



# 梅毒トレポネーマ検出キット(研究用)

## 取扱説明書

### 【一般的な注意】

1. 本製品は遺伝子解析装置 GeneSoC<sup>®</sup> mini 及び超高速リアルタイム PCR 装置 GeneSoC<sup>®</sup> mini R の専用試薬である。
2. 本製品は研究用試薬であり、ヒト、動物等の医療・臨床診断には使用しないこと。
3. 使用する試薬及び装置の取扱いは、各製品の電子添文及び取扱説明書に従うこと。

### 【キットの構成】

20 Tests

1. PCR Reaction Mix 1本
2. Primer/Probe Mix 1本

### 【使用目的】

梅毒皮膚病変部位からの梅毒トレポネーマ DNA の検出

### 【測定原理】

本製品は梅毒皮膚病変の滲出液から抽出した梅毒トレポネーマ DNA のうち一部の領域について、リアルタイム Polymerase Chain Reaction(PCR)法により核酸増幅し、蛍光測定によってリアルタイムに梅毒トレポネーマ DNA を検出する試薬である。本製品のプライマー及びプローブは梅毒トレポネーマ特異的な配列に設計されている。また、核酸増幅の工程に問題がないことを確認するための内部コントロール(以下、IC)の DNA 並びにそれに相補的な配列をもつプライマー及びプローブも含んでいる。

はじめに皮膚病変の滲出液から抽出した梅毒トレポネーマ DNA 及び試薬中の IC DNA を高温により 2 本鎖から 1 本鎖に変性させる。1 本鎖になった梅毒トレポネーマ DNA 及び試薬中の IC DNA に本製品のプライマーが結合し、DNA 合成酵素(DNA Polymerase)により DNA が増幅合成される。本製品のプローブは蛍光物質及びクエンチャー物質により標識されており、プローブが増幅合成された DNA に結合すると、DNA 合成酵素の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性によりプローブが分解される。この分解により、蛍光物質とクエンチャー物質の分子間距離が離れ、蛍光物質が蛍光を発するようになる。この蛍光強度を経時的に測定することにより、検体中の梅毒トレポネーマ DNA 及び IC DNA を検出する。

### 【操作上の注意】

#### 1. 測定試料の性質・採取法

##### (1) 対象検体

皮膚病変(硬性下疳、扁平コンジローマ等)の滲出液

##### (2) 検体の採取法

綿棒の綿球部全体に皮膚病変の滲出液を吸収させ、500 $\mu$ L の以下のいずれかの懸濁媒体に懸濁する。

- ・PBS(-) (Phosphate Buffered Saline:リン酸緩衝食塩水)  
カルシウムイオン及びマグネシウムイオンを含まない製品
- ・TE バッファー (Tris-EDTA Buffer)

#### 2. 交差反応性

交差反応する可能性のある下記の菌 20 種類及びウイルス 2 種類について測定した結果、これらの菌及びウイルスとの交差反応は認められなかった。

微生物の名称		
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Corynebacterium striatum</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Neisseria flava</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>

<i>Neisseria meningitidis</i> SG A	<i>Neisseria meningitidis</i> SG B	<i>Neisseria meningitidis</i> SG C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	Herpes simplex virus Type 1
Herpes simplex virus Type 2		

また、梅毒トレポネーマ以外への交差反応の可能性について *in silico* 解析により検討した結果、2023年6月8日の時点でアメリカ国立生物工学情報センター(NCBI)のデータベースに登録されていたヒト口腔トレポネーマを含む菌、ウイルス、真菌類、ヒト配列のうち、*Treponema paraluis-cuniculi*(ウサギのトレポネーマ症原因菌)に対して交差反応が起こる可能性が認められたが、*Treponema paraluis-cuniculi*はヒトへの感染は報告されていない。

#### 【操作方法】

##### 1. 必要な器具、機材、試薬等

- (1) DNA抽出用試薬 ※1(推奨:QIAGEN社 QIAamp Viral DNA Mini Kit 又は同等の性能を有するDNA抽出用試薬)
- (2) 反応液調製用チューブ(0.2~1.5 mL)
- (3) マイクロピペット及びフィルター付きピペットチップ
- (4) 冷却用チューブラック
- (5) 氷(クラッシュアイス)又はそれに相当するもの
- (6) 微量簡易遠心機
- (7) ボルテックスミキサー
- (8) GeneSoC<sup>®</sup> mini 専用測定チップ(杏林製薬 別売品、以下、専用測定チップ)
- (9) 遺伝子解析装置 GeneSoC<sup>®</sup> mini 又は超高速リアルタイムPCR装置 GeneSoC<sup>®</sup> mini R(杏林製薬 別売品、以下専用機器)

※1 必要に応じて用意する。

##### 2. 専用機器の設定

専用機器の取扱説明書に従い、下記のとおりプロトコルを設定する。

##### (1) 検出チャンネル

梅毒トレポネーマ: Cy5(測定波長 630 nm)

IC: FAM(測定波長 490~550 nm)

