

クラスⅢ免疫検査用シリーズ マイコバクテリウム核酸キット

Simprova® 抗酸菌症パネル

【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。
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. 使用する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）】

1. テストチップ……………12枚

構成製品	構成試薬	成分
MTB	結核菌群検出試薬 (dfMTB)	結核菌群特異的プライマー-FIP-1 (MTBFIP-1)、結核菌群特異的プライマー-FIP-2 (MTBFIP-2)、結核菌群特異的プライマー-F3-1 (MTBF3-1)、結核菌群特異的プライマー-F3-2 (MTBF3-2)、結核菌群特異的プライマー-BIP-1 (MTBBIP-1)、結核菌群特異的プライマー-BIP-2 (MTBBIP-2)、結核菌群特異的プライマー-B3-1 (MTBB3-1)、結核菌群特異的プライマー-B3-2 (MTBB3-2)、結核菌群特異的プライマー-LoopF-1 (MTBLF-1)、結核菌群特異的プライマー-LoopF-2 (MTBLF-2)、結核菌群特異的プライマー-LoopB-1 (MTBLB-1)、結核菌群特異的プライマー-LoopB-2 (MTBLB-2)、結核菌群特異的プローブ-1 (MTBQP-1)、結核菌群特異的プローブ-2 (MTBQP-2)、鎖置換型 DNA 合成酵素 ^{※1} (Bst)、デオキシアデノシン 5'-3' リン酸 (dATP)、デオキシチジン 5'-3' リン酸 (dCTP)、デオキシグアノシン 5'-3' リン酸 (dGTP)、デオキシチミジン 5'-3' リン酸 (dTTP)、硫酸マグネシウム (MgSO ₄)
MAI	<i>M. avium</i> 検出試薬 (dfMAV)	<i>M. avium</i> 特異的プライマー-FIP (MAVFIP)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-F3 (MACF3)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-F4 (MACF4)、 <i>M. avium</i> 特異的プライマー-BIP (MAVBIP)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-B3 (MACB3)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-B4 (MACB4)、 <i>M. avium</i> 特異的プライマー-LoopF (MAVLF)、 <i>M. avium</i> 特異的プライマー-LoopB (MAVLB)、 <i>M. avium</i> 特異的プローブ (MAVQP)、鎖置換型 DNA 合成酵素 ^{※1} (Bst)、デオキシアデノシン 5'-3' リン酸 (dATP)、デオキシチジン 5'-3' リン酸 (dCTP)、デオキシグアノシン 5'-3' リン酸 (dGTP)、デオキシチミジン 5'-3' リン酸 (dTTP)、硫酸マグネシウム (MgSO ₄)
	<i>M. intracellulare</i> 検出試薬 (dfMIN)	<i>M. intracellulare</i> 特異的プライマー-FIP (MINFIP)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-F3 (MACF3)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-F4 (MACF4)、 <i>M. intracellulare</i> 特異的プライマー-BIP (MINBIP)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-B3 (MACB3)、 <i>M. avium</i> complex 特異的プライマー-B4 (MACB4)、 <i>M. intracellulare</i> 特異的プライマー-LoopF (MINLF)、 <i>M. intracellulare</i> 特異的プライマー-LoopB (MINLB)、 <i>M. intracellulare</i> 特異的プローブ (MINQP)、鎖置換型 DNA 合成酵素 ^{※1} (Bst)、デオキシアデノシン 5'-3' リン酸 (dATP)、デオキシチジン 5'-3' リン酸 (dCTP)、デオキシグアノシン 5'-3' リン酸 (dGTP)、デオキシチミジン 5'-3' リン酸 (dTTP)、硫酸マグネシウム (MgSO ₄)

※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。

【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、*Mycobacterium avium* DNA 及び *Mycobacterium intracellulare* DNA の検出（結核菌群、*M. avium* 及び *M. intracellulare* 感染の診断補助）

*【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。^{1),2)}

本製品のプライマー及びプローブは、結核菌群ゲノム DNA の *gyrB* 領域及び IS6110 領域、*M. avium* ゲノム DNA の ITS 及び 23S rRNA 領域、*M. intracellulare* ゲノム DNA の ITS 及び 23S rRNA 領域に設計している。

はじめに、DNA 分離用試薬を用いて検体中の DNA を抽出し、サンプル溶液を調製する。このサンプル溶液をテストチップに注入することで、鎖置換型 DNA 合成酵素、デオキシヌクレオチド 3 リン酸、各検出試薬の特異的プライマー及びプローブを含む乾燥試薬を溶解する。試薬溶解後に所定の温度でインキュベートすると、サンプル溶液中の対象ゲノム DNA から鎖置換型 DNA 合成酵素により核酸増幅反応が進行する。

核酸増幅の検出は、核酸増幅産物と蛍光標識された特異的プローブが結合することによって生じる蛍光の減少を測定して行う。

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、「抗酸菌検査ガイド 2020」³⁾ に記載されている方法で採取すること。

