バクテリア検出キット（qPCR 法）

1．製品紹介

バクテリア検出キット（qPCR 法）は、蛍光定量 PCR（TaqMan プローブ法）技術に基づき、培地、細胞培養物､生物製品などにおける細菌汚染の有無を定性的に検出するためのものです｡本キットは､100 CFU/mL 以下の検出限界を持ち、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、大腸菌など 5 種類の細菌を検出できることが確認されています。また、約 400 種類の検証菌の既知の近縁細菌との配列照合が可能です。真菌、マイコプラズマ、NK 細胞、293 細胞などのヒト由来細胞との交差反応がなく、高感度かつ特異性に優れています。検証は、中国薬典の qPCR 法に基づいて行われています。

本キットでは､バクテリアの標的配列検出に FAM プローブ､内部品質管理には ROX プローブの 2 種類の蛍光プローブを使用しています。FAM チャネルは細菌を特異的に検出し、ROX チャネルは内部品質管理を担っています。内部品質管理は、PCR 反応中に加えることで、サンプルに PCR 抑制要素が含まれることによる偽陰性を排除するために使用されます。さらに、サンプル抽出段階での添加により、抽出効果を評価し、抽出の不適切さによる偽陰性を排除することも可能です。

本キットは、当社の核酸抽出キットと組み合わせることで、サンプル中の細菌 DNA を効率的に抽出し、異なるサンプルマトリックスによる干渉を排除し、検出感度を向上させます。

２．目的用途

本キットは、主細胞バンク、ワーキング細胞バンク、ウイルスシードバッチ、コントロール細胞、臨床治療用細胞などの細菌汚染の検出に用いることができます。また､培地や細胞培養物､生物学的製品などの細菌汚染の定性的検出にも適用されます。

３．製品設計および検証の参照基準

『中国薬典 1101 無菌検査法』
『中国薬典 9201 薬品微生物検査代替方法検証指導原則』
『日本薬局方<2.06>』
『米国薬局方<71>』

４．性能検証

性能指標	検証結果	
カバー率		実験検証は薬局方無菌検証用の 5 種類の細菌菌種（黄色ブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、スポリウム菌と大腸エシリチア菌）を検査することができ、データベース比較は 400 種類近くの細菌をカバーしました。
検出限界	株検出限界	実験では、5 種類の細菌種が 95%の検出要求を満たし、100CFU/mL の黄色ブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、スポリジウム菌と大腸エシリチア菌を安定的に検出できることが検証されました。Pseudomonas aeruginosa の検出限界は 0.5CFU/mL であり、Clostridium sporogenes の検出限界は 0.5CFU/mL であります。
	プラスミド感度	実験により陽性プラスミドは 95%の検出要求を満たし、検出限界は 5 copies/反応に達することが検証されました。
特異性	試料マトリックス	NK 培地、幹細胞培地、293 細胞培地、細菌培地等の基質は干渉しませんでした。

	交差反応	細胞（293 細胞、NK 細胞、幹細胞）、真菌（Aspergillus niger、Aspergillus fumigatus、Candida albicans、Candida glabrata）、マイコプラズマ（Mycoplasma pneumoniae、Mycoplasma oral、Mycoplasma hyorhinis）などのゲノム DNA と干渉しないです。
耐久性	システム耐久性	異なる濃度内の品質管理、酵素使用量の微調整、温度の小範囲の変動及び異なる機器設備は実験結果に明らかな影響を与えなかったです。
	サンプルマトリックスの干渉	NK 細胞、幹細胞、293 細胞による検査干渉を検証した結果、マトリックス（NK 培地）や細胞（10^6/mL）の影響を受けています。
	陰陽性適合率	151 個の陰性サンプルを検証し、陰性符合率は 100%である。100 CFU/mL の 5 種類の細菌（黄色ブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、枯草菌、スポリジウム菌、大腸菌）を検証し、陽性合致率 100%でした。
再現性		試薬を 3 ロット検出し、抽出後の 100 CFU/mL 検証菌 5 種を検出した。結果 100CFU/mL の 5 種類の検証菌を安定して検出することができ、しかも 3 ロットの結果は一致し、試薬キットの再現性は良好で、CV<10%でした。

