

PicoGene® Legionella spp. Kit RGT001A

1. 特徴

PicoGene® Legionella spp. Kit (以下、本製品)は、プローブ法を用いたリアルタイム PCR によりレジオネラ属菌を検出する試薬です。本製品には、反応に必要なプライマー、プローブ、ホットスタート DNA ポリメラーゼ、dNTPs 等が含まれております。事前の試薬調製作業が不要で、サンプルと混合するだけでリアルタイム PCR 測定が可能です。またモバイル リアルタイム PCR 装置 PicoGene® PCR1100 に最適化しており、本製品を用いることでオンラインで迅速に測定結果を得ることが可能です。

2. 製品内容

試薬入り 8 連 PCR チューブ × 2 セット(計 16 テスト分)

3. 保存方法

冷凍保管: -10 ~ -30°C

4. 使用目的

サンプル中のレジオネラ属菌の検出

5. 測定原理

本製品は、TaqMan® プローブ法¹⁾を原理としたレジオネラ属菌を検出するためのリアルタイム PCR 用試薬です。主に濃縮処理した環境水をアルカリ処理等により核酸抽出したものをサンプルとして使用します。本製品にはレジオネラ属菌の 16S rRNA をターゲットとしたプライマー、プローブのセットが予め含まれており、サンプル中のレジオネラ属菌を特異的に検出することができます。また、本製品は内部コントロール(Qua670)の増幅を検出することで、PCR 反応が正常に行われているかを確認することができます。

6. 使用方法

(1) 必要な器具及び装置

- ① 本製品; PicoGene® Legionella spp. Kit RGT001A
- ② モバイル リアルタイム PCR 装置 PicoGene® PCR1100
- ③ PicoGene® 測定チップ MCP2000
- ④ マイクロピペット(1~1,000 µL)
- ⑤ フィルター付きチップ
- ⑥ 氷(クラッシュアイス)または保冷剤・冷却ブロック等
- ⑦ 小型冷却遠心機
- ⑧ ヒートブロック(95°Cで使用)
- ⑨ ボルテックスミキサー
- ⑩ 滅菌マイクロチューブ

(2) 操作手順

・検水の濃縮

検水の濃縮は「レジオネラ症防止指針第4版 第2部第5章 レジオネラ属菌の検査方法」や「薬生衛発0919号第1号 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法について 別添 公衆浴場における浴槽水等のレジオネラ属菌検査方法」等をご参照ください。

・核酸抽出液の調製例(アルカリ熱抽出法)

- (a) 検水の濃縮水(100倍濃縮検水) 2 mL を滅菌マイクロチューブに入れて遠心(4°C, 13,000 × g, 10min)をした後に 40 µL 程度を残し、上清(約 1,960 µL)を除去します。
- (b) スピンドアウン後に 50mM NaOH 50 µL を添加してボルテックスミキサーで混合します。
- (c) ヒートブロックで加熱処理(95°C, 15min)をした後に氷、冷却ブロック等で冷却します。
- (d) スピンドアウン後に 1M Tris-HCl (pH7.0) 8 µL を添加して、ボルテックスミキサーで混合します。
- (e) 遠心(4°C, 13,000 × g, 10min)した後に上清を回収して得た核酸抽出液をサンプルとします。(約 100 µL、2,000 倍濃縮)

・核酸精製

核酸抽出液を本製品のサンプルとして直接使用した際に、抽出方法やサンプル由来の阻害物質によって PCR の反応性や検出感度に低下が見られる場合があります。内部コントロール(Qua670)の増幅と照らし合わせ、反応阻害による偽陰性が疑われた場合には核酸抽出液を希釈して測定に使用する、もしくは市販の核酸精製キットで PCR 反応阻害の影響を除いてください。

