

マイコバクテリウム核酸キット

Loopamp® 結核菌群検出試薬キット

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用できない。
結核菌群検出の臨床診断を目的とした検査のみに使用すること。
2. 診断は、本製品による検査結果のみで行わず、他の検査結果や臨床症状を考慮して総合的に判断すること。
3. 添付文書に記載された内容に従い使用すること。本製品の性能に由来しない事由(操作方法を誤った場合等)による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、弊社は一切の責任を負わない。
4. 遺伝子検査の知識や経験を持たない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありうるので、本製品の使用にあたっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導のもとで検査を実施すること。
5. 使用する試薬及び装置の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等(キットの構成)】

	48テスト分	96テスト分
結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB) ……………	48 tubes ×1	×2
1 反応あたり下記成分含有		
鎖置換型 DNA 合成酵素*1(BST DNA pol) ……………	31.7U	
デオキシアデノシン 5'-3 リン酸(dATP) ……………	27.56 µg	
デオキシシチジン 5'-3 リン酸(dCTP) ……………	26.21 µg	
デオキシグアノシン 5'-3 リン酸(dGTP) ……………	28.45 µg	
デオキシチミジン 5'-3 リン酸(dTTP) ……………	27.05 µg	
硫酸マグネシウム ……………	31.78 µg	
カルセイン ……………	0.514 µg	
塩化マンガン ……………	2.076 µg	
結核菌群特異的プライマー*2 FIP-1(MTBFIP-1) ……	588.19 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 FIP-2(MTBFIP-2) ……	503.13 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 F3-1(MTBF3-1) ……	31.75 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 F3-2(MTBF3-2) ……	39.05 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 BIP-1(MTBBIP-1) ……	675.05 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 BIP-2(MTBBIP-2) ……	598.17 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 B3-1(MTBB3-1) ……	33.92 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 B3-2(MTBB3-2) ……	34.07 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 FL-1(MTBFIL-1) ……	120.04 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 FL-2(MTBFIL-2) ……	164.18 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 BL-1(MTBBL-1) ……	136.51 ng	
結核菌群特異的プライマー*2 BL-2(MTBBL-2) ……	160.85 ng	
	48テスト分	96テスト分
** 陽性コントロール MTB(PC MTB)*3 ……………	0.4mL ×1	×2
** 陰性コントロール MTB(NC MTB) ……………	0.5mL ×2	×3

	48テスト分	96テスト分
付属品)		
陽性コントロール用スポイト ……………	12droppers ×2	×3

*1: *Bacillus stearothermophilus* 由来の DNA Polymerase I から 5'→3' exonuclease 活性を除いた鎖置換型 DNA 合成酵素。

*2: 結核菌群ゲノム DNA の DNA gyrase subunit B(*gyrB*)及び Insertion sequence IS6110(IS)領域内に設定したプライマーで、合成オリゴヌクレオチドを HPLC で精製したもの。

*3: 陽性コントロール MTB(PC MTB)は *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv(GenBank No.NC_000962)のゲノム DNA を鋳型として試験管内増幅反応により得た産物を含む。

下記構成試薬には、次の略名とロット番号、製造販売業者の略号(EKN)が記載されている。

構成試薬	チューブ記載事項	キャップ記載略号
陽性コントロール MTB	PC MTB ロット番号, EKN	PC MTB
陰性コントロール MTB	NC MTB ロット番号, EKN	NC MTB

*【使用目的】

体液、組織、気管支洗浄液又はそれらの液体培養液、あるいは固形培地上で増殖したコロニーの菌懸濁液から抽出された結核菌群 DNA の検出(結核菌群感染が疑われる有症状者を対象とする診断の補助)

【測定原理】

本製品は、弊社が開発した核酸増幅法である LAMP(Loop-mediated Isothermal Amplification)法を測定原理としている。LAMP 法は、①遺伝子増幅反応が等温で進行する^{1), 2)}、②6 領域を認識する 4 種類のプライマーを使用するため特異性が高い、③増幅効率が高く、短時間に増幅可能である、④増幅産物量が多く、簡易検出に適している^{3), 4)} 等の特徴を有した方法である。