4.1 特異性

本キットは、中国薬局方に記載されている 5 種の検証菌（黄色ブドウ球菌、緑膿菌、枯草菌、草菌、スポリジウム菌、大腸菌）を 100 CFU/mL の検出限界で検出できることが確認されています。また、真菌（アスペルギルス・ナイガー、カンジダ・アルビカンス、アスペルギルス・フミガータス、カンジダ・グラブラータ）や、マイコプラズマ（マイコプラズマ・ピネー、マイコプラズマ・オラル、マイコプラズマ・ニューモニアエ）との交差反応がないことが確認されています。さらに、293 細胞 DNA、NK 細胞 DNA、幹細胞 DNA との交差反応も見られませんでした。

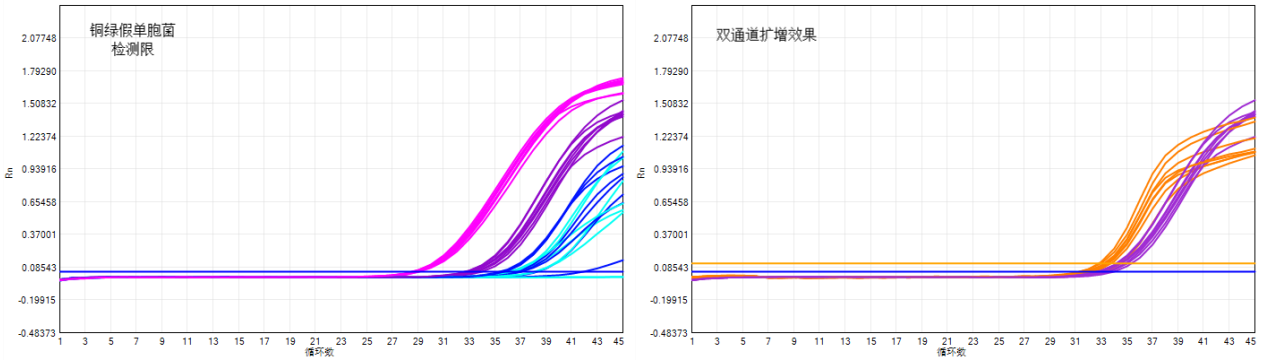
菌液は、友康磁気ビーズ法抽出キットを用いて抽出し、検査を実施しました。結果は以下の表に示されています。

キット特異性検証結果（細菌チャネル増幅 Ct 値の検出）							
細菌	結果	真菌	結果	マイコプラズマ	結果	細胞	結果
サブティリス菌	32.04	アスペルギルス・	NoCt/NoCt	ピンマイコプラズマ	NoCt/NoCt	293 細胞	NoCt/NoCt
スポリウム菌	25.46	アスペルギルス・	NoCt/NoCt	口腔マイコプラズマ	NoCt/NoCt	NK 細胞	NoCt/NoCt
大腸菌	30.46	カンジダ・アルビカンス	NoCt/NoCt	マイコプラズマ肺炎	NoCt/NoCt	幹細胞	NoCt/NoCt
緑膿菌	34.10	シリダスムーズイースト	NoCt/NoCt	未知の種属マイコプラズマ	NoCt/NoCt		
黄色ブドウ球菌	35.92						