・反応液の調製

- (a) 冷凍保存していた 8 連 PCR チューブから必要本数を切り取り室温で解凍します。解凍後は保冷して取り扱い、速やかに使用してください。

- (b) 本製品にサンプル 5 µL を添加し、ピペティング又はボルテックスにて穏やかに混合し反応液を調製します。

・PicoGene® PCR1100 による測定

- (a) PicoGene® PCR1100 の測定条件(品種ファイル)を設定します。品種ファイルは製品ラベルに表示されている QR コードなどから製品 HP (<https://www.pcr-nsg.jp/reagent/legionella/>)にアクセスしてダウンロードしてください。なお、設定の方法など PicoGene® PCR1100 の詳しい操作についてはユーザーズマニュアルをご参照ください。

【Profile】

| | | | |
|---------------|-------|------------------|--------|
| Cycles | 42 | Denature temp. | 95°C |
| Det.Sens | 2 | Hot start time | 15 sec |
| RT temp. | 60 °C | Denature time | 3.5sec |
| RT time | 1 sec | Pump Lv. | LL |
| An & Ex temp. | 65 °C | Predetection Lv. | 50 |
| An & Ex time | 7 sec | | |

- (b) 混合後の反応液を 18µL 分取し、PicoGene® 測定チップへ注入してください。分取及び注入時は気泡が測定チップへ入らないように注意してください。
- (c) PicoGene® PCR1100 の設定が完了し、[測定チップ挿入]の画面になったら装置に PicoGene® 測定チップをセットし、挿入扉を閉めて"START"ボタンを押して測定を開始してください。
- (d) 測定が終了していることを確認した後は、装置から使用済みの測定チップを取り出して、廃棄の基準に従って処理してください。

■ 増幅曲線/検量線の一例

本製品及び PicoGene® PCR1100 を用いた増幅曲線及び検量線の一例を示します。

- ・陽性コントロール：ATCC® 33152DQ™
- ・陰性コントロール：10mM Tris-HCl

【増幅曲線】

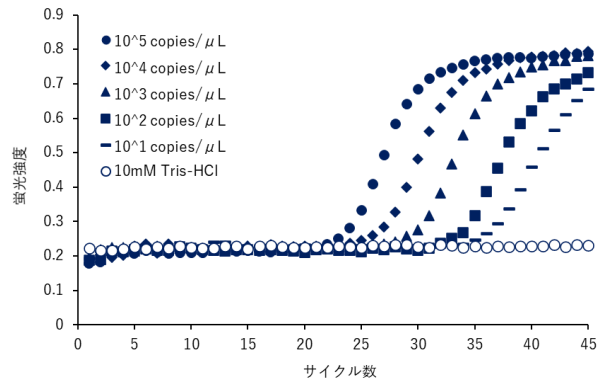


図. 希釈系列の増幅曲線例

【検量線】

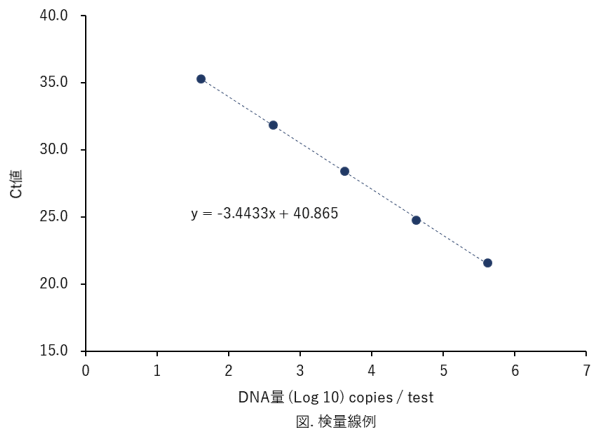


図. 検量線例

7. 操作上の留意事項

本製品は劣化を防ぐため以下に留意し取り扱いください。

- ① -10 ~ -30°C で冷凍保存する。
【注意】 -30°C 以下の低温保管は避けてください。
- ② 蛍光プローブ保護のため遮光して保存してください。

