

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

平成 25 年 2 月 14 日（告示第 475 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、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

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 ずつ、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 $^{\circ}$ C 2 分間の加熱及び 95 $^{\circ}$ C 15 分間の熱変性後、95 $^{\circ}$ C 30 秒間の解離反応並びに 68 $^{\circ}$ C 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

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。

1.2 力価試験

1.2.1 試験材料

試験品、力価検定用 DNA（付記 5）及び陰性対照を用いる。

1.2.2 試験方法

指示陽性 DNA を、DNA 濃度が 1 pg/2.5 μ L から 0.001pg/2.5 μ L までになるようにトリス塩酸エチレンジアミン四酢酸緩衝液（付記 6。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 μ L について、1.1.2 に準じて融解曲線解析を行い、また、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。

1.2.3 判定

力価検定用 DNA 及び指示陽性 DNA のそれぞれ 1 pg/2.5 μ L の濃度における Ct 値は 24 \pm 3 サイクルであり、0.001pg/2.5 μ L 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。

付記 1 参照陽性 DNA

マイコバクテリウム・アビウム亜種ツベルクローシス 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後、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 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後、 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 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 装置であって、指示陽性 DNA を用いて 1.1.2 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 $1\text{ pg}/2.5\ \mu\text{L}$ から $0.001\text{pg}/2.5\ \mu\text{L}$ 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 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、 $121\text{ }^\circ\text{C}$ で 15 分間高圧滅菌する。