

使用説明書：カネカ核酸クロマト 迅速発育抗酸菌同定キット

使用上の注意事項

- 本製品は保護具（ゴム手袋や保護メガネ、マスク等）を着用の上、ご使用ください。
- 本製品で得られた結果の判断・利用については、お客様の責任のもと実施してください。結果の判断・利用によって生じた損害や損失について、当社は直接・間接を問わず一切の責任を負いません。
- 本使用説明書に記載のない操作手順で実施して得られた検出結果の妥当性はお客様にて検証してください。
- 本製品は研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助の目的で使用することはできません。

1. 本製品の概要

本製品は、マルチプレックス PCR 法と核酸クロマト法に基づき、菌懸濁液または菌培養液から迅速発育抗酸菌 (*Mycobacteroides abscessus* subsp. *abscessus* 【*M. abscessus*】, *Mycobacteroides abscessus* subsp. *bolletii* 【*M. bolletii*】, *Mycobacteroides abscessus* subsp. *massiliense* 【*M. massiliense*】, *Mycolicibacterium fortuitum*, *Mycolicibacterium peregrinum*, *Mycobacteroides chelonae*) を検出するための製品です。但し *M. abscessus* と *M. bolletii* は識別せず同じ項目として検出します。

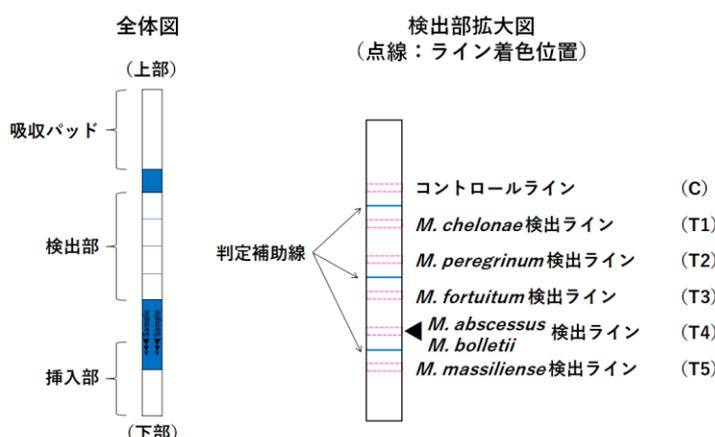
2. 製品構成/保存条件

製品名	内容物	容量 (20 テスト)	保管温度	使用期限
カネカ核酸クロマト 迅速発育抗酸菌同定キット	テストストリップ	20 本	室温 (2~30°C)	各内容物のラベルに記載
	展開バッファー	4 mL×1 本		
カネカ核酸クロマト 迅速発育抗酸菌同定キット PCR 増幅試薬	PCR ミックス (※1)	200 μL×1 本	冷凍 (-20°C以下)	
	プライマーミックス	100 μL×1 本		

※1. DNA Polymerase dU plus dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)、UNG (Uracil DNA Glycosylase) を含みます。

3. 検出原理

迅速発育抗酸菌の DNA に特異的に結合するプライマーを用い、マルチプレックス PCR により標的 DNA を増幅します。増幅産物をテストストリップに展開し、ライン着色パターンから迅速発育抗酸菌種を判定します。ライン着色は目視にて確認可能であり、結果判定にゲル撮像装置やリアルタイム PCR 機等の装置は不要です。



## 4. 使用方法

### 4.1. 本製品以外に必要な器具・機器等

- ・ マイクロピペットおよびマイクロピペット用フィルター付きチップ
- ・ サーマルサイクラー（本製品の性能は LifeECO Thermal Cycler（Bioer Technology 社）で確認済み）
- ・ ヒートブロック
- ・ PCR 用チューブ（0.2 mL）
- ・ マイクロチューブ（1.5～2 mL）
- ・ 卓上遠心機
- ・ 核酸抽出試薬 極東（別売）

### 4.2. DNA 抽出液の調製

<適用可能な検体>

液体培地で培養した培養液または固形培地に生育したコロニー

- ・ McFarland No. 0.5～1 相当の培養液。
- ・ コロニーを滅菌蒸留水にて McFarland No. 0.5～1 相当となるよう調製した菌懸濁液。

<DNA 抽出試薬>

核酸抽出試薬 極東（構成：試薬 A、試薬 B）

<液体培地の場合>

- ① McFarland No. 0.5～1相当の培養液 20  $\mu$ Lをマイクロチューブに移し、核酸抽出試薬 極東の試薬A 20  $\mu$ Lと混合後、ヒートブロック等にて98°C、10分間加熱する<sup>※2</sup>。
- ② 室温まで冷却後、核酸抽出試薬 極東の試薬B 80  $\mu$ Lを添加、混合したものをDNA抽出液とする。

<コロニーの場合>

- ① McFarland No. 0.5～1相当となるように、コロニーを滅菌蒸留水に懸濁する<sup>※3</sup>。
- ② 菌懸濁液 20  $\mu$ Lをマイクロチューブに移し、核酸抽出試薬 極東の試薬A 20  $\mu$ Lと混合後、ヒートブロック等にて98°C、10分間加熱する。
- ③ 室温まで冷却後、核酸抽出試薬 極東の試薬B 80  $\mu$ Lを添加、混合したものをDNA抽出液とする。

