体外診断用医薬品　　**改訂 2023年4月(第4版)
製造販売承認番号 30200EZX00041000　　*改訂 2022年5月(第3版)

ご使用に際しては本添付文書をよく読んでからご使用ください。

クロストリジウム・ディフィシル核酸キット

ジーンキューブ®C. difficile

[全般的な注意]
1.本品は全自動遺伝子解析装置 GENECUBE®の専用試薬です。
2.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。
3.添付文書以外の使用目的及び使用方法でご使用されて得られた測定結果については保証を致しかねます。
4.測定結果に基づく診断は、他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。
5.使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。
6.SDSは末尾記載の問い合わせ先に請求し、ご確認ください。

[形状・構造等(キットの構成)]
1.酵素試薬[CD 専用 KOD Mix]
KOD® DNA ポリメラーゼ
dNTP※
2.プライマー・プローブ試薬[CD Mix]
tcdB primer_F
tcdB primer_R1
tcdB primer_R2
tcdB QProbe
硫酸マグネシウム
3.陽性コントロール溶液[CD PC]
4.陰性コントロール溶液[CD NC]
※「dNTP」はデオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸の混合物です。

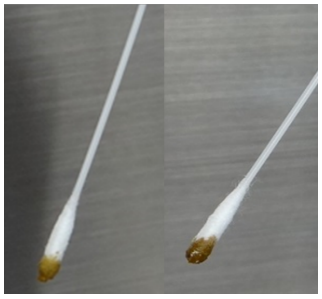
[使用目的]
糞便中の *Clostridioides difficile* トキシン B の DNA 検出(*Clostridioides difficile* 感染の診断補助)

***[測定原理]**
本試薬は、「Polymerase Chain Reaction(PCR)法による標的核酸増幅」と「蛍光標識プローブ(QProbe※)を用いた標的核酸検出」[1)2)]を利用して *Clostridioides difficile*(*C. difficile*)の *tcdB*(トキシン B をコードする遺伝子)[3)]を検出する試薬です。
標的核酸にプライマーがハイブリダイズし、KOD® DNA ポリメラーゼ[4)]が反応することで標的核酸が増幅されます。増幅した標的核酸に対して、プローブをハイブリダイズさせて蛍光変化を解析することで *tcdB* 遺伝子の検出を行います。
※「QProbe」は日鉄環境株式会社が特許権を有する消光プローブです。

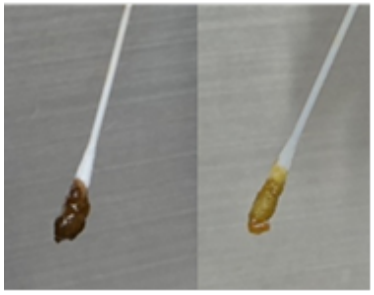
[操作上の注意]
1.臨床検体について
(1)泥状便或いは水様性便を検体として使用してください。固形便は検体として不適切です。
(2)採取された便は速やかに冷蔵し、検体の輸送中及び輸送後は 2～8℃に 保ち、凍結や室温(15～25℃)での保存は避けてください。
(3)2～8℃で保管された検体は 7 日間まで検査可能です。

2.試料の調製方法
糞便の前処理・核酸抽出は、ジーンキューブ®専用 前処理キット(糞便用)の使用を推奨します※。以下に、ジーンキューブ®専用 前処理キット(糞便用)を用いる場合の処理法を示します。
(1)糞便採取容器に採取済みの糞便検体を滅菌綿棒で適量を採取します(図参照)。スポイトで採取する場合、約 50μL を用いてください。便量過多の場合、糞便による阻害が強くなり、判定結果に影響を及ぼす可能性があります。

適量



過多



(2)採取した糞便を試料溶解液約 1mL を入れた前処理チューブに懸濁します。
(3)前処理チューブにフィルターを取り付け、懸濁液をろ過します。
(4)ジーンキューブ®専用 イージー・ビーズに(3)のろ液約 200μL を分注します。
(5)(4)のチューブのキャップを締め、ボルテックスで 20 秒以上撹拌します。
(6)撹拌したチューブに試料溶解液約 200μL を添加し、転倒混和させた後、13,000×g で 3 分間遠心します。
(7)上清約 20μL 以上を 0.5mL サンプルチューブに分注し、検体調製液とします。
※使用上又は取扱い上の詳細な注意は、ジーンキューブ®専用 前処理キット(糞便用)に添付の資料を参照してください。他の前処理・核酸抽出キットを用いる場合、注意事項など詳細については製品の説明書に従って操作してください。各種前処理・核酸抽出法の操作方法に従って核酸を抽出したものを検体調製液とします。

3.交差反応性
Enterobacter cloacae , *Enterococcus faecalis* , *Enterococcus faecium* , *Campylobacter jejuni* , *Escherichia coli* , *Klebsiella pneumoniae* , *Proteus mirabilis* , *Staphylococcus epidermidis* , Norovirus , *Clostridium sporogenes* , *Clostridium perfringens* から抽出した試料(各 40,000 コピー/テスト)について測定を行ったところ、交差反応は認められませんでした。また、*tcdB* 遺伝子を保有しない *C. difficile* を測定し、陰性であることを確認しました。

