

差反応は認められませんでした (10⁵ CFU 相当以上/テスト)。

同定対象外抗酸菌: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium conceptionense*, *Mycobacterium houstonense*, *Mycobacterium salmoniphilum*, *Mycobacterium senegalense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium scrofulaceum*

- (2) 抗酸菌以外の細菌 7 菌種との交差反応は認められませんでした (菌液濃度: 10⁵ CFU 相当以上/テスト)。細菌: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nocardia asteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*

4. コンタミネーションの防止法

本品は PCR ミックスに UNG (ウラシル-N-グリコシラーゼ) と dUTP が含まれているため、本品にて合成された PCR 産物のコンタミネーションによる偽陽性を抑制することができます。しかし、多量のコンタミネーションや、検体間及び抽出した DNA のコンタミネーションによる偽陽性は抑制することができませんので、コンタミネーションの主因となるピペット操作時のエアロゾルの飛散や器具・実験台からの汚染を最小限にするために、以下 (1) ~ (4) を行ってください。

- (1) 「DNA 抽出」、「増幅試薬の分注」、「抽出 DNA の添加」、「増幅〜検出」は、それぞれ別の区域で実施してください。以下のように区域を定義します。

区域 1 : DNA 抽出 (必ず安全キャビネット内で行ってください。)

区域 2 : 増幅試薬の分注

区域 3 : 抽出 DNA の添加

区域 4 : 増幅〜検出

- (2) マイクロピペット及びチップは区域ごとに用意してください。
(3) チップはフィルター付きのものを使用してください。
(4) 使用器具及び実験台が測定試料や抽出 DNA で汚染された可能性がある場合、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液による拭き取りや清掃を行ってください。

5. PCR 法

- (1) PCR 装置を用いて増幅を行ってください。
(2) 必ず PCR 装置に適合した PCR チューブを使用してください。
(3) 試薬や反応液は、タッピング (指でチューブの下部底をたたいて混ぜること) 又はピペッティング、ボルテックス等により、十分に混和してください。その後、蓋に試薬や反応液が付着した場合は小型卓上遠心機を用いてスピンドアウンを行ってください。
(4) 増幅試薬は完全に融解させてから使用してください。特に PCR ミックスは融解後に白色の沈殿が生じることがありますが、沈殿が完全に消失するまで上記 (3) に記載の条件で混和してから使用してください。
(5) 増幅試薬及び DNA 抽出後のチューブの蓋を開封する前に、小型卓上遠心機を用いてスピンドアウンを行ってください。

6. 検出

- (1) 検出試薬及び PCR 産物は室温に戻してから使用してください。
(2) PCR 産物を凍結保存した場合は、室温で融解した後、上記 (3) の条件で混和してから使用してください。
(3) PCR 産物が入った PCR チューブの蓋に反応液の付着を認めた場合、開封する前にスピンドアウンを行ってください。また開封の際は、PCR 産物が飛散しないよう静かに行ってください。
(4) 判定時間 (10 分) を遵守してください。

【用法・用量 (操作方法)】

1. 試薬の調製法

(1) 増幅試薬

PCR ミックス及びプライマーミックスは、室温にて静置し融解してください。試薬を混和した後、そのまま使用してください。

(2) 検出試薬

展開バッファー及びテストストリップは、室温にて使用してください。

2. 必要な器具・機材・試料等

区域 1 : DNA 抽出

- (1) 98℃ で加熱ができる装置 (PCR 装置、ヒートブロック等)
(2) 滅菌済み PCR チューブ又は滅菌済み 1.5 mL チューブ (ヒートブロックを使用する場合)
(3) マイクロピペット (80 µL、20 µL 分取用)
(4) 滅菌済みチップ (フィルター付き)

区域 2 : 増幅試薬の分注

- (1) 滅菌済み PCR チューブ
(2) マイクロピペット (5 µL、10 µL 分取用)
(3) 滅菌済みチップ (フィルター付き)
(4) 小型卓上遠心機 (スピンドアウン用)

