

** この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください。

マイコプラズマ核酸キット

マイコプラズマ rRNA 検出試薬
TRCReady® MP

【全般的な注意】

1. 本キットは自動遺伝子検査装置 TRCReady®-80（品番 0023950、以下 TRCReady®-80）の専用試薬です。
2. 本キットは体外診断用医薬品ですので、それ以外の目的には使用しないでください。
3. 臨床診断は他の関連する検査結果や臨床症状などに基づいて総合的に判断してください。本キットで陰性と判定された場合であってもマイコプラズマニューモニエの感染を完全に否定できるものではありません。
- ** 4. 電子化された添付文書以外の使用方法については、測定結果の信頼性を保証いたしません。
5. 本キットにはヒト由来成分は含まれていませんが、検体やサンプル及びそれらが接触した容器などは感染性があるものとして取扱ってください。
- ** 6. 使用する機器の電子化された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。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. ④ **反応試薬**
 - (1) 本あたりグアノシン三リン酸 24 µg、イノシン三リン酸 48 µg を含有)
 - (1) デオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP)
 - (2) ヌクレオシド三リン酸 (NTP: グアノシン三リン酸を含有)
 - (3) イノシン三リン酸 (ITP)
 - (4) マイコプラズマニューモニエ rRNA プロモータープライマー MP-F-1
 - (5) マイコプラズマニューモニエ rRNA アンチセンスプライマー MP-R-1
 - (6) 蛍光標識マイコプラズマニューモニエ rRNA 検出用プローブ MP-P-1
 - (7) 逆転写酵素
 - (8) RNA ポリメラーゼ
2. 開始液
3. 陽性コントロール
4. 陰性コントロール

【使用目的】

咽頭拭い液または喀痰からのマイコプラズマニューモニエ rRNA の検出（マイコプラズマ肺炎感染症の診断補助）

【測定原理】

1. 測定原理

本キットは、インターカレーター性蛍光色素が標識された DNA プローブと一定温度 RNA 増幅法を組み合わせ、RNA を 1 ステップで増幅・リアルタイム検出する TRC (Transcription Reverse-transcription Concerted reaction) 法^{1) 2) 3)}を原理とした核酸増幅検査キットです。本キット中に含まれるマイコプラズマニューモニエ rRNA プロモータープライマー及びマイコプラズマニューモニエ rRNA アンチセンスプライマーがマイコプラズマニューモニエ rRNA に結合すると、酵素（逆転写酵素、RNA ポリメラーゼ）が基質類（dNTP、NTP、ITP）を用いて転写、逆転写反応などを行い、RNA が増幅合成されます。この RNA 増幅反応と並行して、蛍光標識マイコプラズマニューモニエ rRNA 検出用プローブが増幅合成されたマイコプラズマニューモニエ rRNA と特異的に結合します。この結合により、蛍光標識マイコプラズマニューモニエ rRNA 検出用プローブに由来する波長の蛍光強度が増加します。そして、反応液中の蛍光強度が経時的に計測されることにより、サンプル中のマイコプラズマニューモニエ rRNA が検出されます。

2. 特徴

本キットは核酸増幅検査法の特徴である迅速性を有しています。本キットの反応試薬、及び開始液は 1 回測定分が個別に封入された形態となっており、測定時の試薬調製が不要です。さらに、反応は 1 本の密閉チューブ内で完了するため、コンタミネーションやキャリーオーバーの危険性がほとんどありません。また、専用機器を用いて測定操作を自動で行うことが可能です。なお、本キットでは試薬中の内部コントロールによりサンプルに由来する反応阻害を検知することができ、偽陰性を防ぐことができます。