4.2 検出限界と感度

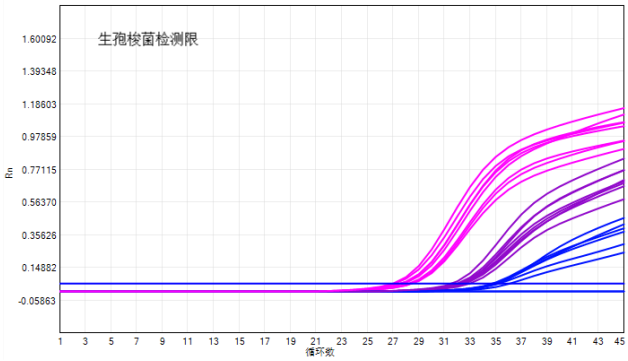
例えば、菌液濃度を 10～0.05CFU/mL とし、各濃度を 8 ウェル繰り返し、検出率は 7/8 以上であり、その結果、緑膿菌の検出限界は 0.5CFU/mL であることがわりました。

Pseudomonas aeruginosa 検出限界検証結果（検出細菌増幅 Ct 値）									
CFU/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	検出率
10	28.50	28.55	28.70	28.65	28.67	29.07	28.87	29.01	8/8
1	32.64	32.70	32.98	33.38	34.00	33.06	33.07	33.48	8/8
0.5	35.71	37.00	35.61	37.07	36.53	35.36	41.91	38.29	8/8
0.1	38.10	36.10	NoCt	38.17	36.61	NoCt	36.73	36.33	6/8



スポリウム菌を例にとると、菌液濃度 5～0.05CFU/mL を用い、濃度ごとに 8 ウェル繰り返し、検出率は 7/8 以上であり、その結果、スポリウム菌の検出限界は 0.5CFU/mL であることがわかりました。

Clostridium sporogenes 検出限界検証結果（細菌チャネル増幅 Ct 値検出）									
CFU/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	検出率
5	28.66	29.33	29.98	28.46	30.09	29.76	29.18	29.16	8/8
0.5	33.08	33.75	34.09	34.24	34.61	33.97	33.77	33.55	8/8
0.05	36.76	37.43	NoCt	NoCt	36.87	36.85	38.78	36.58	6/8



プラスミドを例に反応系感度を測定したところ、プラスミドの使用濃度は 0.05～5 copies/反応であり、各濃度に 8 ウェル繰り返し、検出率は 7/8 以上であった結果、検出系がプラスミドを検出する際の感度は 5 copies/反応であることがわかりました。

陽性プラスミド感度検証結果（細菌チャネル増幅 Ct 値検出）									
	1	2	3	4	5	6	7	8	検出率
5 コピー/反応	35.25	34.36	33.70	35.07	37.01	35.21	35.27	35.57	8/8
0.5 コピー/反応	42.10	NoCt	42.44	39.03	35.42	39.26	NoCt	41.41	6/8

0.05 コピー/反応	NoCt	36.10	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	1/8

4.3 耐久性

1) 異なる濃度内品質管理が検査に与える影響の検証

異なる濃度の内質制御を加え、細菌増幅チャネルの影響を見た結果、検査系の陽性検出は過剰な内参加の影響を受けず、CV<5%でした。

異なる濃度の内部参照が検出に与える影響の検証（増幅 Ct 値）				
	複合穴 1		複合穴 2	
内部参照濃度	細菌	内部品質管理	細菌	内部品質管理
1000 倍高い	31.09	20.86	21.17	32.34
100 倍高い	33.49	24.54	24.74	31.37
10 倍高い	33.08	28.83	28.77	32.02
通常システム	33.18	32.04	32.30	31.93
下回る	32.87	35.14	35.86	32.20
単一テンプレート	32.49	NoCt	NoCt	32.18

2)検査システムの異なる酵素量の検証

検査系の異なる酵素の使用量を比較した結果、検査系の陽性検出は過剰な検査用酵素添加の影響を受けないことがわかりました。

異なる酵素量による検出への影響検証（増幅 Ct 値）				
	0.125 μ L/反応酵素量		0.25 μ L/反応酵素量	
	細菌	内部品質管理	細菌	内部品質管理
陽性サンプルの増幅 Ct 値	29.42	29.12	30.05	30.26