##### (2) PCR サイクル

ステップ	温度(°C)	時間(秒)	サイクル数
1	96	10	1
2	96	5	50
	61	8	

以下のQRコードから上記のPCRサイクルを含めたプロトコルを自動入力する。



### 3. サンプル溶液の調製

皮膚病変の滲出液を懸濁媒体に懸濁した懸濁液、又は DNA 抽出用試薬にて上記の懸濁液から抽出した DNA をサンプル溶液とし、使用時まで氷冷保存する。サンプル溶液は原則として直ちに使用すること。なお、DNA 抽出操作の詳細は DNA 抽出用試薬の使用方法に従う。

### 4. 試薬の調製

PCR Reaction Mix 及び Primer/Probe Mix を融解後、ボルテックスし、スピンドウンしてから使用する。使用時まで氷冷保存し、使用後は速やかに $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ で保存する。

### 5. 測定(操作)法

(1) 下記のとおり、氷上にて PCR Reaction Mix、Primer/Probe Mix を反応液調製用チューブに添加し、混合後、スピンドウンする。

反応液 1 テスト分の試薬量

チューブ識別色	試薬	使用量( $\mu\text{L}$ )
白	PCR Reaction Mix	12.0
青	Primer/Probe Mix	6.0
	合計	18.0

(2) 測定直前に氷上にて(1)の溶液に $2.0\mu\text{L}$ のサンプル溶液を添加し、混合後、スピンドウンする。

(3) 専用測定チップ付属の使用方法に従い、 $2\sim 20\mu\text{L}$ 用マイクロピペットを用いて、専用測定チップの試料導入口から(2)の溶液を $17.0\sim 19.0\mu\text{L}$ 注入する。この時、専用測定チップへの気泡の混入を防ぐため、マイクロピペットのプッシュボタンは第1ストップまで押し込んで注入し、第2ストップまで押し込まないこと。

(4) 専用測定チップを専用機器にセットし、2.で設定した条件で測定を開始する。

(5) 測定終了後、専用機器の表示画面上で測定結果を確認する。

#### 【測定結果の判定法】

専用機器の画面上に表示された測定結果について以下の判定方法に従い、判定する。無効となった場合はサンプル溶液を用いて再測定する。

梅毒 トレポネーマ	IC	判定
+	+	陽性
+	-	陽性
-	+	陰性
-	-	無効

#### <判定上の注意>

1. 増幅曲線の形状は必ず確認すること。著しい増幅曲線の乱れがある場合は、同じサンプル溶液を用いて再測定するか、又はサンプル溶液を希釈して再測定すること。
2. 検体採取、輸送、保存が不適当な検体、菌量が微量な検体、又は DNA 抽出が不適当なサンプル溶液を測定した場合は、偽陰性となる可能性がある。
3. 本製品のプライマー及びプローブは梅毒トレポネーマにおいて保存性が高い領域に設計されているが、この領域に変異が生じた場合は検出感度が低下する可能性がある。

#### 【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) 検体は感染の恐れがあるものとして取り扱いに注意し、必要なバイオハザード対策を実施すること。
- (2) 検体及び本製品を取り扱うときは保護眼鏡、使い捨て手袋、マスク、作業着等の防護具を着用し、測定終了後はよく手を洗うこと。作業過程ごとに手袋を変えるなど、操作には細心の注意を払うこと。
- (3) 試薬が誤って皮膚・目・粘膜に付着した場合は、直ちに大量の水で十分に洗い流し、必要に応じて医師の手当てを受けること。

## 2. 使用上の注意

- (1) 本製品は指定の貯蔵方法で保存すること。
- (2) 本製品の凍結解凍の回数は必要最低限とすること。
- (3) 本製品は他のロットと組み合わせて使用しないこと。また、同一のロットであっても試薬の注ぎ足しは行わないこと。
- (4) 本製品は光への暴露が最小限となるよう注意すること。
- (5) 本製品を取り扱う際は核酸の分解を防ぐため、汗や唾夜に含まれる DNase のコンタミネーションに注意すること。
- (6) 機器や器具は適切に点検・校正されたものを使用すること。

## 3. 廃棄上の注意

- (1) 検体及び検体が接触したピペットチップや容器は感染性のあるものとして、各施設のバイオハザード取扱規定に従い、医療廃棄物として処理すること。
- (2) 測定に使用した専用測定チップは注入孔を覆っているシールを剥がさずに、焼却処理又はビニール袋を二重に覆って医療廃棄物として処理する。増幅産物による汚染を防ぐため、廃棄の際にオートクレーブは行わないこと。
- (3) 試薬及び器具等を廃棄する場合は、医療用廃棄物に関する規定、水質汚濁防止法などの法令や自治体等の規定に従って処理すること。
- (4) 検体の取扱い時に検体が飛散したりこぼれたりした場合は、直ちに次亜塩素酸ナトリウム又は消毒用アルコール等によりふき取ること。

### 【貯蔵方法】

−20±5℃

### 【製造販売元及び住所】

杏林製薬株式会社

〒101-8311 東京都千代田区神田駿河台四丁目 6 番地

製品に関するお問い合わせ  
杏林製薬株式会社 くすり情報センター  
TEL: 0120-952956  
受付時間: 9:00~17:00 (月~金 ※土日祝除く)

GeneSoC 製品 Web サイト  
URL: <https://www.genesoc.jp/>