【操作上の注意】

* 1. 測定試料の性質、採取法

- (1) 本キットでは核酸抽出されたものを測定用サンプルとして使用し、それ以外は使用しないでください。
- (2) 検体の採取から核酸抽出まで速やかに実施してください。喀痰検体は室温で 24 時間以内に核酸抽出操作を行って下さい。咽頭拭い液検体は検体が乾燥しないよう注意し、速やかに核酸抽出を実施して下さい⁴⁾。
- (3) やむを得ず検体を保存する場合には -80 °C で凍結保存して下さい⁴⁾。
- (4) 保存が不適当な検体や凍結融解した検体は、RNA の損失により検出されないことがあります。
- (5) クロスコンタミネーションを防ぐために、エアロゾルの発生や手袋の汚染に十分注意し、ピペットチップなどは検体ごとに新しいものに交換してください。
- (6) 検体の前処理では感染の危険性がありますので、必要なバイオハザード対策を取ってください。
- (7) 本キットでは別売の TRCR® 核酸精製キット（品番: 0056201）を用いた核酸抽出方法を推奨します。
- (8) 以下に TRCR® 核酸精製キットを用いた各検体の採取方法を示します。
 - 1) 咽頭拭い液検体
口腔から滅菌スワブを挿入し、スワブの先を咽頭後壁に強くこすりつけ、拭い液を採取します。スワブを滅菌試験管に入れ、蓋をして検査室に搬送します。
 - 2) 喀痰検体
喀痰採取容器に喀痰を採取し蓋をして検査室に搬送します。

* 2. 検体の前処理法

喀痰検体のみ前処理が必要です。

- (1) 遠心可能な容器に 100 µL の喀痰と 400 µL の 5 % ラウリル硫酸ナトリウム溶液を加えます[注 1]。
 - (2) (蓋を閉め、容器を) 15 秒間激しく懸濁します。
 - (3) 懸濁後 10,000×g で 5 分間遠心操作をします。
 - (4) 上清 100 µL を測定用サンプルとして用います [注 2]。
- [注 1] 前処理工程は 1 時間以内に終了させ、測定用サンプルを保存する場合は -20 °C 以下で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。
- [注 2] 上清を用いる際、不溶物や沈殿物を含まないように注意してください。

* 3. 測定用サンプルの調製法（試料の核酸抽出）

本キットの測定用サンプル調製法としては、別売の TRCR®核酸精製キット及び、TRCReady®-80 による核酸精製を組み合わせた核酸抽出方法を推奨します。測定用サンプルの調製は前述の前処理法を実施し、TRCR®核酸精製キットの取扱説明書に従って精製を実施して下さい。

検体を加えた変性試薬は速やかに精製を行って下さい。すぐに使用しない場合は、以下の条件で保存して下さい。

2～8 °C: 24 時間以内に使用して下さい。

-20 °C 以下: 1 ヶ月以内に使用して下さい。

他の測定用サンプル調製法を用いる場合には、用法用量に従うとともに、核酸を損失しないよう十分に注意して下さい。測定用サンプル調製法の詳細については、各製品の取扱説明書を参照してください。

以下の操作は感染の危険性がありますので、必要なバイオハザード対策を取ってください。

咽頭拭い液検体

- (1) 咽頭拭い液が付着した滅菌スワブを変性試薬中で 5 秒以上攪拌し、スワブに付着した物質が分散していることを確認してください [注 1]。
- (2) TRCR®核酸精製キット及び TRCReady®-80 の取扱説明書に従い、(1) で得られたサンプルの精製を実施します [注 2]。

喀痰検体

- (1) 2. 検体の前処理法にて処理された測定用サンプル 100 µL を変性試薬に加えます。
 - (2) (蓋を閉め、チューブを) 15 秒間激しく懸濁し [注 1]、3 秒間スピンドウンします。
 - (3) TRCR®核酸精製キット及び TRCReady®-80 の取扱説明書に従い、(2) で得られた溶菌サンプルの精製を実施します [注 2]。
- [注 1] 沈殿、不溶物が見られた場合、2,000 ～ 10,000×g で 15 秒間遠心操作し上清を TRCR®移液チューブ（品番 0024020）に移して下さい。
- [注 2] TRCReady®-80 では TRCR®核酸精製キットによる核酸精製と、それに引き続き測定が連続して実施されます。