* (2) 採取した検体は速やかに測定し、やむを得ず検体を保存する場合は、「抗酸菌検査ガイド 2020」³⁾ に記載されている方法で保存すること。

(3) 検体採取の際に発生するエアロゾルによって、鋳型 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。

* 3) 検体の輸送方法

検体は、「抗酸菌検査ガイド 2020」³⁾ に記載されている方法で輸送する。

4) 検体の調製方法

Simprova Extraction Kit / S2（栄研化学別売品）に同梱されている S2 前処理液入りチューブに検体 500 µL を添加し、検体が溶解されるまでボルテックスミキサーで攪拌する。5 分間静置後、1,000 µL を使用する。

2. 妨害物質・妨害薬剤・交差反応性

遊離型ビリルビン（100 mg/dL）、抱合型ビリルビン（100 mg/dL）、乳び（ホルマジン濁度 7,250 度）及び溶血ヘモグロビン（3,000 mg/dL）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（0.1 mg/mL）、エタンブートール（0.1 mg/mL）、リファンピシン（0.1 mg/mL）、ピラジナミド（0.5 mg/mL）、カナマイシン（0.1 mg/mL）、ストレプトマイシン（0.5 mg/mL）、クラリスロマイシン（0.1 mg/mL）による影響は、社内で検討した結果認められなかった。

Mycobacterium tuberculosis, *M. avium*, *M. intracellulare*について各ゲノム DNA を 3.5 ng/テスト以上（ 6.1×10^5 ゲノム相当以上）用いて測定したところ、各構成試薬の目的菌以外での交差反応は認められなかった。

他の非結核性抗酸菌及び呼吸器疾患原因菌について各ゲノム DNA を 3.5 ng/テスト以上（ 4.3×10^5 ゲノム相当以上）用いて測定したところ、次の表の菌についてすべての構成試薬で陰性であり、目的菌以外での交差反応は認められなかった。

他の非結核性抗酸菌	呼吸器疾患原因菌
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Mycobacterium simiae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium szulgai</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Mycobacterium goodii</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Mycobacterium xenopi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Mycobacterium gastri</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Mycobacterium mageritense</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	
<i>Mycobacterium flavescens</i>	
<i>Mycobacterium abscessus</i>	
<i>Mycobacterium goodii</i>	

3. 結核菌群、*M. avium*、*M. intracellulare* 反応性

結核菌群 3 菌株（*M. tuberculosis* 2 菌株、*Mycobacterium bovis* 1 菌株（900 fg:930 ゲノム相当/テスト））、*M. avium* 5 菌株（700 fg:660 ゲノム相当/テスト）及び *M. intracellulare* 7 菌株（700 fg:610 ゲノム相当/テスト）をすべて検出した。

4. その他

本製品は、全自動核酸検査装置 Simprova 専用試薬である。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製

テストチップは、使用直前にアルミパウチから取り出し、そのまま使用する。冷蔵保存していた場合は、室内温度に戻ったことを確認してから開封し、使用する。

2. 必要な器具・器材・試薬等

- 1) ピペット（100～1,000 μ L）
- 2) フィルター付き広口（ワイドボア）チップ（1,000 μ L）
- 3) ボルテックスミキサー
- 4) Simprova Extraction Kit / S2（Extraction Tube, S2 前処理液含む）（栄研化学別売品）
- 5) 全自動核酸検査装置 Simprova

3. サンプル溶液の調製（DNA 抽出溶液の調製）

全自動核酸検査装置 Simprova の添付文書及び取扱説明書、Simprova Extraction Kit / S2 の使用説明書を参照すること。

4. 測定（操作）方法

本製品は、全自動核酸検査装置 Simprova を用いて測定を行う。

- 1) 測定に必要な情報を全自動核酸検査装置 Simprova に入力する。
画面上の検体種の欄から「Sputum」を選択する。又、テストパネルの欄から「MTB / MAI (M1)」を選択する。
- 2) Simprova Extraction Kit / S2 の Extraction Cartridge S2 及びテストチップ

を全自動核酸検査装置 Simprova の画面に従って所定の位置にセットする。

- 3) S2 前処理液による前処理済み検体 1,000 μ L を添加した Extraction Tube は、Tube Cap を取り付け付けた後、全自動核酸検査装置 Simprova の所定の位置にセットする。
 - 4) Tube Cap を取り外し、廃棄する。
 - 5) 測定を開始する。
 - 6) 温度 63 $^{\circ}$ C でインキュベートされ、測定波長 500～570 nm での蛍光値変化が測定される。反応時間は 17 分（抽出時間を除く）である。
 - 7) 測定終了後、自動で判定結果が表示される。
- 上記 5)～7)は全自動核酸検査装置 Simprova にて自動的に行われる。