本製品のプライマーは、結核菌群ゲノム DNA の DNA gyrase subunit B(*gyrB*)及び Insertion sequence IS6110(IS)領域内に設計している。この領域は、結核菌群及び非結核性抗酸菌の塩基配列を選択してアライメント解析を行った結果、結核菌群で塩基配列が比較的保存されていることが確認された領域である。

はじめに、別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いて検体中の DNA を抽出し、サンプル溶液を調製する。このサンプル溶液と結核菌群特異的プライマーを含む結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)を反応チューブ内で混合する。反応チューブの蓋(リブの内側)には、鎖置換型 DNA 合成酵素、デオキシヌクレオチド 3 リン酸、カルセイン、結核菌群特異的プライマーが乾燥・保持されているので、混合溶解後に 67.0℃でインキュベートすると、サンプル溶液中の結核菌群 DNA から鎖置換型 DNA 合成酵素により LAMP 反応が進行する。

核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム(白色沈殿物質)の濁度を測定して行う³⁾。また、紫外線照射装置を用いた目視判定(以下、蛍光目視判定又は検出と呼ぶ。)も可能である。試薬中に含まれているカルセインは、反応前にはマンガニオンと結合して消光しているが、LAMP 反応が進行すると、生成するピロリン酸イオンにマンガニオンを奪われるため蛍光を発するようになる⁴⁾。

尚、本製品は定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではない。

【操作上の注意】

* 1. 測定試料の性質・採取法

1) 対象検体
体液、組織、気管支洗浄液又はそれらの液体培養液、あるいは固形培地上で増殖したコロニーの菌懸濁液

2) 検体の採取方法

- (1) 体液、組織、気管支洗浄液は、「結核菌検査指針 2007」(財団法人結核予防会)に記載されている方法で採取すること。
- (2) 採取した検体は直ちに使用すること。
- (3) 検体を前処理する場合には、「結核菌検査指針 2007」(財団法人結核予防会)で推奨されている手法を用いること。
- (4) 血液、又は血液成分が多量に含まれる検体を用いた場合、反応が阻害され偽陰性となることがあるため、前処理を必ず実施すること。
- (5) 液体培養液を用いる場合は、菌の増殖が確認された検体を使用すること。
- (6) 検体採取の際に発生するエアロゾルによって、鑄型 DNA が検査環境中に飛散しコンタミネーションが発生する場合がある。そのため、検体採取は本製品を使用する部屋とは別の部屋で行うか、あるいは検査区域を分割して別のエリアで行うこと。

* 2. 妨害物質・妨害薬剤・交差反応性

遊離型ビリルビン(91.0mg/dL)、抱合型ビリルビン(101.0mg/dL)、乳ビ(ホルマジン濁度 7,300 度)及び溶血ヘモグロビン(2,475mg/dL)、人工胃液(第十六改正日本薬局方の溶出試験第 1 液)及び DNA (1mg/mL)による測定への影響は、社内で検討した結果認められなかった。

薬剤の影響については、イソニアジド(100 µg/mL)、エタンブトール(20 µg/mL)、リファンピシン(100 µg/mL)、ピラジナミド(500 µg/mL)、カナマイシン(20 µg/mL)及びストレプトマイシン(500 µg/mL)による影響は、社内で検討した結果認められなかった。

非結核性抗酸菌(1×10⁴ゲノム相当/テスト)及び呼吸器疾患原因菌(1×10⁵ゲノム相当/テスト)について測定したところ、結果は次の表のとおりすべて陰性であり、交差反応は認められなかった。

非結核性抗酸菌		呼吸器疾患原因菌	
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	陰性	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	陰性
<i>Mycobacterium kansasii</i>	陰性	<i>Staphylococcus aureus</i>	陰性
<i>Mycobacterium marinum</i>	陰性	<i>Haemophilus influenzae</i>	陰性
<i>Mycobacterium simiae</i>	陰性	<i>Moraxella catarrhalis</i>	陰性
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	陰性	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	陰性
<i>Mycobacterium szulgai</i>	陰性	<i>Escherichia coli</i>	陰性
<i>Mycobacterium goodii</i>	陰性	<i>Legionella pneumophila</i>	陰性
<i>Mycobacterium xenopi</i>	陰性	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	陰性
<i>Mycobacterium avium</i>	陰性	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (I)	陰性
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	陰性	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (II)	陰性
<i>Mycobacterium gastri</i>	陰性		
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	陰性		
<i>Mycobacterium mageritense</i>	陰性		
<i>Mycobacterium chelonae</i>	陰性		
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	陰性		
<i>Mycobacterium flavescens</i>	陰性		