4. 妨害物質・妨害薬剤

以下の物質・薬剤を検体に添加し、それらの核酸抽出物を本キットで評価したところ、本キットの判定への影響は認められませんでした。

	濃度
遊離型ビリルビン	20 mg/dL
抱合型ビリルビン	40 mg/dL
乳び	ホルマジン濁度 3000 度
ヘモグロビン	500 mg/dL
クラリスロマイシン	0.1 mg/mL
セフトジジム	0.2 mg/mL
レボフロキサシン	0.1 mg/mL
アセトアミノフェン	0.1 mg/mL
ロキソプロフェンナトリウム	0.1 mg/mL

5. 交差反応性

マイコプラズマニューモニエ以外の *Mycoplasma* 属菌、肺炎原因菌を含む下記25菌種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。
Mycoplasma (以下 *M.* と記す) *hominis*, *M. salivarium*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. genitalium*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Alcaligenes faecalis*, *Chryseobacterium indologenes*, *Empedobacter brevis*, *Flavobacterium odoratum*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*

6. その他

- (1) 本キットは TRCReady[®]-80 の専用試薬です。
- (2) 測定用サンプル中に核酸増幅の妨害物質や多量の標的以外の核酸が存在すると、正しい結果が得られない場合があります。
- (3) 本キットを使用する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てください。汗や唾液に含まれる RNase が少量でも検体に混入すると、RNA が分解されて測定結果に誤りが生じる可能性があります。操作中の RNase 混入を防ぐため、本キットの操作は手袋及びマスクを着用して実施してください。

[用法・用量(操作方法)]

1. 試薬の調製方法

本キットのすべての構成試薬はそのまま使用してください。

- ** (1) 反応試薬:1 テストあたり 1 本使用します。アルミ袋を開封し、測定に必要な本数を取り出したのち、残りの試薬は同封のシリカゲルとともに直ちに元のアルミ袋で密封し 2~8 °C で保存してください。一度アルミ袋を開封した反応試薬は 3 ヶ月以内に使用してください。なお、反応試薬は乾燥品であり、透明又は白色でチューブ底に保持されています。
- ** (2) 開始液:1 テストあたり 1 本使用します。チャック袋を開封し、測定に必要な本数を取り出したのち、残りの試薬は元のチャック袋にて 2~8 °C で保存してください。
- (3) 陽性コントロール: スピンダウンしてから使用してください。陽性コントロールは 1 本あたり 4 回まで使用可能です。測定終了後は速やかに 2~8 °C で保存してください。
- (4) 陰性コントロール: スピンダウンしてから使用してください。陰性コントロールは 1 本あたり 4 回まで使用可能です。測定終了後は速やかに 2~8 °C で保存してください。検体と同時に測定してください。

*2. 必要な器具・器材

- (1) TRCReady[®]-80 及びその付属品、取扱説明書 (以下、機器の取扱説明書)
- (2) TRCR[®]検出試薬用チップセット (品番 0056301)
- (3) 手袋 (パウダーフリーのものを使用してください。)
- (4) マスク
- (5) 遠心機 (喀痰検体を用いる場合、10,000×g 以上遠心可能なもの) (咽頭拭い検体の場合、2,000×g 以上遠心可能なもの)
- (6) 5 % ラウリル硫酸ナトリウム溶液 (喀痰検体を用いる場合) (例: 10% SDS 溶液、富士フイルム和光純薬株式会社、販売元コード: 313-90275、精製水、注射用水等にて希釈して下さい)
- (7) 遠心可能な容器 (喀痰検体を用いる場合) (例: 1.5 mL 滅菌スクリーキャップマイクロチューブ、ザルスタット株式会社、72.692S)
- (8) 滅菌スワブ (咽頭拭い液検体を用いる場合) (例: フロッグスワブ TP100、COPAN ITALIA S.p.A、516C)) (例: フロッグスワブ P100、COPAN ITALIA S.p.A、516CS01))
- (9) TRCR[®]移液チューブ (品番 0024020) (移液する場合) TRCR[®]核酸精製キットによる核酸抽出物以外を測定用サンプルとして用いる場合には以下 (10) ~ (13) をご準備ください。