＜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、標的遺伝子や増幅産物が極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、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（DNase, RNase）のコンタミネーションを避けること。
- 3) 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使用を避けること。
- 4) テストチップをアルミパウチから取り出してから 15 分以内に測定を開始すること。これ以上時間が経過すると、正確な測定結果が得られなくなることがある。
- 5) テストチップは、全自動核酸検査装置 Simprova の所定の位置に正しくセットすること。正常とは異なる向きや傾いた状態でセットされた場合、正しく測定できないばかりか、テストチップの破損により装置を汚染することがある。
- 6) 遺伝子検査の知識や経験を持たない場合、DNA 分離用試薬での抽出操作は検査結果に影響を与える危険性がありうるので、遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導のもとで実施すること。

【測定結果の判定法】

測定結果は全自動核酸検査装置 Simprova により自動的に判定され、陽性は「Positive」、陰性は「Negative」と測定画面上に表示される。測定に異常があった場合は判定無効となり「Invalid」と表示される。

＜判定上の注意＞

- 1) 本製品の最小検出感度は 11.3 コピー/テスト（dfMTB）、6.6 コピー/テスト（dfMAV）、10.9 コピー/テスト（dfMIN）である。判定の結果が陰性であっても、症状が持続し対象菌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。
- 2) 各検出試薬は、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、対象菌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、疾患としての対象菌感染を否定するものではない。
- 3) 「Invalid」と表示された場合、その測定は無効となる。検体の調製から再度行う必要がある。

【性能】

1. 感度・正確性

管理検体を測定したとき、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

管理検体を 3 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 1 及び 2 はすべて陽性に判定される。

3. 最小検出感度

dfMTB 11.3 コピー/テスト
dfMAV 6.6 コピー/テスト
dfMIN 10.9 コピー/テスト

4. 相関性試験成績⁴⁾

1) MTB

他法との相関（結核菌群ゲノム DNA の検出）

		既承認品		
		+	－	計
本製品	+	146	31	177
	－	4	369	373
	計	150	400	550

陽性一致率：97.3 % (146/150)

陰性一致率：92.3 % (369/400)

全体一致率：93.6 % (515/550)

2) MAI

他法との相関（*M. avium* ゲノム DNA の検出）

		既承認品		
		+	－	計
本製品	+	113	12	125
	－	8	417	425
	計	121	429	550

陽性一致率：93.4 % (113/121)

陰性一致率：97.2 % (417/429)

全体一致率：96.4 % (530/550)

他法との相関（*M. intracellulare* ゲノム DNA の検出）

		既承認品		
		+	－	計
本製品	+	68	2	70
	－	4	476	480
	計	72	478	550

陽性一致率：94.4 % (68/72)

陰性一致率：99.6 % (476/478)

全体一致率：98.9 % (544/550)

臨床検体 550 例の検体種は、喀痰 331 例、胃液 71 例、穿刺液 61 例、汚物ガーゼ 2 例、尿 1 例、組織 2 例、気管支洗浄液（BAL）22 例、液体培養液 34 例、菌懸濁液 26 例であった。結核菌群ゲノム DNA の検出において乖離した 35 例、*M. avium* ゲノム DNA の検出において乖離した 20 例、及び *M. intracellulare* ゲノム DNA の検出において乖離した 6 例は、検体中の菌量が極端に少なく、サンプリング差によって感度以下となったためと考える。

5. 校正用基準物質に関する情報

本製品の性能は、結核菌群ゲノム DNA の *gyrB* 領域及び IS6110 領域、*M. avium* ゲノム DNA の ITS 及び 23S rRNA 領域、*M. intracellulare* ゲノム DNA の ITS 及び 23S rRNA 領域を挿入した各プラスミド 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⁵⁾を実施すること。
- 感染を避けるため、検査時は使い捨て手袋を着用すること。
- 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。
- アルミパウチを開封するときは、手を切らないように注意すること。

2. 使用上の注意

- 本製品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。
- 使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- 検体の調製が終わり、測定の前準備が完了するまで、テストチップはアルミパウチから取り出さないこと。
- テストチップは光学測定に使用するため、テストチップ表面に傷や汚れが付着しないようにすること。
- テストチップ表面の 2 次元コードは汚したり、傷を付けたりしないこと。
- 使用する前にテストチップにキズ・ヒビ等が無いことを目視で確認すること。テストチップにキズ・ヒビがあると正しく測定できないばかりか、テストチップの破損により装置を汚染することがある。
- 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

- 測定終了後のテストチップは、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用廃棄物として処理すること。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。**
- テストチップの容器はスチール、チップケースインナーはポリプロピレン（PP）、アルミパウチはポリエチレン（PE）及びアルミ、キットケースは紙を主な材質としている。
- 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：2～30℃

有効期間：12 ヶ月間

【包装単位】

製品名	識別記号	包装単位	製品コード
Simprova 抗酸菌症パネル MTB, MAI	M1	12 テスト分	SIM003

【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.
- * 3) 日本結核・非結核性抗酸菌症学会編：抗酸菌検査ガイド 2020, 2020
- 社内資料
- 日本細菌学会編：病原体等安全取扱・管理指針, 2008.

Simprova は栄研化学株式会社の登録商標です

【問合せ先】

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**
栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地