体外診断用医薬品　　**改訂 2023 年 7 月（第 14 版）
製造販売承認番号 22700AMX00612000　　*改訂 2023 年 3 月（第 13 版）

ご使用に際しては本添付文書をよく読んでからご使用ください。

マイコプラズマ核酸キット

ジーンキューブ®
マイコプラズマ・ニューモニエ

［全般的な注意］

1.本品は全自動遺伝子解析装置 GENECUBE®又はリアルタイム PCR 装置用の試薬です。
2.本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
3.添付文書以外の使用目的及び使用方法でご使用されて得られた測定結果については保証を致しかねます。
4.測定結果に基づく診断は、他の検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
5.使用する機器の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。
6.SDSは末尾記載の問い合わせ先に請求し、ご確認ください。

［形状・構造等（キットの構成）］

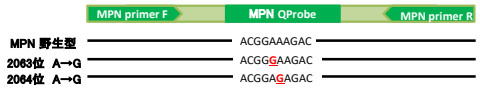
1.酵素試薬[KOD Mix]
KOD® DNA ポリメラーゼ
dNTP※
2.プライマー・プローブ試薬[MPN Mix]
MPN プライマー F
MPN プライマー R
MPN QProbe
硫酸マグネシウム
3.内部コントロール試薬[IC Mix]
4.陽性コントロール溶液 1[MPN PC1]
5.陽性コントロール溶液 2[MPN PC2]
6.陰性コントロール溶液[MPN NC]
※「dNTP」はデオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸の混合物です。

［使用目的］

咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)又は喀痰中のマイコプラズマ・ニューモニエ DNA 及び 23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域の変異の検出
(マイコプラズマ・ニューモニエ感染の診断補助)

［測定原理］

本品は、「Polymerase Chain Reaction（PCR)法による標的核酸増幅」[1)]と「蛍光標識プローブ（QProbe※)を用いた標的核酸検出」[2),3)]を利用したマイコプラズマ・ニューモニエ DNA 検出試薬です。
マイコプラズマ・ニューモニエの 23S rRNA 遺伝子領域をターゲットに MPN プライマーF と MPN プライマーR をアニーリングさせます。KOD® DNA ポリメラーゼによって各プライマーの伸長が起こります。この時 dNTP を基質、マグネシウムイオンを酵素の活性触媒として用います。プライマーのアニーリング、伸長を繰り返し行うことで標的核酸を増幅させます。その後、増幅核酸とマイコプラズマ・ニューモニエに特異的な配列を持つ MPN QProbe をハイブリダイゼーションさせて、融解曲線解析を行い蛍光のピーク温度を解析することでマイコプラズマ・ニューモニエの DNA 検出を行います。
マイコプラズマ・ニューモニエは、23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域の 2063、2064、2067、2617 位 [4),5),6)]のいずれかの塩基の点変異がある場合、マクロライド耐性となることが報告されています。本品は 23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域の 2063、2064、2067 位を含む領域をターゲット遺伝子としており、QProbe は野生型にパーフェクトマッチするように設計されています。変異がある場合（変異型）、野生型と比較して低温にピークが得られます。GENECUBE®では融解曲線結果を自動解析することにより、23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域変異の有無の検出を行います。
※「QProbe」は日鉄環境株式会社が特許権を有する消光プローブです。



［操作上の注意］

1.臨床検体について
(1)本品の試料には、咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)又は喀痰から抽出した DNA 溶液（検体調製液）を用います。
(2)血液成分が多量に含まれている検体は避けてください。試料中に多量に残存していると増幅検出反応が阻害されて検出できないことがあります。
(3)冷凍保存された検体を使用するときは、室温に戻してから使用してください。

2.試料の調製方法
(1)臨床検体の採取方法
咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)：口腔（鼻孔）内にスワブを挿入し、スワブの先を咽頭後壁（鼻腔の奥）にこすりつけて拭い液を採取してください。
喀痰：十分にうがいをした後、専用容器に喀痰を採取してください。

各検体の前処理は、以下の A～C のいずれかの方法で前処理・核酸抽出法を行ってください。喀痰については、セミアルカリプロテアーゼ等で均一化処理したものも用いることができます。検体の持ち込み量過多の場合に、内部コントロール増幅不良により Invalid と判定されることがあります。その場合は、検体量を減らして再度前処理から検査を行ってください。