3. 結核菌群反応性

Mycobacterium tuberculosis(10 ゲノム相当/テスト)及び *Mycobacterium bovis*(10 ゲノム相当/テスト)を検出した。

【用法・用量（操作方法）】

1. 必要な器具・器材・試薬等

- 1) Loopamp PURE DNA 抽出キット(栄研化学株式会社別売品)
- 2) ピペット(10~100 μL , 20~200 μL)及びフィルター付きチップ
- 3) 微量簡易遠心機
- 4) 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
- 5) リアルタイム濁度測定装置(LAMP 法専用、波長: 600~700nm、増幅温度: 67.0 $^{\circ}\text{C}$)
尚、蛍光目視検出には、リアルタイム濁度測定装置の代わりに次のものが必要となる。
 - ・インキュベーター(温度精度が $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内: ホットボンネット付)
 - ・ヒートブロック
 - ・紫外線照射装置(波長 240~260nm, 350~370nm)
 - ・広幅の眼鏡又は防護面

* 2. サンプル溶液の調製 (DNA 抽出溶液の調製)

検体、あるいは前処理した検体 40~60 μL をピペット等で採取し、別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA 抽出溶液をサンプル溶液とする(別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットの使用【プロトコル 1】に従うこと)。尚、未処理の喀痰については、膿性部分あるいは粘性部分を採取すること。また、液体培養液はそのまま、固形培養検体は培地上で増殖したコロニーの菌懸濁液を調製して抽出に供すること。

3. 試薬の調製方法

- 1) 結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)
必要本数(検体数+コントロール数)の結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)を取り出し、**残りの試薬は直ちに元のアルミパックで密封する。**
- 2) 陽性コントロール MTB(PC MTB)
スピンドウンしてから使用する。
1 日 1 回は測定すること。
- 3) 陰性コントロール MTB(NC MTB)
サンプル溶液の調製法と同様に、陰性コントロール MTB(NC MTB)をスピンドウンしてから 40~60 μL をピペット等で採取し、別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いて抽出した溶液を陰性コントロール溶液とする(別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットの使用【プロトコル 1】に従うこと)。
毎回測定すること。

4. 測定（操作）法

- 1) 試薬及びサンプル溶液の混合
 - (1) 別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットあるいはピペット等を用いて、サンプル溶液 30 μL を反応チューブ(結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB))に添加して蓋を閉める(反応チューブの 2 本のラインの中間が 30 μL の目安である)。
 - (2) コントロール反応用に、サンプル溶液の代わりに陰性コントロール溶液 30 μL を添加して蓋を閉め、陰性コントロールとする。
 - (3) 付属の陽性コントロール用スポイトを用いて、陽性コントロール MTB(PC MTB)30 μL を添加して蓋を閉め、陽性コントロールとする(陽性コントロール用スポイトのラインは 30 μL の目安である)。
 - (4) 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンし、すべての溶液が反応チューブの 2 本のラインの中間に添加されていることを確認する。
 - (5) 反応チューブを転倒して溶液を蓋に移し、転倒した状態のまま 2 分間放置する。
 - (6) 反応チューブを 5 回転倒混和する。この際、蓋の乾燥試薬が十分溶解されたことを確認する。
 - (7) 8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドウンする。