3)検出システムの異なる増幅温度の検証

異なる増幅温度を用いた検出系を比較した結果、検出系の陽性検出は温度の小さな範囲の変化の影響を受けず、CV<5%であることを発見しました。

異なる増幅温度が検出に与える影響の検証（細菌チャネル増幅 Ct 値の検出）									
	1	2	3	4	5	6	7	8	検出率
60℃	30.270	30.512	31.379	31.184	30.434	30.301	30.082	30.035	8/8
63℃	30.574	30.410	28.996	30.168	29.590	29.840	29.840	27.918	8/8
65℃	29.223	29.988	30.379	29.043	30.098	29.309	29.879	29.652	8/8

4)検査システムの機器適合性の検証

検査システムの 2 種類のメーカー機器（西安天隆と上海宏石）における増幅効果を比較した結果、検査システムの陽性検出値の差は大きくなく、差値は 1・119 であり、2 個 Ct 以内であり、C V<5%でした。

検出に与える異なる機器の影響の検証（増幅 Ct 値）										
	1	2	3	4	5	6	7	8	平均値	検出率

天隆	31.449	30.996	30.887	31.309	31.113	30.512	31.402	31.246	31.114	8/8
マクロ石	29.57	28.49	30.34	29.99	30.35	31.04	29.89	30.29	29.995	8/8

5）検出システムの細胞と培地干渉に対する耐性の検証

比較検査システムは1ミリリットルあたり3*10を含む^{6}個のNK細胞のNK培地での増幅効果については、サンプル抽出前にそれぞれDEPC水と細胞を含む培地で細菌希釈を行った結果、検査系の陽性検出は基質（NK培地）と細胞（10^{6}/mL）の影響を受けています。幹細胞と293細胞も同様の結果で、データは示されなかったです。

基質および細胞の検査への影響の検証（増幅Ct値）				
	DEPC水		NK細胞含有NK培地	
CFU/mL	細菌	内部品質管理	細菌	内部品質管理
5	32.31	31.41	31.09	32.22
1	33.86	32.13	33.19	33.46
0.5	34.14	31.15	35.44	32.71
0.1	35.38	31.35	35.56	32.03
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt

6)キットの陰性と陽性の適合率の検証

当社製陰性を確認した培地サンプル、サンプリングチューブサンプルを陰性サンプルとして用いて陰性適合率の検証を行い､10ロット計151個の陰性サンプルを検査した結果､陰性適合率は100%でした。

ロット	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
陰性サンプル数	13	15	16	15	17	12	12	19	23	10
初期測定陽性	0	0	2	1	2	0	0	0	1	0
再検査陽性	-	-	0	0	0	-	-	-	0	-
陰性適合率	100%									

*検査の操作過程は必ず無菌と無核酸を厳格に制御し、高頻度の再検査を避けなければならないです

陽性試料として100 CFU/mLの細菌5種を用いて陽性適合率検証を行い、各菌株を10回検査した結果、陽性適合率は100%でした。

菌種（100 CFU/mL）	黄色ブドウ球菌	スポリウム菌	緑膿菌	大腸菌	サブティリス菌
陽性率	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
陽性適合率	100%				

4.4 再現性

本検査キットは3ロットを繰り返し製造し、抽出後の5種類の100 CFU/mL検証菌を検出した。結果は以下の表に示し、100 CFU/mLの5種類の検証菌を安定して検出することができ、しかも3ロットの結果は一致し、キットの再現性は良好で、CV<10%でした。

検出限界と再現性検証結果（増幅Ct値）

	バッチ1		ロット2		ロット3	
菌種	細菌	内部品質管理	細菌	内部品質管理	細菌	内部品質管理
サブティリス菌	32.04	30.04	35.19	29.53	35.91	31.79
スポリウム菌	25.46	29.59	28.01	29.13	26.32	33.80
大腸菌	30.46	31.10	30.59	29.56	30.28	31.63
緑膿菌	34.10	32.00	33.72	29.75	32.11	31.11
黄色ブドウ球菌	35.92	31.39	40.55	29.40	38.65	30.59
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt
NTC	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt	NoCt