A.検体抽出法
1)咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)を採取したスワブ又は喀痰を付着させたスワブを滅菌精製水又は検体保存溶液※に浸漬させ、以下の工程の前に、ボルテックスなどで軽く撹拌します。
2)溶解液と、検体を懸濁した溶液をチューブに等量混合し、ボルテックスで約 15 秒間、十分に撹拌し検体から核酸を抽出します。※
3)容器内部の液を、核酸抽出前処理液とします。
4)この核酸抽出前処理液を検体調製液として測定を実施します。
※検体保存溶液は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）など緩衝液が含まれる場合、正しく結果が得られない場合があります。
※生理食塩水、カザミノ酸溶液で懸濁した試料は、原液のままでは検体抽出法には用いることができません。
※溶解液はジーンキューブ®専用　溶解液もしくはジーンキューブ®専用前処理キット（呼吸器用）に含まれる溶解液を用います。2)の工程の後で必要に応じて、ジーンキューブ®専用　前処理キット（呼吸器用）に含まれるフィルターを用いてろ過します。

**B.ビーズ破砕法
1)咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)を採取したスワブ又は喀痰を付着させたスワブを滅菌精製水又は検体保存溶液に浸漬させ、懸濁します。
2)イージー・ビーズに滅菌精製水 1000μL を分注します。
3)検体懸濁液を 2)に加えて、13,000×g、3 分間の遠心を行います。
4)チューブに残る溶液が 150μL 以下となるように上清を除去します。
5)溶解液 50μL を加えて、ボルテックスミキサー※で 3 分間激しく撹拌します。
6)13,000×g、3 分間の遠心を行います。
7)上清を検体調製液として使用します。
※ボルテックスミキサーは DIGITAL DISRUPTOR GENIE SI-DD88 もしくは同等性能品を用い、回転速度 2,500rpm 以上の設定で実施してください。用手法や破砕効率の低い撹拌機を用いた場合、十分なDNAが得られないことがあります。

C.各種核酸抽出法
核酸抽出にあたって、注意事項など詳細については製品の説明書に従って操作してください。各種核酸抽出法の操作方法に従って核酸抽出前処理液から核酸を抽出したものを検体調製液とします。

3.マイコプラズマ・ニューモニエ反応性
臨床検体由来のマイコプラズマ・ニューモニエ 20 株について測定したところ、すべて陽性を示しました。

4.交差反応性

マイコプラズマ・ニューモニエ以外のマイコプラズマ属菌、肺炎原因菌を含む下記 20 種の細菌について測定したところ、すべて陰性であることを確認しました。

菌種	菌種
Mycoplasma bovis	*Legionella pneumophila*
Mycoplasma fermentans	*Moraxella catarrhalis*
Mycoplasma genitalium	*Mycobacterium avium*
Mycoplasma orale	*Mycobacterium tuberculosis*
Mycoplasma salivarium	*Neisseria meningitidis*
Bordetella pertussis	*Pseudomonas aeruginosa*
Chlamydophila pneumoniae	*Pseudomonas fluorescens*
Corynebacterium diphtheriae	*Serratia marcescens*
Haemophilus influenzae	*Staphylococcus aureus*
Klebsiella pneumoniae	*Streptococcus pneumoniae*

5.共存物質の影響

ヒトゲノム混入における影響については、10 万コピー／テストのヒトゲノムが混入しても本品の測定に影響しないことを確認しました。

遊離型ビリルビン（終濃度 30mg/dL）、抱合型ビリルビン（終濃度 30mg/dL）、ヘモグロビン（終濃度 500mg/dL）、乳ビ（終濃度 ホルマジン濁度 2700 度）による影響は認められませんでした。

薬剤の影響についてクラリスロマイシン（200μg/mL）、セフタジジム（200μg/mL）、レボフロキサシン（200μg/mL）、アセトアミノフェン（200μg/mL）、ロキソプロフェン（200μg/mL）による影響は認められませんでした。

6.コンタミネーションの防止

GENECUBE®は、試薬の分注から増幅専用容器であるプラスチックキャピラリーへの試薬の充填、増幅検出までを自動で行います。増幅・検出を一つの容器で開封することなしに行うことができ、測定を終了した試薬はそのまま自動で廃棄するため、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を抑えることができます。しかし、GENECUBE®では検体の調製段階で発生するクロスコンタミネーションは防止することができませんので、以下の操作方法を遵守してください。

(1)個人防護具の着用

人体に付着した微生物や体液（例えば唾液、汗）の混入を防ぐため、また検体からの感染防止の観点からも個人防護具（手袋、マスク、防護衣など）を着用して操作を行ってください。GENECUBE®への試薬のセット時には、検体の調製時に使用した手袋は使用せず、新しい手袋を使用してください。

(2)フィルター付ピペットチップの使用

検体の調製時に使用するピペットがエアーディスプレースピペットの場合、サンプルとピストンの間に空気が介在するため、ピペット内部を汚染してしまう可能性があります。ピペット内部の汚染を防止するため、フィルター付のチップを使用してください。