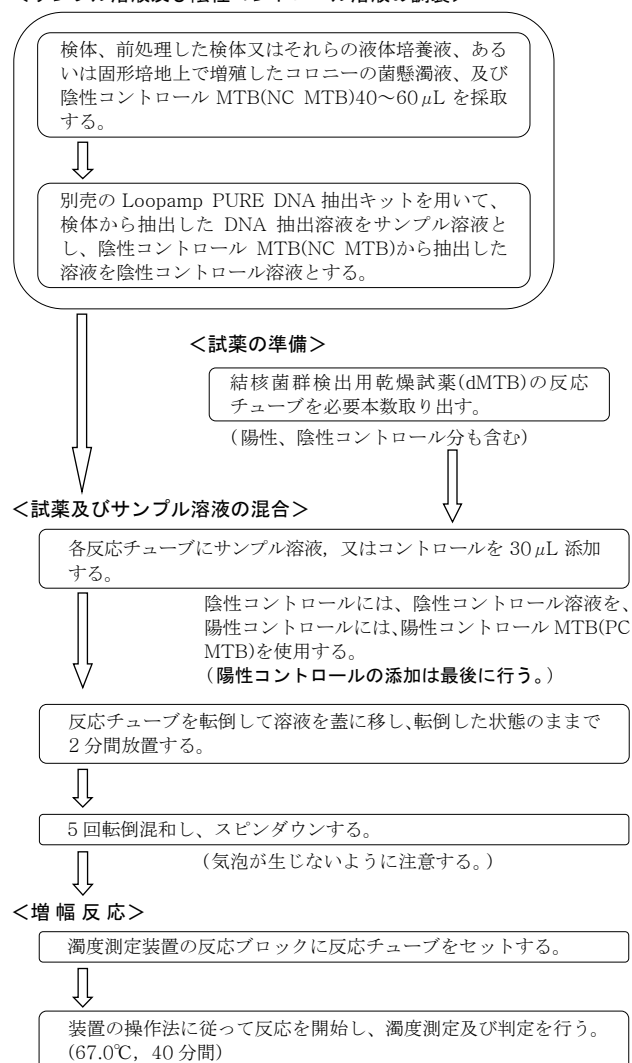
2) 増幅反応

A. リアルタイム濁度検出を行う場合（標準法）

- (1) リアルタイム濁度測定装置のプログラムを本製品用にあわせて設定する。
- (2) 表示温度が 67.0 $^{\circ}\text{C}$ に達していることを確認する。(リアルタイム濁度測定装置は 20 分間ウォームアップしてから使用すること。)
- (3) 反応チューブをセットし測定を開始する。
- (4) 装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認する。陽性コントロール MTB(PC MTB)で濁度が上昇し、陰性コントロール溶液で濁度が上昇していなければ、増幅反応は正常に進行している。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製から再検査を実施する必要がある。(図 1)
- (5) 酵素失活処理(リアルタイム濁度測定装置では自動処理される。)が終了していることを確認した後、装置から反応チューブを取り出し、そのまま蓋を開けずに廃棄する。

リアルタイム濁度検出（標準法）時の操作手順

<サンプル溶液及び陰性コントロール溶液の調製>



酵素失活処理(80 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間又は 95 $^{\circ}\text{C}$, 2 分間)が終了したことを確認後、反応チューブを破損しないように注意しながら装置から取り出し、蓋を開けずに廃棄する。

増幅曲線パターン

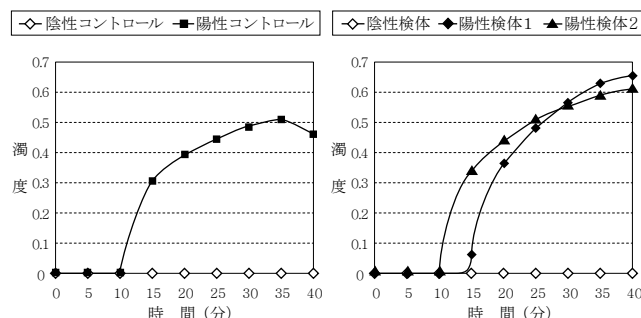


図1. コントロールの増幅曲線パターン

図2. 検体の増幅曲線パターン

(使用装置: Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-320C)

B. 蛍光目視検出を行う場合

- (1) インキュベーター(温度精度が $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内: ホットボンネット付)を 67.0 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認する。
- (2) 反応チューブをセットし、増幅反応(67.0 $^{\circ}\text{C}$, 40 分間)を行う。
- (3) 40 分後にヒートブロックを用いて酵素失活処理(80 $^{\circ}\text{C}$, 5 分間又は 95 $^{\circ}\text{C}$, 2 分間)を行い、反応を停止する。