4.共存物質の影響
ビサコジル、ヒドロコルチゾン、メトロニダゾール、フィダキソマイシン、ロペラミド、バンコマイシン(各終濃度 約 100μg/mL)存在下でも本品の判定結果に影響しないことを確認しました。

5.コンタミネーションの防止
GENECUBE®は、試薬の分注から増幅専用容器であるプラスチックキャピラリーへの試薬の充填、増幅検出までを自動で行います。増幅検出を一つの容器で開封することなしに行え、かつ測定を終了した試薬はそのまま自動で廃棄するため、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を抑えることができます。しかし、GENECUBE®では検体の調製段階で発生するクロスコンタミネーションは防止することができませんので、以下の操作法を遵守してください。
(1)個人防護具の着用
人体に付着した微生物や体液(例えば唾液、汗)の混入を防ぐため、また検体からの感染防止の観点からも個人防護具(手袋、マスク、防護衣など)を着用して操作を行ってください。GENECUBE®への試薬のセット時には、検体の調製時に使用した手袋は使用せず、新しい手袋を使用してください。
(2)フィルター付ピペットチップの使用
検体の調製時に使用するピペットがエアーディスプレースピペットの場合、サンプルとピストンの間に空気が介在するため、ピペット内部を汚染してしまう可能性があります。ピペット内部の汚染を防止するため、フィルター付のチップを使用してください。

***[用法・用量(操作方法)]**
1.試薬・試液調製法
・酵素試薬[CD 専用 KOD Mix] : そのまま用います。
・プライマー・プローブ試薬[CD Mix] : そのまま用います。

2.必要な器具、器材など
・GENECUBE®及びその付属品、取扱説明書
・マイクロピペット及びチップ
・個人防護具 (手袋、マスク、防護衣など)
・ボルテックスミキサー

＜消耗品＞
・ジーンキューブ®専用 試料溶解液

・ジーンキューブ®専用 前処理キット（糞便用）
・ジーンキューブ®専用 イージー・ビーズ
・ジーンキューブ®専用 プラスチックキャピラリー
・ジーンキューブ®専用 分注チップ
・8,12 連チューブ：株式会社イナ・オプティカ 123015TC,123046TC など※
・サンプルチューブ(0.5mL)：ザルスタット株式会社 72.699.00003, 72.704.700 など※
※上記以外の製品をご使用の場合は、適合の可否をお問い合わせください。

3.操作方法
本品は、全自動遺伝子解析装置 GENECUBE®を用いて測定してください。GENECUBE®の操作は、GENECUBE®の取扱説明書に従って行ってください。
(1)酵素試薬［CD 専用 KOD Mix］、プライマー・プローブ試薬［CD Mix］、各消耗品を機器の所定の位置にセットします。
(2)検体調製液をチューブにそれぞれ分注し、それらを機器の所定の位置にセットします。
(3)検査を開始します。
(4)検査終了後、測定画面上に表示される判定結果に従って判定を行ってください。

精度管理を目的として、付属の陽性コントロール溶液［CD PC］、陰性コントロール溶液［CD NC］を用いる場合、検体調製液と同様に上記の操作を行います。陽性コントロール溶液［CD PC］、陰性コントロール溶液［CD NC］はそのまま用いることができます。陽性コントロール溶液［CD PC］について測定結果が陰性を示した場合、陰性コントロール溶液［CD NC］について測定結果が陽性を示した場合、全ての試薬を入れ替えて再測定を行ってください。

［測定結果の判定法］
1.判定方法
判定結果は、判定画面上で陽性「＋」、陰性「－」、判定無効「Invalid」とそれぞれ表示されます。判定無効「Invalid」の場合、検体調製から再測定を行ってください。

2.判定上の注意
本品で陰性と判定されても必ずしも *tcdB* 遺伝子の存在を否定するものではありません。検体中に標的となる DNA が存在しても、検体前処理操作で最小検出感度以下になった場合は陰性と判定されますのでご注意ください。
(1)以下の場合、正常に測定できないことがありますのでご注意ください。
　1)検体調製が不十分で、菌体のロス又は DNA の分解が生じている検体を使用した場合
　2)保管方法が適切に行われていないもしくは有効期限が過ぎている試薬を使用した場合
　3)保管が適切に行われていない検体を使用した場合
(2)試料に含まれる *C. difficile* が死菌である場合、菌から放出された DNA を検出する可能性があります。

［性能］
1.性能
用法・用量（操作方法）欄の操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行なった場合、下記の規格に適合します。
(1)感度試験
　1)陰性コントロール溶液を測定するとき、陰性を示します。
　2)陽性コントロール溶液を測定するとき、陽性を示します。
(2)正確性試験
　1)自家管理陰性試料を測定するとき、陰性を示します。
　2)自家管理陽性試料を測定するとき、陽性を示します。
(3)同時再現性試験
　1)自家管理陰性試料を 3 回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。
　2)自家管理陽性試料を 3 回同時に測定するとき、すべて陽性を示します。
(4)最小検出感度（GENECUBE®測定）
約 3 コピー／テスト
(5)較正用基準物質
本品の較正用基準物質には *tcdB* 遺伝子を含む DNA を使用しています。

