又は陰性対照としての滅菌精製水を5 μ L添加します。

- (2) DNA増幅装置のプログラムを下表のとおり設定し、DNAの増幅を行います。

サイクル数	温度	時間
1	94℃	2分間
55	98℃	10秒間
	67℃	1分間
1	65℃	2分間

4. 検出ステップ（pncA遺伝子の検出）

1) 検出に使用する試薬

リンス液：

濃厚リンス液 [4] を精製水で5倍希釈します。1テストにつき4mL使用します。

コンジュゲート試液：

コンジュゲート液 [C1] をコンジュゲート希釈液 [C2] で101倍希釈します。1テストにつき1mL使用します。

基質試液：

基質液 [S1] を基質希釈液 [S2] で101倍希釈します。1テストにつき1mL使用します。

ハイブリダイズ液 [3]：

62℃に加温して使用します。

上記の試薬は用時調製してご使用ください。

他の試薬はそのまま使用します。検出の30分以上前に試薬を冷蔵庫から取り出し20～25℃に戻してください。

2) 操作方法

以下の操作には検体前処理装置マルチプロットNS-4800を用いることができます。

62±0.5℃に調節した恒温槽を用意してください。ただし、設定温度はお使いになる環境によって微調整が必要になる場合があります。

反応温度	試薬量及び操作
20～25℃	変性液：10 μ L ^{注1} 増幅産物、又は陰性対照品 ^{注2} ：10 μ L ピペッティングにより混合し、5分間静置
	ハイブリダイズ液：1mL 反応槽を前後に揺らして穏やかに振とう プローブ結合ストリップ1枚を完全に浸す ^{注4} 30分間振とう ^{注5}
62℃ ^{注3}	ハイブリダイズ液：1mL 反応液を除去し、プローブ結合ストリップをハイブリダイズ液で2回洗浄
	ハイブリダイズ液：1mL 10分間振とう
20～25℃	リンス液：1mL 反応液を除去し、プローブ結合ストリップをリンス液で2回洗浄 ^{注6}
	コンジュゲート試液：1mL 30分間振とう
	リンス液：1mL 反応液を除去し、プローブ結合ストリップをリンス液で2回洗浄 ^{注6}
	精製水：1mL プローブ結合ストリップを精製水で1回洗浄 ^{注6}
	基質試液：1mL 30分間振とう 精製水：1mL 基質試液を除去後、精製水で5分間洗浄 ^{注6, 7} 乾燥後、結果判定

ケース4 陰性対照品や、他のプローブ結合ストリップに非特異発色が見られる。

原因：他のDNAの混入が増幅操作中に起こったおそれがあります。

対策：再度増幅を行ってください。汚染を防ぐために、増幅試液及びポリマーゼ溶液は増幅産物とは別の場所に保管してください。汚染を防ぐため操作中は手袋を使用し、使用するチップ（疎水性フィルター付がよい）、チューブ等は滅菌したものを使用してください。

【臨床的意義】

結核治療は通常リファンピシン、イソニアジド、PZA、ストレプトマイシン、又はエタンブトールの4剤を併用して行われますが、これらの薬剤感受性検査は培養法で行われており、数週間の時間を要します。そのため、結核患者の治療は、培養による感受性検査の結果が得られるまでは感受性が不明なまま、標準的治療法がなされます。この間、薬剤耐性結核患者では治療効果が期待できないばかりか、感受性のある薬剤に対しても新たな耐性を獲得し得る状況となります。

結核菌のPZA耐性はpncA遺伝子に変異があることが原因と考えられています。PZA耐性結核菌の72～97%はpncA遺伝子に変異が認められます¹⁻³。

本品は、結核菌群pncA遺伝子を検出します。この遺伝子配列から結核菌群pncA遺伝子中の変異の検出を行います。結核菌群pncA遺伝子中の変異の有無はPZA感受性診断の指標として有用です^{5,6}。

【性能】

1. 感度

- 滅菌精製水を試料として操作した場合、判定ラインは検出されません。
- 感度試験用管理DNA^{※15}コピーを試料とした場合、判定ラインは偽陰性、偽陽性なく検出でき、野生型（WT）と判定できます。

2. 正確性

正確性試験用管理DNA^{※2}を検出するとき、判定結果が既知の遺伝子型と一致します。

**3. 同時再現性

滅菌精製水、感度試験用管理DNA^{※15}コピー及び正確性試験用管理DNA^{※2}を3回同時に検出するとき、判定結果は全て一致します。

※1 感度試験用管理DNA

結核菌標準株（H37Rv：野生型ATCC27294）より抽出したゲノムDNAを1コピー/μLとなるよう希釈したものを。

※2 正確性試験用管理DNA

塩基配列解析によりpncA遺伝子配列を確認した結核菌DNAを10⁻¹⁶～10⁻¹³mol/Lとなるよう希釈したものを。

4. 最小検出感度

1測定当たり結核菌群DNA 5コピー

5. 相関性試験成績

1) 既承認品との相関

臨床検体374例（喀痰：119例、培養菌株：255例）から抽出したDNAを試料として本品と既承認品「ジェノスカラー・PZA TB」との比較検討を行ったところ、下表のように一致率98.1%と良好な結果が得られました。なお、耐性の判定結果を陽性、感受性の判定結果を陰性として陽性一致率・陰性一致率を算出しました。

		既承認品			計
		耐性	感受性	陰性	
本品	耐性	96例	2例 ^{※3}	0例	98例
	感受性	2例 ^{※4}	131例	3例 ^{※5}	136例
	陰性	0例	0例	140例	140例
計		98例	133例	143例	374例