- (10) 0.5 mL スクリューキャップチューブ DNase 及び RNase フリーの以下のチューブをご使用ください。 (0.5 mL Screw Cap Tube, Scientific Specialties Inc., No.2120-00)
- (11) スクリューキャップ (10) 記載のチューブに合うものをご使用ください。 (例: Standard Screw Cap with O-ring, Scientific Specialties Inc., No.2001-00)
- (12) ピペッター 測定用サンプルの液量が分注可能なものをご使用ください。
- (13) 分注チップ DNase 及び RNase フリーでかつ、エアロゾル防止が施されたチップ (フィルター付など) をご使用ください。

3. 測定 (操作) 法

本キットは TRCReady[®]-80 を用いて測定してください。TRCReady[®]-80 の操作方法の詳細は機器の取扱説明書に従って行ってください。標準的な手順は以下の通りです。

- (1) TRCReady[®]-80 本体のスイッチを入れます。
- (2) コントローラー (PC) のアプリケーションを起動させます。
- (3) 割り当てられたユーザー名でログオンします。
- (4) 測定依頼 (測定モード、サンプル ID、種別、検査項目など) の入力を行います。検査項目は「MP」を選択してください。
- (5) 反応試薬、開始液、及び TRCR[®]検出試薬用チップセットを検出用ラックにセットします。
- (6) 検出用ラックを TRCReady[®]-80 にセットします。
- (7) 測定する陽性コントロール及び陰性コントロールはキャップを外し、精製用ラックの所定の位置にセットします。
- (8) 測定用サンプルを指定の 0.5 mL スクリューキャップチューブに 15 µL + デッドボリューム分 [注 1] 分注し、キャップを外した状態で精製用ラックにセットします [注 2]。
- (9) 精製用ラックを TRCReady[®]-80 にセットします。
- (10) 機器の取扱説明書に従って測定をスタートさせます。

TRCReady[®]-80 により、以下の (11) ~ (13) の操作が実行されます [注 3]。

(11) 反応試薬にサンプル 15 µL、及び開始液 15 µL が添加され、混合されます。

(12) 20 分間、46 °C でインキュベーションされながら、蛍光強度が経時的に測定されます。

(13) 測定された蛍光強度をもとに解析が行われ、測定結果画面に判定結果が表示されます。

[注 1] サンプルのデッドボリュームについては機器の取扱説明書に従ってください。

[注 2] TRCR[®]核酸精製キットによる核酸精製と本キットによる測定を連続して行うサンプルについては TRCR[®]核酸精製キット及び TRCReady[®]-80 の取扱説明書に従ってください。

[注 3] TRCR[®]核酸精製キットによる核酸精製と本キットによる測定を連続して行う場合には、TRCR[®]核酸精製キットの回収チューブに測定用サンプル (精製サンプル) が回収されたのち、(11) ~ (13) の操作が実行されます。

[測定結果の判定法]

1. 判定方法

TRCReady[®]-80 では測定結果が自動的に判定され、測定結果画面上に表示されます。蛍光強度比がカットオフ値を超えた場合に陽性と判断されます。サンプルの判定結果は判定欄に次のように表示されます。

サンプルの判定結果

結果	結果表示
陽性	MP
陰性	—
判定保留 [注 1]	F

[注 1] 測定フラグ欄に測定フラグがない場合には、サンプルに由来する反応阻害の可能性があります。再核酸抽出又は新たに採取した検体を用いて測定することを推奨します。測定フラグがある場合には、機器の取扱説明書を参照してください。

なお、陽性コントロール及び陰性コントロールを測定した際、測定が正しく行われた場合は「Valid」と表示されます。「Invalid#1」が表示された場合には機器の取扱説明書を参照ください。「Invalid#2」が表示された場合にはコンタミネーションの発生が疑われます。機器の取扱説明書のコンタミネーション発生時の対応に従って対策を実施し、同時に測定したサンプルの再測定を行ってください。