2.相関性
(1)培養法での *C. difficile* 検出との相関性評価
糞便検体 412 件を試料として、本品での測定及び培養法での毒素産生 *C. difficile* 検出を行ったところ、表1に示すように良好な相関を示しました。本品で陽性、培養法での毒素産生 *C. difficile* 検出で陰性だった 4 件は、核酸増幅法を原理とする既承認品で陽性を確認しました。本品で陰性、培養法での毒素産生 *C. difficile* 検出で陽性であった 9 件は核酸増幅法を原理とする既承認品で陰性を確認しました。

表 1. 培養法での毒素産生 *C. difficile* 検出との相関性試験成績

		培養法での毒素産生 *C. difficile* 検出	
		陽性	陰性
本品	陽性	82	4*1
	陰性	9*2	317
全体一致率		96.8% (399/412)	
陽性一致率		90.1% (82/91)	
陰性一致率		98.8% (317/321)	

*1 4 件とも核酸増幅法を原理とする既承認品で陽性
*2 9 件とも核酸増幅法を原理とする既承認品で陰性

(2)核酸増幅法を原理とする既承認品との相関性評価
糞便検体 412 件を試料として、本品及び核酸増幅法を原理とする既承認品で測定を行ったところ、表 2 に示すように良好な相関を示しました。本品で陽性、既承認品で陰性だった 6 件は、培養検査及び発育コロニーに対する毒素産生試験により、毒素産生 *C. difficile* 陽性が確認されました。本品で陰性、既承認品で陽性であった 1 件は培養検査で *C. difficile* の発育は認められませんでした。

表 2. 既存核酸増幅同定法との相関性試験成績

		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	80	6*3
	陰性	1*4	325
全体一致率		98.3% (405/412)	
陽性一致率		98.8% (80/81)	
陰性一致率		98.2% (325/331)	

*3 6 件とも培養法での毒素産生 *C. difficile* 陽性
*4 培養法での毒素産生 *C. difficile* 陰性

［使用上又は取扱い上の注意］
1.取扱い上の注意
(1)検体は感染性を有するものとして、各施設の安全管理規定に従って取扱ってください。
(2)検体を取扱う時は、手袋、マスク、防護衣などの個人防護具を着用し、検体を吸い込んだり体に付着したりすることがないようご注意ください。
(3)試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の診察・治療などを受けてください。
(4)試薬が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。
(5)試薬が飛散した場合は、拭き取ってください。
(6)検体を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、0.5%次亜塩素酸剤などの消毒液を使用して拭き取ってください。

2.使用上の注意
(1)機器、試薬および消耗品は専用のものを使用し、それらは他の目的に転用しないでください。
(2)本品に含まれる試薬は必ず保管方法に従って保存し、凍結させたり、長時間室温に放置したりしないでください。また、保管方法以外の条件で保存した試薬や使用期限が過ぎている試薬は使用しないでください。
(3)すべての構成試薬は継ぎ足して使用しないでください。
(4)本品の構成試薬は異なるロット同士で組み合わせて使用しないでください。
(5)本品の酵素試薬[CD 専用 KOD Mix]は、他の GENECUBE®専用試薬に使用しないでください。
(6)他の GENECUBE®専用試薬の酵素試薬は、本品に使用しないでください。

3.廃棄上の注意
(1)使用済みの試薬及び器具などを廃棄する場合には医療用廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。
(2)試薬を廃棄する場合は水質汚濁防止法などの規制に留意して処理してください。
(3)使用済みの試薬及び消耗品は、溶液を飛散させないように廃棄してください。

**[保管方法・有効期間]
保管方法
2～8℃で保存
有効期間
12ヶ月 (期限は外装に表示)

**[包装単位]

商品名	構成試薬名
ジーンキューブ® C. difficile (16テスト)	酵素試薬[CD 専用 KOD Mix]
	プライマー・プローブ試薬[CD Mix]
	陽性コントロール溶液[CD PC]
	陰性コントロール溶液[CD NC]

[主要文献]

1) Kurata S. *et al.* Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res. 2001 Mar 15; 29(6): e34.
2) Torimura M. *et al.* Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. Anal Sci. 2001 Jan; 17(1): 155-160.
3) *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* 感染症 診療ガイドライン(発行 日本化学療法学会)
4) Takagi M. *et al.* Characterization of DNA Polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and Its Application to PCR. Appl Environ Microbiol. 1997 Nov; 63(11): 4504-4510.

文献請求先 末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。

TOYOBO

*[問い合わせ先]
東洋紡株式会社 診断システム事業部
〒530-0001 大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3335 FAX 06-6348-3833

*[製造販売業者の氏名又は名称及び住所]
東洋紡株式会社
〒914-8550 福井県敦賀市東洋町10番24号