※2. 加熱中にマイクロチューブの蓋が開くことがあるため、キャップロック等の使用をおすすめします。

※3. コロニーは、固形培地を一緒に掻き取らないように採取してください。

### 4.3. PCR 反応液の調製

- ① PCR ミックスとプライマーミックスを常温にて融解する<sup>※4</sup>。
- ② PCR 用チューブに PCR ミックス 10  $\mu$ L とプライマーミックス 5  $\mu$ L を混合する。
- ③ ②の PCR 用チューブに、4.2 項で調製した DNA 抽出液 5  $\mu$ L を添加する<sup>※5</sup>。

※4. PCR ミックスおよびプライマーミックスは、十分に融解・混合してください。特に PCR ミックスは解凍時に白色の沈殿を認める場合があります。この場合、ピペッティングにより沈殿を完全に溶解してご使用ください。

※5. 調製後、速やかに PCR 反応を実施してください。

#### 4.4. PCR 反応

サーマルサイクラーに PCR 用チューブをセットして、下表の PCR 条件にて PCR 反応を行う<sup>※6</sup>。

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル
25	300	1
94	60	1
94	5	35
60	10	
72	15	

※6. PCR 反応終了後、テストストリップによる検出をすぐには実施しない場合は、PCR 反応液を冷凍保存しておくことをおすすめします。冷凍保存した PCR 反応液は、常温にて完全に融解させてから、テストストリップによる検出を行ってください。

#### 4.5. テストストリップによる検出

- ① 反応終了後の PCR 用チューブを取り出し、蓋を開け、展開バッファー 160  $\mu$ L を添加する。
- ② テストストリップの上部を持ってケースから取り出し<sup>※7</sup>、そのままの向きでテストストリップの挿入部（「Sample」の文字記載側）を PCR 用チューブの底までしっかりと挿入する<sup>※8</sup>（PCR 反応液の展開が開始されます）。
- ③ 展開 10 分時点で、目視にてライン着色パターンを確認し、判定する。

※7. テストストリップを扱う際は、ゴム手袋等を着用し、必ず上部の吸収パッドを持つようにしてください。テストストリップの挿入部や検出部には直接手を触れないでください。

※8. テストストリップを PCR 用チューブに挿入する際は、PCR 反応液の飛散による汚染に十分ご注意ください。

### 5. 結果判定

陰性：コントロールライン（C）のみがピンク～赤紫色に着色する。

陽性：コントロールライン（C）に加え、検出ライン（T1～T5）がピンク～赤紫色に着色する。

無効：コントロールライン（C）が着色しない（下図は一例）<sup>※9</sup>。

判定	陰性	陽性					無効	
		<i>M. chelonae</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. bolleii</i>	<i>M. massiliense</i>	C なし	C なし
着色パターン	C のみ	C+T1	C+T2	C+T3	C+T4	C+T5	C なし	C なし

※9. コントロールラインが着色しない場合、誤操作や機器の不具合等の可能性があるため、4.2 項 DNA 抽出液の調製から再試験を実施してください。

※10. DNA 抽出液に多量の夾雑物が含まれる場合、PCR 反応が阻害され、ライン着色が薄くなる可能性があります。その際は DNA 抽出液を希釈することで改善されることがあります。

※11. 検出時の環境温度が著しく低い場合（冬場の屋外等）、ライン着色が薄くなることがありますので、15°C以上に空調された屋内にてご使用ください。

## 6. 使用上の注意事項

- 本使用説明書に記載する保存条件、使用期限を厳守してください。
- 本製品の仕様は予告なく変更される場合があります。
- 使用する器具や機器類について、製造・販売元が指定する使用方法に従ってください。
- テストストリップは湿気を含む状態で長時間放置すると検出性能が低下する恐れがありますので、開封後は容器の蓋をしっかりと閉じて保管し、吸湿には十分ご注意ください。
- マイクロピペット用チップは使用毎に交換し、コンタミネーションに注意してください。また、マイクロピペット用チップはフィルター付きのものを使用してください。
- 本製品の使用前後に、0.55%次亜塩素酸ナトリウム水溶液や DNA 除去剤、紫外線（UV）等を用いて実験台等をクリーニングしてください。
- コンタミネーションによる誤判定を防ぐため、DNA 抽出、PCR 反応液の調製、テストストリップによる検出の各ステップは、別々の区域で実施することを推奨しております。
- 試薬や DNA 抽出液等の入ったチューブを開ける前に、卓上遠心機等でスピンドウンを行ってください（内容物の飛散を避けるため）。
- コンタミネーションが確認された場合、使用する器具や機器類について、製造・販売元が指定する方法でクリーニングしてください。
- 使用後のテストストリップおよび PCR 反応液を廃棄する際は、テストストリップの挿入部や検出部、PCR 反応液に直接触れないように注意し、PCR 反応液が飛散しないよう、ビニール袋等に入れて廃棄してください。
- 本製品や PCR 反応液、DNA 抽出液等を廃棄する場合は、当該地域の廃棄物に関する規程、および、当該施設の規則に従い、衛生面、環境面に配慮し廃棄してください。
- 本製品は Bioer Technology 社 LifeECO Thermal Cycler で性能を確認しております。他機種をご利用の場合には、テストストリップのライン着色が不鮮明になる可能性があります。

### <問い合わせ先>

株式会社カネカ Medical Devices Solutions Vehicle

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 TEL 079-445-2406（受付時間：平日 9:00-17:00）

URL <https://www.kaneka-labtest.com>