サンプル、陽性コントロール及び陰性コントロールを測定した際、上記以外の結果が表示された場合は機器の取扱説明書を参照ください。

2. 判定上の注意

- (1) 臨床診断は、他の検査成績や臨床症状などを考慮して総合的に判断してください。
- (2) 菌量が微量な検体、保存が不適当な検体、又は核酸抽出が不適当なサンプル（例えば、抽出操作中に核酸が消失したサンプル）を測定した場合は、陰性となることがあります。
- (3) サンプル中に標的以外の核酸が多量に存在すると正しい判定結果が得られないことがあります。
- (4) 本キットのプライマー及びプローブは標的配列中の保存性が高い領域に設計されていますが、測定する遺伝子の変異や欠損/挿入、新種の菌の出現などにより正しい判定結果が得られない場合があります。
- (5) 本キットで陰性と判定されても必ずしもマイコプラズマニューモニエの存在を否定するものではありません。

【性能】

1. 性能

1-1 性能

- (1) 感度
管理用試料 [注1] を測定したとき、陽性と判定されます。
 - (2) 正確性
1) 陰性管理用試料 [注2] を測定したとき、陰性と判定されます。
2) 管理用試料 [注1] を測定したとき、陽性と判定されます。
 - (3) 同時再現性
1) 陰性管理用試料 [注2] を3回同時に測定したとき、すべて陰性と判定されます。
2) 管理用試料 [注1] を3回同時に測定したとき、すべて陽性と判定されます。
- [注1] 管理用試料とは、マイコプラズマニューモニエrRNAをコードするDNAをもとに合成、精製されたRNA（マイコプラズマニューモニエ標準RNA）を緩衝剤等を含む液で希釈して調製したもので、マイコプラズマニューモニエ標準RNA 1×10³分子相当/テストを含む試料です。
- [注2] 陰性管理用試料とは、マイコプラズマニューモニエrRNAを含まない緩衝剤等を含む液からなる試料です。
- 1-2 最小検出感度
マイコプラズマニューモニエ標準RNA 1×10³分子相当/テスト

2. 相関性試験成績

臨床検体を用いて本キットと既承認品との比較検討を実施しました。マイコプラズマニューモニエに関して、既承認品との相関性試験全220例（咽頭拭い液検体：110例、喀痰検体：110例）における一致率は 95.0 % (209/220) でした。

全検体		既承認品	
		陽性	陰性
本キット	陽性	47	11 [注1][注2]
	陰性	0	162
		陽性一致率：	100 %
		陰性一致率：	93.6 %
		全体一致率：	95.0 %

拭い液検体		既承認品	
		陽性	陰性
本キット	陽性	39	9 [注1]
	陰性	0	62
		陽性一致率：	100 %
		陰性一致率：	87.3 %
		全体一致率：	91.8 %

喀痰検体		既承認品	
		陽性	陰性
本キット	陽性	8	2 [注2]
	陰性	0	100
		陽性一致率：	100 %
		陰性一致率：	98.0 %
		全体一致率：	98.2 %

- [注1] 既承認品との乖離検体9例の増幅産物の配列を解析したところマイコプラズマニューモニエの塩基配列が確認されました。
- [注2] 既承認品との乖離検体2例は臨床症状からマイコプラズマ感染症であることが示唆されていますが、配列解析等を行われていないため、陽性と断定はできません。

3. 校正用基準物質

マイコプラズマニューモニエ rRNA をコードする DNA をもとに合成、精製された RNA。

【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) 検体、前処理済み検体、及び本キットのサンプルはマイコプラズマニューモニエ及びその他の菌、又は、HIV、HBV、HCV などの感染の恐れがあるものとして取扱ってください。
- (2) 本キットの使用時は保護眼鏡、使い捨て手袋、作業着を着用し、測定終了後はよく手を洗ってください。また、口によるピペッティングを行わないでください。
- (3) 試薬が皮膚・目・粘膜に触れないように注意し、もし、このようなことが起きた場合は直ちに水で十分に洗い流してください。こぼれた場合には水で希釈してから拭き取ってください。
- ** (4) 反応試薬及び開始液のアルミシール、トレイ、アルミ袋並びにチャック袋の角部分あるいは切断面に触れると切創する場合がありますので、取扱いに注意してください。