区域 3 : 抽出 DNA の添加

- (1) マイクロピペット (5 µL 分取用)
(2) 滅菌済みチップ (フィルター付き)

区域 4 : 増幅〜同定

- (1) PCR 装置
(2) マイクロピペット (70 µL 分取用)
(3) 滅菌済みチップ (フィルター付き)

3. 操作方法

(1) DNA 抽出法 (区域 1)

抗酸菌検査ガイド 2020 に記載の方法¹で培養を行った McFarland No. 1 程度の培養液 20 µL から「KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent」を用いて DNA を抽出します。操作方は「KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent」の取扱説明書に従ってください。以下に示す培地が本品の検出結果に影響を与えないことを確認しています。培地: 極東 マイコアシッド、マイコプロス、ミジット分離培養剤

(2) 遺伝子増幅法 (区域 2 ~ 4)

- 1) PCR チューブに PCR ミックスを 10 µL、プライマーミックスを 5 µL 添加します (区域 2)。
2) 抽出 DNA を 5 µL 添加し、混和します (区域 3)。
3) PCR 装置にセットし以下のプログラムを行います (区域 4)。
- | | |
|------------|-------------|
| 25℃・5 min | } 35 cycles |
| 94℃・1 min | |
| 94℃・5 sec | |
| 67℃・10 sec | |
| 72℃・15 sec | |

(3) 検出 (区域 4)

- 本工程は付属する判定補助台紙の上にテストストリップをセットして行ってください。テストストリップを判定補助台紙上のイラストに合わせてセットし、以下の操作を行ってください。
1) 反応後の PCR 産物 5 µL をテストストリップのサンプルパッド部 (「◀◀Sample」の矢印方向の白色部) に添加します。
2) 展開バッファー 70 µL をテストストリップのサンプルパッド部に添加し、展開します。
3) 15~30℃ の条件下で 10 分間静置します。
4) テストストリップ上のライン着色の有無を目視判定します。
5) テストストリップと判定補助台紙は単回使用ですので、一度使用したものを再度使用しないでください。

【測定結果の判定法】

テストストリップの判定部に現れるピンク～赤紫色のラインを目視で判定します。C と T1 の間、T2 と T3 の間、T4 と T5 の間には、判定補助線（点線）が設置されています（図 1）。テストラインの着色位置から MABC 亜種同定と *erm(41)* 遺伝子型の判定を行います。テストラインにピンク～赤紫色のラインが確認できない場合は、陰性と判定します。テストラインの判定法は以下の通りです。

1. *erm(41)* 遺伝子型の判定：T1 ラインが着色した場合 *erm(41)* T28C 変異株と、T2 ラインが着色した場合 *erm(41)* FL 株と判定します。
2. MABC 亜種の判定：T3 ラインが着色した場合 BOL 陽性と、T4 ラインの場合 ABS 陽性と、T5 ラインの場合 MAS 陽性と判定します。典型的な着色パターンは図 2 の通りです。