＜測定にあたっての注意＞

- 1) LAMP 反応は非常に鋭敏な反応であり、増幅産物等の DNA がごく微量でも混入すると誤った結果をもたらす原因となるおそれがある。このようなコンタミネーションを回避するために、検体採取は本製品を使用する部屋とは別の部屋で実施するか、あるいは検査区域を分割して別のエリアで行うこと。必要に応じて、クリーンベンチの使用又は手袋やアイソレーションガウンの着用等でコンタミネーションを防ぐ措置を取ることが望ましい。
- 2) 本製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ること。汗や唾液に含まれる DNase が少量でも混入すると、DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性がある。
- * 3) 血液、又は血液を多く含む検体は、測定結果に影響を及ぼす場合があるため前処理を施した後に使用すること。
- 4) サンプル溶液は原則として直ちに使用すること。やむを得ず保存する場合は、室温で保存し、72 時間以内に使用すること。
- * 5) 別売の Loopamp PURE DNA 抽出キットの滴下注入キャップの先端は反応チューブの側面に接触させないこと。また、サンプル溶液及び陰性コントロール溶液は反応チューブの 2 本のラインの中間を目安に垂直に滴下すること。なお、滴下量が、下のラインより少ない、あるいは上のラインより多い場合には十分な性能が得られない場合がある。
- 6) サンプル溶液を混和後、反応液に気泡が残っていると濁度測定の支障となり誤判定の原因となるので、気泡が生じないように注意すること。気泡が残っている場合には、スピンドウンして気泡を取り除くこと。
- * 7) 結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)の溶解は確実に行うこと。溶解が不十分な場合、感度が低下する等十分な性能が得られないことがある。特に、転倒した状態での放置時間は 2 分間を守ること。
- 8) 陽性コントロール MTB(PC MTB)は高コピー数である。他のサンプルへのコンタミネーションを避けるため、陽性コントロール用反応チューブ以外のすべての反応チューブの蓋を開め、最後に陽性コントロール MTB(PC MTB)を添加すること。
- 9) 陽性コントロール MTB(PC MTB)を扱う際は、キャップを開ける前に必ずチューブをスピンドウンし、キャップを開けている時間も必要最小限となるようにすること。
- 10) リアルタイム濁度測定装置では、酵素失活処理は自動的に行われる。
- 11) 反応後のチューブの蓋は決して開けないこと。特に反応チューブを装置から取り出すときにチューブの蓋が開かないよう慎重に取り出すこと。また、増幅産物の取扱い(電気泳動等)は避けること。
- 12) 蛍光目視判定は、酵素失活処理(80℃, 5 分間又は 95℃, 2 分間)後に行うこと。酵素失活処理を怠ると誤判定する可能性がある。
- 13) 紫外線照射装置を用いる際は、点灯中に紫外線ランプを直接見ないこと。必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけること。

【測定結果の判定法】

A. リアルタイム濁度検出を行う場合 (標準法)

陽性コントロール MTB(PC MTB)で濁度が上昇し、陰性コントロール溶液で濁度が上昇していないことを確認したうえで、下記に従い判定する。(図 1、2)

- 陽性：濁度の上昇が認められた場合
陰性：濁度の上昇が認められなかった場合

B. 蛍光目視検出を行う場合

判定は、紫外線照射装置を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して、反応チューブ側面より目を眼鏡等で保護した状態で観察して行う。陽性コントロール MTB(PC MTB)が緑色の蛍光を発生し、陰性コントロール溶液が蛍光を発生していないことを確認したうえで、下記に従い判定する。記録が必要な場合は、判定時にデジタルカメラ等を用いて画像として保存する。

- 陽性：緑色の蛍光を発生した場合
陰性：蛍光を発生しなかった場合

＜判定上の注意＞

- 1) コントロールの判定が異常な場合は再検査を実施する。
- 2) 本製品の最小検出感度は 0.38 ゲノム相当/テストである。判定の結果が陰性であっても、症状が持続し結核菌群感染が否定できない状況では再検査を実施する必要がある。
- 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とあわせて総合的に判断すること。
- 4) 比較的変異の少ない領域を選んでプライマーが設計されているが、結核菌群が今後この領域内で更に変異し、本製品での検出感度を低下させる可能性が考えられるため、判定が陰性であっても、疾患としての結核菌群感染を否定するものではない。
- 5) 本製品は定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではない。リアルタイム濁度測定装置における濁度の立ち上がり時間及び、蛍光目視検出における蛍光の強さでコピー数を特定することはできない。これらと検体のコピー数の間に相関はない。