［用法・用量（操作方法）］

1. 試薬・試液調製法

・酵素試薬［ KOD Mix］： そのまま用います。

・プライマー・プローブ試薬［ MPN Mix ］ ： プライマー・プローブ試薬［ MPN Mix ］1 本に内部コントロール試薬［ IC Mix ］50μL を添加します。

・陽性コントロール溶液 1［ MPN PC1］： そのまま用います。

・陽性コントロール溶液 2［ MPN PC2］： そのまま用います。

・陰性コントロール溶液［ MPN NC］： そのまま用います。

2.必要な器具、器材など

・GENECUBE®及びその付属品、取扱説明書

・マイクロピペット及びチップ

・個人防護具（手袋、マスク、防護衣など）

＜消耗品＞

・ジーンキューブ®専用 プラスチックキャピラリー

・ジーンキューブ®専用 分注チップ

・8,12 連チューブ：株式会社イナ・オプティカ 123015TC,123046TC など※

・サンプルチューブ(0.5mL):ザルスタット株式会社 72.699.00003, 72.704.700 など※

※上記以外の製品をご使用の場合は、適合の可否をお問い合わせください。

*3.操作方法

本品は、全自動遺伝子解析装置 GENECUBE®又はリアルタイム PCR 装置を用いて測定してください。機器の操作は、各機器の取扱説明書に従って行ってください。以下、GENECUBE®の操作方法を記載します。

(1)酵素試薬［ KOD Mix ］、内部コントロール試薬［ IC Mix ］を添加済みのプライマー・プローブ試薬［ MPN Mix ］、各消耗品を機器の所定の位置にセットします。

(2)検体調製液のチューブを機器の所定の位置にセットします。

(3)検査を開始します。

(4)検査終了後、測定画面上に表示される判定結果に従って判定を行ってください。

※酵素試薬については、ジーンキューブ®百日咳の酵素試薬と互換できます。

精度管理を目的として、付属の陽性コントロール溶液、陰性コントロール溶液を用いる場合、検体調製液と同様に上記の操作を行います。陽性コントロール溶液、陰性コントロール溶液はそのまま用いることができます。陽性コントロール溶液について測定結果が陰性を示した場合、陰性コントロール溶液について測定結果が陽性を示した場合、全ての試薬を入れ替えて再測定を行ってください。

※陰性コントロール溶液については、ジーンキューブ®百日咳の陰性コントロール溶液と互換できます。

［測定結果の判定法］

1.判定方法

GENECUBE®では、判定結果は判定画面上で野生型陽性「+W」、変異型陽性※「+m」、陰性「−」、判定無効「Invalid」の判定が行われます。判定無効「Invalid」の場合、検体調製から再測定を行ってください。

※本品では、マイコプラズマ・ニューモニエの 23S rRNA 遺伝子の 2063 位、2064 位、2067 位に変異があった場合に、変異型陽性と判定されます。

2.判定上の注意

本品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。検体中に標的となる DNA が存在しても、検体前処理操作で最小検出感度以下になった場合は陰性と判定されますのでご注意ください。

(1)以下の場合、正常に測定できないことがありますのでご注意ください。

1)検体調製が不十分で、菌体のロス又は DNA の分解が生じている検体を使用した場合

2)保管方法が適切に行われていないもしくは有効期限が過ぎている試薬を使用した場合

3)保存が適切に行われていない検体を使用した場合

(2)試料に含まれるマイコプラズマ・ニューモニエが死菌である場合、放出された DNA を検出する可能性があります。

(3)本品は、23S rRNA 遺伝子ドメイン V の 2617 位の変異については、解析領域外にあるため、野生型と判定されます。

(4)本品は、23S rRNA 遺伝子ドメイン V の 2067 位の変異(A2067G)については、陰性と判定される場合があります。

(5)A2063G、A2064G 以外の変異については、臨床検体を用いた本品の検出性能は確認できておりません。

［性能］

1.性能

用法・用量（操作方法）欄の操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行なった場合、下記の規格に適合します。

(1)感度試験

1)陰性コントロール溶液を測定するとき、陰性を示します。

2)陽性コントロール溶液 1 を測定するとき、野生型陽性を示します。

3)陽性コントロール溶液 2 を測定するとき、変異型陽性を示します。

(2)正確性試験

1)自家管理陰性試料 1～3 を測定するとき、陰性を示します。

2)自家管理陽性試料 1～3 を測定するとき、野生型陽性を示します。

3)自家管理陽性試料 4～6 を測定するとき、変異型陽性を示します。

(3)同時再現性試験

1)自家管理陰性試料 1 を 4 回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。

2)自家管理陽性試料 1 を 4 回同時に測定するとき、すべて野生型陽性を示します。

3)自家管理陽性試料 4 を 4 回同時に測定するとき、すべて変異型陽性を示します。

(4)最小検出感度（GENECUBE®測定）

25 コピー/テスト

(5)較正用基準物質

本品の較正用基準物質にはマイコプラズマ・ニューモニエの 23S rRNA 遺伝子配列の一部を含む DNA を使用しています。

2.相関性試験成績
(1)核酸増幅法を原理とする既承認品との相関性評価
咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)182 件、喀痰 152 件を試料として、本品及び既承認品での測定を行ったところ、表 1-1、1-2 に示す結果となりました。