陽性一致率：98.0%（96/98）

陰性一致率：98.5%（131/133）

一致率：98.1%（367/374）

※3 全て本品の検出領域内に変異を認めました（c42g：1例、t172g：1例）。

※4 1例はプローブ端にプローブ配列と同じ配列の挿入変異を認めました（285insTAC）。1例は変異型（390insGTG）と野生型のMixtureでした。

※5 結核菌DNAが最小検出感度以下の検体と考えられます。

なお、検体種別の試験成績は以下のようになりました。

(1) 喀痰検体119例

		既承認品			計
		耐性	感受性	陰性	
本品	耐性	4例	0例	0例	4例
	感受性	0例	52例	3例 ^{※6}	55例
	陰性	0例	0例	60例	60例
計		4例	52例	63例	119例

陽性一致率：100%（4/4）

陰性一致率：100%（52/52）

一致率：97.4%（116/119）

※6 結核菌DNAが最小検出感度以下の検体と考えられます。

(2) 培養菌株255例

		既承認品			計
		耐性	感受性	陰性	
本品	耐性	92例	2例 ^{※7}	0例	94例
	感受性	2例 ^{※8}	79例	0例	81例
	陰性	0例	0例	80例	80例
計		94例	81例	80例	255例

陽性一致率：98.0%（92/94）

陰性一致率：97.5%（79/81）

一致率：98.4%（251/255）

**※7 全て本品の検出領域内に変異を認めました（c42g：1例、t172g：1例）。

※8 1例はプローブ端にプローブ配列と同じ配列の挿入変異を認めました（285insTAC）。1例は変異型（390insGTG）と野生型のMixtureでした。

2) 薬剤感受性検査との相関

本品、薬剤感受性検査双方の結果が得られた212例との比較検討を行ったところ、下表のように一致率98.1%と良好な結果が得られました。

		薬剤感受性検査		計
		耐性	感受性	
本品	耐性	94例	2例 ^{※9}	96例
	感受性	2例 ^{※10}	114例	116例
計		96例	116例	212例

陽性一致率：97.9%（94/96）

陰性一致率：98.3%（114/116）

一致率：98.1%（208/212）

※9 全て本品の検出領域内に変異を認めました（c503t：2例）。

※10 1例はプローブ端にプローブ配列と同じ配列の挿入変異を認めました（285insTAC）。1例は変異型（390insGTG）と野生型のMixtureでした。

【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) 基質液中にはプロモクロロインドリルリン酸、ニトロテトラゾリウムブルー、ジメチルホルムアミドが含まれています。これらの物質を吸引、接触した場合人体に害を及ぼすことがありますので、使用に際しては手袋等を着用してください。万一、手などに付着した場合は十分に洗浄してください。

2) 試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分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等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 1) 期限切れの試薬は使用しないでください。また、他の製造番号と組み合わせたり、試薬を注ぎ足したりして使用しないでください。
- 2) 検出の一連の操作は同一温度のもとで、同一順序、同一時間間隔で行い、反応時間を厳守してください。
- 3) 使用後、容器の蓋は閉めるようにし、開放したままにしないでください。特に変性液は長時間の開放で変性が低下するおそれがあります。
- 4) 検出にはキット付属の反応槽を使用してください。それ以外の容器を反応槽として使用する場合は、プローブ結合ストリップが完全に反応液に浸かるように液量を検討してからご使用ください。

3. 廃棄上の注意

- 1) 核酸試料及び増幅DNAの廃棄は、有効塩素濃度が5,000ppm (0.5%) となるよう次亜塩素酸剤を加えて一晚放置する等、DNAを破壊してから廃棄してください。
- 2) 本品の試薬は防腐剤としてアジ化ナトリウムを含有しています。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性の強い金属アジドを生成することがありますので廃棄の際は大量の水と共に流してください。
- 3) 試薬及び器具等を廃棄する際には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。
- 4) 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。
- 5) 検体をこぼした場合は、次亜塩素酸剤（有効塩素濃度5,000ppm、0.5%）などの消毒液を使用して十分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。

【貯蔵方法、有効期間】

1. 貯蔵方法

2～10℃で保存

2. 有効期間

18ヶ月

【包装単位】

製品銘柄	構成試薬	包装単位
キットセット	①増幅試薬Z [Z]	0.9mL ×1本
	②ポリメラーゼ溶液 [P]	0.03mL×1本
	③プローブ結合ストリップ [1]	20枚 ×1本
	④変性液 [2]	0.5mL ×1本
	⑤ハイブリダイズ液 [3]	65mL ×2本
	⑥濃厚リンス液 [4]	50mL ×1本
	⑦コンジュゲート液 [C1]	0.7mL ×1本
	⑧コンジュゲート希釈液 [C2]	70mL ×1本
	⑨基質液 [S1]	0.7mL ×1本
	⑩基質希釈液 [S2]	70mL ×1本

【主要文献】

1. Scorpio A, Zhang Y. Nat Med., 2, 662-7. (1996)
2. Scorpio A, Lindholm-Levy P et al. Antimicrob Agents Chemother., 41, 540-3. (1997)
3. Sreevatsan S, Pan X et al. Antimicrob Agents Chemother., 41, 636-40. (1997)
4. Hirano K, Takahashi M et al. Tuber Lung Dis., 78, 117-22. (1997)
5. Sekiguchi J, Nakamura T et al. J Clin Microbiol., 45, 2802-7. (2007)
6. Mitarai S, Kato S et al. J Clin Microbiol., 50, 884-90. (2012)

*【問い合わせ先】

ニプロ株式会社

大阪府摂津市千里丘新町3番26号

フリーダイヤル：0120-226-410

受付時間：9:00～17:15（土・日・祝日を除く）

*【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

ニプロ株式会社

大阪府摂津市千里丘新町3番26号



ニプロ株式会社