2. 使用上の注意

- (1) 本キットは、貯法に従い保存してください。凍結したり、長時間室温に放置したりしないでください。また、貯法以外の条件で保存した試薬は使用しないでください。
- (2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (3) 反応試薬は、チューブの底にゴミが付着していないことを確認してから装置にセットしてください。チューブの底にゴミが付着していると蛍光値に異常が見られる場合があります。
- (4) 反応試薬のチューブには落下などによる衝撃を与えないでください。
- (5) 開始液は、シール部分やチューブ上部に試薬又は水滴の付着が見られた場合、手で軽く振って落としてください。また、試薬に気泡が入っている場合は、スピンドウンして除いてください。試薬が上部に付着している場合や気泡が入っている場合、正しく測定できないことがあります。
- (6) 本キット内の試薬は正確な反応が得られるように組み合わせられていますので、キット内の試薬の組み合わせのみで使用し、製造番号が異なるキットの試薬を組み合わせで使用しないでください。また同一の製造番号のキットであっても試薬を注ぎ足すことは行わないでください。
- (7) 反応試薬、開始液のチューブ、及びアルミシールには何も記入しないでください。また、アルミシール表面をこすったり傷つけたり汚したりしないでください。正しく測定できない場合や装置での読み取りができない場合があります。

3. 廃棄上の注意

- (1) 本キットによる試験で使用した検体、試料、サンプル、及びそれらが接触した容器は感染性のあるものとして、各施設のバイオハザード取扱規定を遵守して取扱ってください。
- (2) 測定終了後の反応液を廃棄する場合は、チューブの蓋をしたままで、蓋のできる別の容器に入れて密封し、各施設のバイオハザード取扱規定を遵守して廃棄してください。
- (3) 測定終了後の開始液、チップなどはサンプルと接触したものとして扱い、クロスコンタミネーションに注意するとともに、各施設のバイオハザード取扱規定を遵守して廃棄してください。
- (4) 試薬及び器具など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、水質汚濁防止法などの規定に従って処理してください。

【貯蔵方法、有効期間】

- 1. 貯蔵方法 2～8℃で保存してください。
- 2. 有効期間 12ヶ月。使用期限は箱ラベルに記載されています。

**【包装単位】

品番	品名	包装
0056105	マイコプラズマ rRNA 検出試薬 TRCReady [®] MP	24テスト

構成試薬名	包装内容
反応試薬（桃色）	24本
開始液（白色）	50 μL×24本
陽性コントロール（赤色）	100 μL×3本
陰性コントロール（青色）	100 μL×3本

[主要文献]

1. Ishiguro T. *et al.*, Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel., *Analytical Biochemistry*, 314, 77-86, 2003.
2. 保川清, TRC 反応による RNA の増幅とリアルタイム検出, *医学のあゆみ*, 206(8), 479-483, 2003.
3. 東ソー株式会社, 結核菌検出用オリゴヌクレオチドプローブおよび当該プローブを用いた結核菌の検出方法, 特開 2014-124112, 2014-07-07.
4. 国立感染症研究所, 病原体検出マニュアル「マイコプラズマ肺炎」2011 年度版

TRCR[®] 及び TRCReady[®] は東ソー株式会社の登録商標です。

** 本電子化された添付文書（和文）は日本国内での使用に限られます。

[問い合わせ先]

東ソー株式会社

バイオサイエンス事業部カスタマーサポートセンター

〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川 2743-1

フリーダイヤル[®] 0120-17-1200

TEL (0467) 76-5384

FAX (0467) 79-2550

**[製造販売業者の氏名又は名称及び住所]

東ソー株式会社

東京都中央区八重洲 2-2-1

TEL (03) 6636-3734



東ソー株式会社

TOSOH