【性能】

1. 感度・正確性

陰性管理検体(濃度 0 ゲノム相当/テスト)、陽性管理検体 1(濃度 1.875 ゲノム相当/テスト)及び陽性管理検体 2(濃度 125 ゲノム相当/テスト)を測定したとき、陰性管理検体は陰性に、陽性管理検体 1 及び 2 は陽性に判定される。

* 2. 同時再現性

陰性管理検体(濃度 0 ゲノム相当/テスト)、陽性管理検体 1 (濃度 1.875 ゲノム相当/テスト)及び陽性管理検体 2 (濃度 125 ゲノム相当/テスト)を 5 回同時に測定したとき、陰性管理検体はすべて陰性に、陽性管理検体はすべて陽性に判定される。

3. 最小検出感度

0.38 ゲノム相当/テスト

* 4. 相関性試験成績

1) 喀痰

前処理を行っていない喀痰検体、及び NALC-NaOH 等前処理を行った喀痰検体からの DNA 抽出液を用いた本製品による判定(以下、未処理喀痰 LAMP、処理喀痰 LAMP)と、既承認品の PCR 法キット及び TRC 法キットでの判定との相関を検討した。この結果、下表のとおり、未処理喀痰 LAMP 及び処理喀痰 LAMP と PCR 法との全体一致率は、それぞれ 91.5%(291/318)、92.1%(293/318)、TRC 法との全体一致率は、それぞれ 94.3%(230/244)、93.0%(227/244)と良好な相関が得られた⁹⁾。尚、リアルタイム濁度検出による判定結果と蛍光目視による判定結果は、1 検体を除きすべて一致した(結果に乖離が認められた 1 検体は血痰検体であり、血液による障害のため蛍光目視検出の結果が陰性となった)。そのため試験成績は、両者を区別せずリアルタイム濁度検出の結果を記載した。

			PCR 法		全体一致率
			陽性	陰性	
Loopamp [®] 結核菌群 検出試薬キット	未処理 喀痰	陽性	196	7	91.5% (291/318)
		陰性	20	95	
	処理済 喀痰	陽性	194	3	92.1% (293/318)
		陰性	22	99	

			TRC 法		全体一致率
			陽性	陰性	
Loopamp [®] 結核菌群 検出試薬キット	未処理 喀痰	陽性	163	5	94.3% (230/244)
		陰性	9	67	
	処理済 喀痰	陽性	157	2	93.0% (227/244)
		陰性	15	70	

2) 喀痰以外の生体由来検体

喀痰以外の生体由来検体 341 検体(気管支洗浄液等：162 検体、胸水：72 検体、胃液：70 検体、尿：7 検体、膿：5 検体、腹水：3 検体、髄液：3 検体、心のう液：2 検体、耳漏：2 検体、便：2 検体、静脈血：1 検体、胆汁：1 検体、関節液：1 検体、穿刺液類：6 検体、組織：4 検体)からの DNA 抽出液を用いた本製品による判定と、既承認品の PCR 法キット及び TRC 法キットでの判定との相関を検討した。

検体種	前処理検体 ^{*1}	未処理検体 ^{*2}	計
気管支洗浄液等 ^{*3}	149	13	162
胸水 ^{*4}	62	10	72
胃液	68	2	70
尿	7	—	7
膿	5	—	5
腹水	3	—	3
髄液	3	—	3
心のう液	2	—	2
耳漏	2	—	2
便	2	—	2
静脈血	1	—	1
胆汁	1	—	1
関節液	1	—	1
穿刺液類 ^{*5}	5	1	6
組織 ^{*6}	4	—	4
計 ^{*7}	315	26	341