- ③ 測定の際には必要な本数だけ取り出して解凍し使用してください。凍結融解はなるべく避けてください。
- ④ サンプルとの混合後は速やかに測定を行ってください。
- ⑤ サンプルを取り扱う際はコンタミネーション防止の為、慎重に取り扱ってください。
- ⑥ チューブの壁面やキャップに液が付着した場合はスピンドウン等で試薬を落とした後、十分混合してからご使用ください。
- ⑦ 使用するサンプル由来の成分によって PCR 反応に影響を受けることがあります。内部コントロールの結果を参考にサンプルの再調製や希釈をおこなった後に再測定をしてください。必要に応じて市販の核酸精製キット等の使用もご検討ください。

13. お問い合わせ先
 日本板硝子株式会社
 神奈川県相模原市緑区西橋本 5-8-1
 ビジネス・イノベーション・センター
 ☎042-775-1532

8. 検出感度

・ 2 ゲノムコピー/テスト
 (ATCC 33152 DQ ; Quantitative Genomic DNA)

・ 6GU²⁾ / テスト
 (SRM LEGDNA 01)

9. 検出可能な菌種

以下のレジオネラ属菌について、全て陽性反応を示した。

| | |
|---|---|
| <i>Legionella pneumophila</i> | <i>Legionella bozemanii</i> |
| <i>Legionella anisa</i> | <i>Legionella gormanii</i> |
| <i>Legionella micdadei</i> | <i>Legionella longbeachae</i> |
| <i>Legionella dumoffii</i> | <i>Legionella jordanis</i> |
| <i>Legionella oakridgensis</i> | <i>Legionella rubrilucens</i> |
| <i>Legionella birminghamensis</i> | <i>Legionella maceachernii</i> |
| <i>Legionella busanensis</i> | <i>Legionella feeleii</i> |
| <i>Legionella thermalis</i> (= JCM30970) | <i>Legionella jamestowniensis</i> |
| <i>Legionella beliardensis</i> | <i>Legionella lansingensis</i> |
| <i>Legionella quinlivanii</i> | <i>Legionella gresilensis</i> |
| <i>Legionella taurinensis</i> | <i>Legionella lytica L-89</i> (= JCM33226) |
| <i>Legionella londiniensis</i> | |

10. 交差性

以下の 13 種の微生物について、全て陰性反応を示し、交差反応は認められなかった。

| | |
|--------------------------------|------------------------------|
| <i>Campylobacter jejuni</i> | <i>Campylobacter coli</i> |
| <i>Vibrio sp.</i> | <i>Bacillus cereus</i> |
| <i>Clostridium perfringens</i> | <i>Cronobacter sakazakii</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| <i>Salmonella</i> | |

11. 使用上又は取り扱い上の注意事項

- (1) サンプル採取・取扱いについては必要なバイオハザード対策をとってください。
- (2) 感染性のおそれがあるサンプルの取り扱い及び廃棄については、適切な保護具（手袋、保護メガネ、マスクなど）を着用し、使用する国や地域の規制に従ってください。感染症を伝播する危険があります。
- (3) 本製品は、レジオネラ属菌検出を目的とした検査にのみご使用ください。ヒト、動物由来の検体を用いた医療、診断の目的には使用できません。
- (4) 遺伝子検査の知識や経験をもたない場合、検査結果の判定を誤る危険性がありますので、本製品の使用に当たっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導の下で検査を実施してください。
- (5) 本製品は従来のレジオネラ属菌検査法の培養法とは異なり遺伝子検出法ですので、レジオネラ属菌の生菌のみを検出するものではありません。したがって、本製品による判定結果が培養法と異なる場合があります。
- (6) 本製品の性能に由来しない事由（操作方法を誤った場合等）による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、当社は一切の責任を負いません。
- (7) 外袋に表示されている使用期限内に使用してください。
- (8) 本製品及び測定チップを廃棄する際は、適切な保護具（手袋、保護メガネ、マスクなど）を着用し、医療廃棄物等に関する規定及び水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理してください。
 (測定チップ MCP2000 主要材料：COP)

12. 参考文献

- (1) Holland P M. et al.: Proc Natl Acad Sci USA. 88, 7276–7280 (1991)
- (2) ISO/TS 12869:2019 Water quality
- (3) H. Inoue : Biocontrol Science, 25, No. 3, 121–129 (2020)