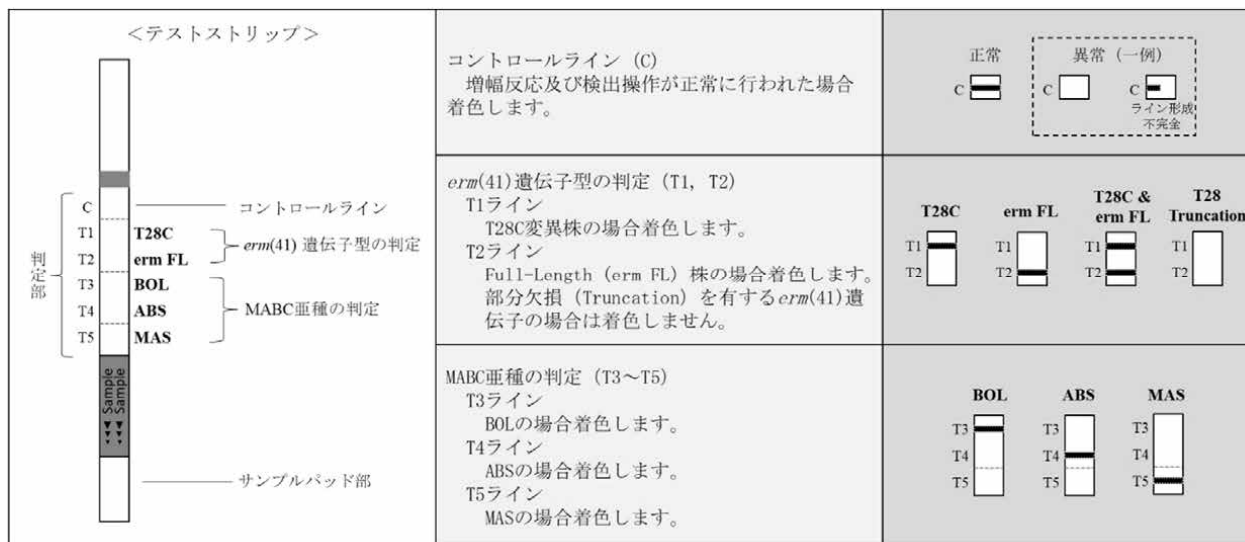


図 1. テストストリップと各ラインの構成

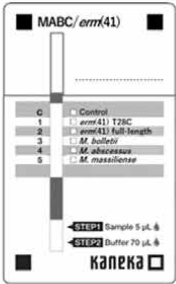
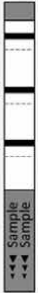
ライン着色	コントロール		C	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
	<i>erm(41)</i> 遺伝子型	T28C	T1	陽性	陰性	陰性	陰性	陰性
		erm FL	T2	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性
	亜種	BOL	T3	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性
		ABS	T4	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性
		MAS	T5	陰性	陰性	陰性	陽性	陰性
<判定補助台紙>				C+T1, 2, 4	C+T2, 4	C+T2, 3	C+T5	Cのみ
								
判定結果				T28C erm FL ABS	erm FL ABS	erm FL BOL	MAS	MABC 陰性

図 2. 典型的な判定例

（判定上の注意）

1. 図 2 に示す以外の着色パターンが確認された場合は、複数菌種が混在している可能性があります。その場合は、固形培地上で分離した菌体を検体として、再測定を行ってください。
2. 再測定において 1 と同様の非典型的の結果が得られた場合は、シーケンス法など他の方法で確認してください。
3. コントロールラインの着色が確認できない又はライン形成が不完全な場合、またはテストラインのライン形成が不完全な場合は同定不能とし再測定を行ってください。
4. 検体に含まれる菌量が少ない場合、又は過剰な場合正確に検出されない場合があります。McFarland No. 1 程度の培養液を検体として使用してください。

【臨床的意義】

MABC は、亜種や *erm(41)* 遺伝子のタイプによりマクロライド系抗菌薬に対する感受性が異なる傾向があるため、米国胸部学会や欧州呼吸器学会等による非結核性抗酸菌症の診療ガイドライン²では MABC の亜種及び誘導耐性の有無に関わる *erm(41)* 遺伝子のタイプを検査することが推奨されており、これは MABC 症患者の治療方針決定のため重要です。しかし、マクロライド系抗菌薬に対する感受性の評価のためには、分離培養後さらに 14 日間の感受性試験が必要でした。

本品は、Multiplex-PCR 法と核酸クロマトグラフィーの原理に基づき、分離培養検体から、MABC 3 亜種の同定と、*erm(41)* 遺伝子が活性型か否かを判定する検査キットです。本品は、MABC 症患者に対する治療方針を決定するための情報を、従来よりも早期に取得することが

でき、MABC 症の診断補助に有用です。

（臨床性能試験成績）

日本国内で分離された菌株の培養液を検体として、本品による試験とシークエンス解析（対照法 1）、及びクラリスロマイシン（以下 CAM）に対する薬剤感受性試験（対照法 2）を実施し、同等性確認試験を行った結果は以下の通りです。尚、対照法 1 における亜種同定は Yoshida et al., 2021 に記載の方法³により実施し、対照法 2 は Clinical and Laboratory Standards Institute M24 3rd edition（以下 CLSI 法）⁴に従い実施しました。