※1. 結核菌検査指針 2007 記載の手法にて前処理を実施した検体。

※2. ※1 の手法にて前処理を実施していない検体。

※3. 気管支洗浄液/気管支肺胞洗浄液(BAL)、気管支ファイバースコープ(BF)洗浄液、鉗子+気管支洗浄液、鉗子洗浄液、鉗子洗浄液+ BAL を含む。

※4. 膿胸検体を含む。

※5. 甲状腺穿刺液、耳下腺穿刺液、開放創ガーゼ等を含む。

※6. 創部、肺生検、椎間板、脊椎カリエス検体等を含む。

※7. 上記 341 検体はすべて本製品及び PCR 法に、また、159 検体が TRC 法に供した。

この結果、下表のとおり、本製品と PCR 法との全体一致率は 98.8%(336/340)、TRC 法との全体一致率は 99.4%(158/159)と良好な相関が得られた。尚、リアルタイム濁度検出による判定結果と蛍光目視による判定結果に乖離例は認められなかった。

検体種	PCR 法		
	全体一致率	陽性一致率	陰性一致率
気管支洗浄液等	161/162	6/6	155/156 ^{*1}
胸水	71/72	2/2	69/70 ^{*2}
胃液	67/69	14/14	53/55 ^{*3}
尿	7/7	1/1	6/6
膿	5/5	－	5/5
腹水	3/3	－	3/3
髄液	3/3	－	3/3
心のう液	2/2	－	2/2
耳漏	2/2	－	2/2
便	2/2	－	2/2
静脈血	1/1	－	1/1
胆汁	1/1	－	1/1
関節液	1/1	－	1/1
穿刺液類	6/6	2/2	4/4
組織	4/4	－	4/4
計 (一致率)	336/340 ^{*4} (98.8%)	25/25 (100%)	311/315 (98.7%)

- ※1. 乖離検体 1 検体は、TRC 法未実施かつ培養検査にて結核菌陰性。
 ※2. 乖離検体 1 検体は、TRC 法及び培養検査共に結核菌陽性。
 ※3. 乖離検体 2 検体のうち、1 検体は TRC 法及び培養検査共に結核菌陽性。
 1 検体は培養検査にて結核菌陽性。
 ※4. 1 検体(胃液)は PCR 判定保留のため集計から除外。

検体種	TRC 法		
	全体一致率	陽性一致率	陰性一致率
気管支洗浄液等	87/87	1/1	86/86
胸水	21/21	1/1	20/20
胃液	45/46	14/14	31/32 ^{*1}
尿	4/4	1/1	3/3
膿	－	－	－
腹水	－	－	－
髄液	－	－	－
心のう液	－	－	－
耳漏	－	－	－
便	－	－	－
静脈血	－	－	－
胆汁	－	－	－
関節液	－	－	－
穿刺液類	1/1	1/1	－
組織	－	－	－
計 (一致率)	158/159 (99.4%)	18/18 (100%)	140/141 (99.3%)

- ※1. 乖離検体 1 検体は、培養検査にて結核菌陽性。
 3) 液体培養液、あるいは固形培地上で増殖したコロニーの菌懸濁液
 MGIT 液体培地培養液 63 検体、及び小川培地にて増殖したコロニーの菌懸濁液 84 検体(培養に供した検体の内訳は喀痰 82 検体、胃液 43 検体、気管支洗浄液等 10 検体、胸水 8 検体、尿 2 検体、穿刺液類 2 検体由来)からの DNA 抽出液を用いた本製品による判定と、既承認品の PCR 法キット及びイムノクロマト法キットでの判定との相関を検討した。この結果、下表のとおり、本製品と両法との全体一致率はいずれも 100% (147/147)と良好な相関が得られた。尚、リアルタイム濁度検出による判定結果と蛍光目視による判定結果に乖離例は認められなかった。

		PCR 法		全体一致率
		陽性	陰性	
Loopamp [®] 結核菌群 検出試薬キット	陽性	71	0	100% (147/147)
	陰性	0	76	

		イムノクロマト法		全体一致率
		陽性	陰性	
Loopamp [®] 結核菌群 検出試薬キット	陽性	71	0	100% (147/147)
	陰性	0	76	

5. 較正用基準物質に関する情報

本製品の性能は、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv(GenBank No.NC_000962)ゲノム DNA の DNA gyrase subunit B(*gyrB*)及び Insertion sequence IS6110(IS)領域を挿入したプラスミド DNA により確認している。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意