表 1-1 既承認品との相関性試験成績(咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む))

咽頭拭い液 (鼻咽頭拭い液を含む)		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	87※	0
	陰性	0	95
全体一致率		100% (182/182)	

※陽性 87 例の内、42 例は鼻咽頭拭い液。

表 1-2 既承認品との相関性試験成績(喀痰)

喀痰		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	57	0
	陰性	0	95
全体一致率		100% (152/152)	

(2)シーケンス解析法との相関性評価
マイコプラズマ・ニューモニエ陽性検体 251 件を試料として、本品及びシーケンス解析法での 23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域の 2063 位、2064 位、2067 位および 2617 位の変異の有無について測定を行いました。シーケンス解析が可能だった 249 件の測定結果について表 2-1 に示しました[7]。

表 2-1 シーケンス解析法との相関性試験成績

		シーケンス解析法	
		野生型	変異型
本品	野生型	182	0
	変異型	0	67※
全体一致率		100% (249/249)	

※変異型 67 例の内、A2063G が 65 例、A2064G が 2 例。
※変異型 67 例の内 1 例で、本品では変異型陽性で、シーケンス解析では野生型と変異型 DNA の混在が認められました。

[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)検体は感染性を有するものとして、各施設の安全管理規定に従って取扱ってください。
(2)検体を取扱う時は、個人防護具(手袋、マスク、防護衣など)を着用し、検体を吸い込んだり体に付着したりすることがないようご注意ください。
(3)試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の診察・治療などを受けてください。
(4)試薬が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。
(5)試薬が飛散した場合は、拭き取ってください。
(6)検体を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、0.5%次亜塩素酸剤などの消毒液を使用して拭き取ってください。
(7)検体の採取には必ず医療器具として承認を受けているスワブをお使いください。

2.使用上の注意
(1)機器、試薬及び消耗品は専用のものを使用してください。
(2)本品に含まれる試薬は必ず保管方法に従って保存し、凍結させたり、長時間室温に放置したりしないでください。また、保管方法以外の条件で保存した試薬や有効期間が過ぎている試薬は使用しないでください。
(3)すべての構成試薬は継ぎ足して使用しないでください。

3.廃棄上の注意
(1)使用済みの試薬及び器具などを廃棄する場合には医療用廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。
(2)試薬を廃棄する場合は水質汚濁防止法などの規制に留意して処理してください。
(3)使用済みの試薬及び消耗品は、溶液を飛散させないように廃棄してください。

[保管方法・有効期間]
保管方法
2～8℃で保存
有効期間
1 年 (期限は外装に表示)

[包装単位]

商品名	構成試薬名
ジーンキューブ® マイコプラズマ・ニューモニエ (32 テスト)	酵素試薬[KOD Mix]
	プライマー・プローブ試薬[MPN Mix]
	内部コントロール試薬[IC Mix]
	陽性コントロール溶液 1[MPN PC1]
	陽性コントロール溶液 2[MPN PC2]
	陰性コントロール溶液[MPN NC]

[主要文献]

1)Takagi M. *et al.* Characterization of DNA Polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and Its Application to PCR. Appl Environ Microbiol. 1997 Nov; 63(11): 4504-4510.
2)Kurata S. *et al.* Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res. 2001 Mar 15; 29(6): e34.
3)Torimura M. *et al.* Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. Anal Sci. 2001 Jan; 17(1): 155-160.
4)Sabine Rereyre 、Julien Goret and Cecile Bebear. *Mycoplasma pneumoniae*: Current Knowledge on Macrolide Resistance and Treatment.Frontiers in Microbiology.22 June 2016
5)Tanaka T, *et al.* Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* Infection,Japan,2008 - 2015.Emerging Infectious Diseases.Vol.23,No10,October 2017
6)Fei Zhao, *et al.* Antimicrobial susceptibility and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates in Beijing,China,from 2014 to 2016.
7)Yoshitomo Morinaga, *et al.* Evaluation of GENECUBE Mycoplasma for the detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. Journal of Medical Microbiology 2020.DOI 10.1099/jmm.0.001264

文献請求先 末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。

TOYOBO

[問い合わせ先]
東洋紡株式会社 診断システム事業部
〒530-0001 大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3335 FAX 06-6348-3833

[製造販売業者の氏名又は名称及び住所]
東洋紡株式会社
〒914-8550 福井県敦賀市東洋町 10 番 24 号