

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 (ハイブリダイゼーション法)

令和5年10月18日（告示第1352号）新規追加

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、ハイブリダイゼ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）及び特異性検定用陰性DNA（付記2）を用いる。

1.1.2 試験方法

陽性コントロール1～5、参照陽性DNA、特異性検定用陰性DNA及び陰性コントロールのそれぞれ5 μ Lを、核酸増幅試薬42.75 μ L、ウラシルーN-グリコシラーゼ0.25 μ L、インターナルコントロール（以下この項において「IC」という。）1 μ L、プライマーMP10-1 0.25 μ L、プライマーMP11-1 0.25 μ L、プローブIS900-6 0.25 μ L及びプローブIC 0.25 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3）を用いて、50℃2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回繰り返す。

1.1.3 試験成立条件

陽性コントロール1～5の定量サイクル値（以下この項において「Cq値」という。）とその濃度を用いて算出された標準曲線の相関係数の二乗値（以下この項において「R²」という。）が0.9以上であり、PCR効率は80～120%でなければならない。陽性コントロール1では2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認め、かつCq値が25±3サイクルでなければならない。陽性コントロール5では1穴以上でIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。陰性コントロールでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めず、かつ2穴ともICを検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。これらの条件をすべて満たした場合、試験が成立するものとする。

1.1.4 判定

参照陽性DNAでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。特異性検定用陰性DNAでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めず、かつ2穴ともICを検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。

1.2 力価試験

1.2.1 試験材料

試験品、力価検定用標準DNA（付記4）1～5及び力価検定用陰性コントロール（付記5）を用いる。

1.2.2 試験方法

陽性コントロール1～5、陰性コントロール、力価検定用標準DNA1～5及び力価検定用陰性コントロールに対し、1.1.2を準用し、DNA増幅を行う。また、陽性コントロール1～5及び力価検定用標準DNA1～5の増幅曲線のCq値を用い、それぞれの標準曲線を作成する。

1.2.3 試験成立条件

1.1.3を準用する。

1.2.4 判定

力価検定用標準DNA1では2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認め、かつCq値が25±3サ

イクルでなければならない。力価検定用標準DNA 5 では1穴以上でIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。力価検定用標準DNAの標準曲線の R^2 は0.9以上でなければならない、PCR効率は80~120%でなければならない。力価検定用陰性コントロールでは2穴ともIS900を検出する蛍光強度の上昇を認めず、かつ2穴ともICを検出する蛍光強度の上昇を認めなければならない。

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 $0.4\text{pg}/\mu\text{L}$ になるように、適当な緩衝液で調製したもの。−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 $4\text{pg}/\mu\text{L}$ になるように、適当な緩衝液で調製したもの。−80℃で保存する。

付記3 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装置であって、蛍光色素FAM（励起波長495nm、蛍光波長520nm）及びAtto532（励起波長532nm、蛍光波長553nm）をそれぞれ同時に測定可能なもの。

付記4 力価検定用標準DNA

陽性コントロールプラスミドpPC10-11を、DNA濃度が $75\text{fg}/\mu\text{L}$ から $7.5\text{ag}/\mu\text{L}$ までになるように、適当な緩衝液で10倍階段希釈したもの。DNA濃度が $75\text{fg}/\mu\text{L}$ のプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 1、 $7.5\text{fg}/\mu\text{L}$ のプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 2、 $750\text{ag}/\mu\text{L}$ のプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 3、 $75\text{ag}/\mu\text{L}$ のプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 4、 $7.5\text{ag}/\mu\text{L}$ のプラスミドDNA溶液を力価検定用標準DNA 5とする。−80℃で保存する。

付記5 力価検定用陰性コントロール

適当な緩衝液を力価検定用陰性コントロールとしたもの。−80℃で保存する。