

ヨーネ病診断用リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応キット (インターカレーション法)

平成25年2月14日（告示第475号）新規追加
令和5年10月18日（告示第1352号）一部改正

マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシスの遺伝子が保有する挿入塩基配列であるIS900を増幅することができるプライマーの組合せを用い、インターカレーション法によるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「リアルタイムPCR」という。）によりヨーネ菌DNAを検出し、また、ヨーネ菌DNA濃度を算出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 特異性試験

1.1.1 試験材料

試験品、参照陽性DNA（付記1）、特異性検定用陰性DNA（付記2）及び陰性対照（付記3）を用いる。

1.1.2 試験方法

1.1.2.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法

指示陽性DNA、参照陽性DNA、特異性検定用陰性DNA及び陰性対照のそれぞれ5 μ Lを、核酸増幅試薬25 μ L、プライマー10.1及びプライマー11.1それぞれ0.25 μ L、ウラシルーNーグリコシラーゼ（以下この項において「UNG」という。）0.5 μ L並びにリボヌクレアーゼフリー水19 μ Lを混和した反応液45 μ Lに加え、よく混和する。リアルタイムPCR装置（付記4）を用いて、50℃2分間の加熱及び95℃15分間の熱変性後、95℃30秒間の解離反応並びに68℃1分間のアニーリング及び伸長反応を1セットとして45回繰り返した後、融解曲線解析を行う。

1.1.2.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法

試験品中の強陽性コントロール、弱陽性コントロール、陰性コントロール、参照陽性DNA及び特異性検定用陰性DNAのそれぞれ5 μ Lを、核酸増幅試薬25 μ L、プライマーIS900-3及びプライマーIS900-32のそれぞれ1 μ L、インターナルコントロール1 μ L、UNG0.25 μ L並びにリボヌクレアーゼフリー水16.75 μ Lを混和した反応液45 μ Lに加え、よく混和する。リアルタイムPCR装置を用いて、40℃10分間の加熱及び95℃10分間の熱変性後、95℃30秒間の解離反応並びに68℃1分間のアニーリング及び伸長反応を1セットとして45回繰り返した後、融解曲線解析を行う。

1.1.3 判定

1.1.3.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法

指示陽性DNA及び参照陽性DNAについては、蛍光強度の上昇が認められ、蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。特異性検定用陰性DNA及び陰性対照については、蛍光強度の上昇が認められないか、認められた場合であっても指示陽性DNAと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。

1.1.3.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法

参照陽性DNA、強陽性コントロール及び弱陽性コントロールについては、蛍光強度の上昇が認められ、蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。特異性検定用陰性DNA及び陰性コントロールについては、蛍光強度の上昇が認められるとともに、参照陽性DNA及び強陽性コントロールと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。

1.2 力価試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法

試験品、力価検定用DNA（付記5）及び陰性対照を用いる。

1.2.1.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法

試験品中の強陽性コントロール、弱陽性コントロール、陰性コントロール、力価検定用強陽性コントロール（付記6）、力価検定用弱陽性コントロール（付記7）並びに力価検定用陰性コントロール（付記8）を用いる。

1.2.2 試験方法

1.2.2.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法

指示陽性DNAを、DNA濃度が1 pg/2.5 μLから0.001pg/2.5 μLまでになるようにトリス塩酸エチレンジアミン四酢酸緩衝液（付記9。以下この項において「TE緩衝液」という。）を用いて10倍階段希釈する。希釈した各段階の指示陽性DNA、力価検定用DNA及び陰性対照のそれぞれ5 μLについて、1.1.2.1に準じて融解曲線解析を行う。力価検定用DNAの増幅曲線についてスレッシュホールド・サイクル値（以下この項において「Ct値」という。）を用い、標準曲線を作成する。

1.2.2.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法

強陽性コントロール、弱陽性コントロール、力価検定用強陽性コントロール、力価検定用弱陽性コントロール、力価検定用陰性コントロール及び陰性コントロールについて、1.1.2.2に準じて融解曲線解析を行う。

1.2.3 判定

1.2.3.1 プライマー10.1及び11.1を用いる方法

力価検定用DNA及び指示陽性DNAのそれぞれ1 pg/2.5 μLの濃度におけるCt値は24±3サイクルであり、0.001pg/2.5 μLの濃度において2穴中1穴以上が陽性でなければならない。また、ヨーネ菌DNA濃度とCt値との用量－反応式の相関係数の2乗値は0.9以上であり、PCR効率は80～120%でなければならない。蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。陰性対照については、蛍光強度の上昇が認められないか、認められた場合であっても指示陽性DNAと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。

1.2.3.2 プライマーIS900-3及びIS900-32を用いる方法

所定の試験成立条件をすべて満たしたとき、強陽性コントロール及び力価検定用強陽性コントロールの定量サイクル値（以下この項において「Cq値」という。）は24±3サイクル、弱陽性コントロール及び力価検定用弱陽性コントロールのCq値は32.5±3サイクル、力価検定用陰性コントロール及び陰性コントロールのCq値は33.5±3サイクルでなければならない。強陽性コントロール及び力価検定用強陽性コントロールの蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められなければならない。弱陽性コントロール及び力価検定用弱陽性コントロールの蛍光値のピークは所定の温度範囲に二峰性に認められなければならない。力価検定用陰性コントロール及び陰性コントロールの蛍光値のピークは所定の温度範囲に認められ、かつ強陽性コントロール及び力価検定用強陽性コントロールと同じ温度範囲で蛍光値のピークが認められてはならない。

付記1 参照陽性DNA

マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス42-13-1株から抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が0.4pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製した後、－20℃又は－80℃で保存する。

付記2 特異性検定用陰性DNA

マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウムP-18株及びマイコバクテリウム2333株からそれぞれ抽出・精製されたDNAであり、DNA濃度が4 pg/μLになるように、適当な緩衝液で調製した後、－20℃又は－80℃で保存する。

付記3 陰性対照

TE緩衝液を用いる。

付記4 リアルタイムPCR装置

動物医薬品検査所が適当と認めたリアルタイムPCR装置。1.1.2.1にあつては指示陽性DNAを用いて1.1.2.1に規定する条件で測定したときの蛍光値のピークの認められる温度範囲が、事前に確認されているもの。

付記5 力価検定用DNA

参照陽性DNAを、DNA濃度が1 pg/2.5 μ Lから0.001pg/2.5 μ Lまでになるように、TE緩衝液を用いて10倍階段希釈したもの。用時調製する。

付記6 力価検定用強陽性コントロール

陽性コントロールとして適当と認められたDNAを、DNA濃度が0.025pg/ μ Lになるように調整したもの。-80℃で保存する。

付記7 力価検定用弱陽性コントロール

陽性コントロールとして適当と認められたDNAを、DNA濃度が0.025fg/ μ Lになるように調整したもの。-80℃で保存する。

付記8 力価検定用陰性コントロール

TE緩衝液を用いる。

付記9 トリス塩酸エチレンジアミン四酢酸緩衝液（TE 緩衝液）

1,000mL中

トリスヒドロキシアミノメタン	1.21 g
エチレンジアミン四酢酸	0.29 g
水	残 量

pH を8.0に調整した後、121℃で15分間高压滅菌する。