1. 同等性確認試験（対照法 1）

		シークエンス解析		合計
		T28C変異型	T28C変異型以外	
本品	T28C 陽性	22	3 ^{※2}	25
	T28C 陰性	1 ^{※1}	191	192
合計		23	194	217

陽性一致率 95.7% 陰性一致率 98.5% 全体一致率 98.2%

※ 1. シークエンス解析より、本申請品の T28C プライマーセットの結合部位に変異を有する T28C 株であることが確認されました。

※ 2. シークエンス解析より、本申請品の T28C プライマーセットの結合部位を有する T28 株であることが確認されました。

		シークエンス解析		合計
		Full-length	Full-length以外	
本品	erm FL陽性	114	0	114
	erm FL陰性	0	103	103
合計		114	103	217

陽性一致率 100% 陰性一致率 100% 全体一致率 100%

		シークエンス解析		合計
		BOL	BOL以外	
本品	BOL陽性	5	2 ^{※3}	7
	BOL陰性	0	210	210
合計		5	212	217

陽性一致率 100% 陰性一致率 99.1% 全体一致率 99.1%

※ 3. シークエンス解析より、本申請品の BOL プライマーセットの結合部位の類似配列を有する ABS であることが確認されました。

		シークエンス解析		合計
		ABS	ABS以外	
本品	ABS陽性	108	0	108
	ABS陰性	1 ^{※4}	108	109
合計		109	108	217

陽性一致率 99.1% 陰性一致率 100% 全体一致率 99.5%

※ 4. シークエンス解析より、本申請品の ABS プライマーセットの結合部位に変異を有する ABS であることが確認されました。

		シークエンス解析		合計
		MAS	MAS以外	
本品	MAS陽性	93	0	93
	MAS陰性	1 ^{※5}	123	124
合計		94	123	217

陽性一致率 98.9% 陰性一致率 100% 全体一致率 99.5%

※ 5. シークエンス解析より、本申請品の MAS プライマーセットの結合部位に変異を有する MAS であることが確認されました。

2. 同等性確認試験（対照法 2）

CLSI 法に準拠した CAM に対する薬剤感受性試験において、CAM 低感受性と判定された菌株の内、92.4% (85/92) が本品により「erm FL 陽性かつ T28C 陰性」と判定されました。また同様に、CAM 感受性と判定された菌株の内、95.5% (106/111) が本品により「erm FL 陰性又は T28C 陽性」と判定されました。

		薬剤感受性試験		合計
		CAM低感受性	CAM感受性	
本品	erm FL陽性かつ T28C陰性	85	5 ^{※7}	90
	erm FL陰性又は T28C陽性	7 ^{※6}	106	113
合計		92	111	203

陽性一致率 92.4% 陰性一致率 95.5% 全体一致率 94.1%

※ 6. シークエンス解析より、内 4 株 *ml* 遺伝子変異が確認された T28C 株でした。また、内 2 株は本申請品において T28C 陽性と判定された T28 株でした。残り 1 株は *erm*(41) 遺伝子や *ml* 遺伝子のジェノタイプとは異なる機構により CAM 低感受性を示した株と考えられます。

※ 7. シークエンス解析より、内 1 株は本申請品において T28C 陰性と判定された T28C 株でした。残り 4 株は *erm*(41)遺伝子や *ml* 遺伝子のジェノタイプとは異なる機構により CAM 感受性を示した株であると考えられます。