- 検体は感染の危険があるものとして注意して取り扱い、必要なバイオハザード対策⁶⁾を実施すること。
- 陽性コントロール MTB(PC MTB)及び陰性コントロール MTB(NC MTB)には、保存剤として微量のアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムには毒性があるので、目や口に入らないよう、また皮膚に付着させないよう注意すること。
- 試薬が誤って目や口、皮膚に付着したときは、直ちに大量の水で十分に洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けること。
- 蛍光目視判定時に紫外線照射装置を使用する場合、ランプより放射される紫外線(殺菌線)は有害で、点灯中のランプを短時間見つめただけでも後で目が痛くなり、結膜炎に似た症状を起こす場合があるので、紫外線を直接目に入れることは避けること。また、点灯中のランプを

見る必要があるときは、必ずガラス板を通すか、広幅の眼鏡又は防護面をかけて判定すること。

2. 使用上の注意

- 試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。凍結保存は品質維持のため避けること。
- 試薬の劣化を防止するために、使用時は必要な試薬だけをキットケースから取り出して使用すること。
- 検査環境へのコンタミネーションを避けるため、陽性コントロール MTB(PC MTB)は本添付文書に記載の操作方法以外での使用(希釈や検体等への添加等)は、絶対に行わないこと。
- 陽性コントロール MTB(PC MTB)及び陽性と疑われる検体等は、他の試薬と離して保管すること。
- 使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- 他のロットと組み合わせて使用しないこと。また、試薬の注ぎ足しは行わないこと。

(結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)の取扱い)

- 結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)は、反応チューブの蓋(リブの内側)に乾燥・保持されている。蓋に過度の衝撃を加えないように注意すること。また、蓋の内側を直接手で触らないように注意すること。
- 結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)は、湿気、熱及び光により劣化するので、必要本数(検体数+コントロール数)取り出した後、直ちに元のアルミパックに戻し、密封して保存すること。
- 結核菌群検出用乾燥試薬(dMTB)は、破損しやすいので、取扱いには注意すること。使用する前にキズ・ヒビ等が無いことを目視で確認すること。反応チューブにキズ・ヒビがあると正しく測定できないばかりか、チューブの破損により装置を汚染する可能性がある。
- 紫外線照射による変色等で誤った結果をもたらす場合があるので、紫外線照射による滅菌はしないこと。

3. 廃棄上の注意

- 反応後のチューブは蓋を開けずに、焼却処理又は密閉できるビニールの袋を二重に施し医療廃棄物として処理する。増幅産物の飛散防止のため、**廃棄の際にオートクレープ処理は行わないこと。**
- 反応チューブ、構成試薬チューブ及び陽性コントロール用スポイトはポリプロピレン(PP)、反応チューブ用トレイは PET、アルミパックはアルミ、キットケースは紙を主な材質としている。
- 試料(検体)に接触した器具や廃液等の処理や、検体が飛散した場合の対処等は、「結核菌検査に関するバイオセーフティマニュアルー2005 年ー第 2 版」(日本結核病学会・日本臨床微生物学会・日本臨床衛生検査技師会)等に従い、各施設の責任において実施すること。
- 使用後の試薬や容器及び器具類は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。
- 未使用の試薬についても、使用後の試薬と同様に廃棄処理を行うこと。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 : 室温保存

有効期間 : 15 ヶ月間

【包装単位】

製 品 名	包装単位	製品コード
Loopamp [®] 結核菌群検出試薬キット	48 テスト分	LMP520
	96 テスト分	LMP521

*【主要文献】

- Notomi T., et al.: Nucleic Acids Research, 28(12) : e63, 2000.
- Nagamine K., et al.: Clin. Chem, 47(9) : 1742-1743, 2001.
- Mori Y., et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun, 289(1) : 150-154, 2001.
- Tomita N., et al.: Nat Protoc, 3(5) : 877-882, 2008.
- Mitarai S., et al.: Int J Tuberc Lung Dis, 15(9) : 1211-1217, 2011.
- 日本細菌学会バイオセーフティ委員会：日本細菌学雑誌, 54(3) : 667-715, 1999.

【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口
 フリーダイヤル ☎0120-308-421

【製造販売業者の名称及び住所】

栄研化学株式会社
 〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地

製造販売元  **栄研化学株式会社 (EKN)**
 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地