【性能】

1. 性能

本文に記載の操作方法に従い、管理検体を用いて、感度、正確性、同時再現性試験を行った際、下記の規格に適合します。

（1）感度試験

各陽性管理検体を検体とする時、対応するテストラインとコントロールラインが着色する。

（2）正確性試験

各陽性管理検体及び陰性管理検体を検体とする時、陽性管理検体では対応する項目について陽性判定となり、陰性管理検体は陰性判定となる。

（3）同時再現性試験

各陽性管理検体及び陰性管理検体を検体として 2 回繰り返し試験する時、それぞれが正確性試験と同一の判定結果を示す。

2. 最小検出感度

各陽性管理検体及びその希釈検体を用いて、最小検出感度を評価する時、6×10³ コピー/テストです。

3. 校正用基準物質

陽性管理検体：各標的領域の塩基配列を含む合成 DNA（1.2×10³ コピー/μL）

陰性管理検体：滅菌蒸留水

【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）本品を使用する際、必ず保護着、マスク、保護メガネ、手袋等を着用し、試薬、反応液、検体、PCR 産物等が目や皮膚、粘膜に触れないように注意してください。万が一、このようなことが起きた場合は、大量の水で十分に洗い流し、必要に応じて医師の診察を受けてください。

（2）本品の使用に際しては、ウイルス・細菌検査に習熟した人の指導のもとに検査を実施してください。

（3）高温のインキュベーターや PCR 装置には直接触れないよう注意してください。

（4）テストストリップにはニトロセルロースが含まれます。ニトロセルロースは極めて燃焼性が高いため、火気の近くで操作を行わないでください。

2. 使用上の注意

（1）本品と他の試薬を組合せて使用しないでください。

（2）増幅試薬は貯蔵方法に従い保存してください。凍結した試薬は完全に融解したことを確認の上で、使用してください。融解時に沈殿物が確認されることがありますが、品質には問題ありません。使用後はすみやかに貯蔵方法に従い保存してください。

（3）検出試薬は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。凍結させた試薬は、品質が劣化して正しい結果が得られないことがありますので、使用しないでください。

（4）テストストリップは高湿度の環境に放置すると品質が劣化しますので、使用直前に容器から取り出し、すみやかに使用してください。開封後は容器の蓋をしっかりと締めてください。

（5）テストストリップの下部（サンプルパッド部）に触れないでください。

（6）有効期間を過ぎたキットは使用しないでください。

(7) 検査結果の取り違えに注意してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) DNA 抽出時の培養液、菌体が接触した器具等は感染の危険がありますので、高圧蒸気滅菌（121℃、30 分間以上）後、適切な処置を行い廃棄してください。
- (2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、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い、処理してください。
- (3) 使用後の廃棄方法については、各自治体の医療系産業廃棄物又は医療系一般廃棄物並びに産業廃棄物・一般廃棄物の区分けが異なる為、各自治体の指示に従い廃棄してください。
- (4) 反応後の PCR 産物の残余は、汚染のリスクを低減するためオートクレープ処理は行わずに廃棄してください。

【貯蔵方法・有効期間】

増幅試薬

1. 貯蔵方法 -10℃以下
2. 有効期間 13か月

検出試薬

1. 貯蔵方法 2～30℃
2. 有効期間 13か月

※高温多湿・直射日光を避け保管してください。

【包装単位】

品名	包装
カネカ 核酸クロマト MABC/erm(41) 増幅試薬	20テスト用
カネカ 核酸クロマト MABC/erm(41) 検出試薬	20テスト用

【別売品】

製品コード	品名	包装
KN-T14CK07	KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent	20テスト用

【主要文献】

1. 日本結核・非結核性抗酸菌症学会 編. 抗酸菌検査ガイド2020. 南江堂,2020, p. 55-56.
2. Daley, CL, Iaccarino, JM, Lange, C et al., Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline. Clin Infect Dis. 4;71(4):905-913 (2020).
3. Yoshida, M, Chien, JY, Hoshino, Y et al., A Novel DNA Chromatography Method to Discriminate Mycobacterium abscessus subspecies and Macrolide Susceptibility, EBioMedicine. 64:103187 (2021).
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia spp., and Other Aerobic Actinomycetes. M24, 3rd ed. (2018)

【問い合わせ先】

株式会社カネカ お問い合わせ窓口

電話番号 : 06-6226-5256

Mail : kaneka_ivd_team@kaneka.co.jp

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

株式会社カネカ

〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島 2-3-18