

ヒタザイム C.ニューモノエ Ab-IgM

この添付文書をよく読んでからご使用下さい。

【はじめに】

クラミジア ニューモノエ (*Chlamydia pneumoniae*) は、呼吸器感染症を引き起こす病原体の一種として注目されています。クラミジア ニューモノエは、近年までクラミジア シンダシの亜種として考えられていましたが、1989年に第3のクラミジア種として確立されました¹⁾。

クラミジア ニューモノエは、人を宿主として急性、慢性的上気道炎、気管支炎、肺炎等の呼吸器疾患を引き起こし、その感染状況として世界的に抗体保有率が高く、健康成人の50~60%がクラミジア ニューモノエに対する抗体を保有していること、また日本国内でも呼吸器感染症患者の74%がクラミジア ニューモノエに対する抗体を保有していること、家族内感染や幼稚園、小中学校における集団感染などが報告されています²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

クラミジア ニューモノエ感染症の診断は、咽頭擦過物等を試料とする抗原検査法と、血清を用いる抗体検査法があります。この抗体検査法には、検体採取の容易さと患者に苦痛や不快感を与えない利点があります。抗体検査法には現在Wangらによるmicroimmunofluorescence test (Micro-IF法)⁷⁾がありますが、抗原の作成、調製が煩雑であり、結果判定も蛍光顕微鏡による肉眼判定のため熟練を要します。

そこで、これらの問題点を解消した操作簡便で多数検体処理可能な血清中の抗クラミジア ニューモノエIgM抗体検出キット「ヒタザイム C.ニューモノエAb-IgM」を開発致しました⁸⁾⁹⁾。

Graystonらによれば、抗体保有率が急激に上昇する学童期から青年期には初感染が多く、成人では初感染と再感染あるいは再燃が含まれ、高齢者ではほとんど再感染か再燃であり合併症を伴って重症化することが多いとされています。また、初感染では多くが軽症で、それがゆえに適切な治療が行われず慢性化しやすく、再感染時の方が症状がより顕著に出現する傾向があるとされています¹⁰⁾¹¹⁾。

このことから、初感染時に上昇するIgM抗体を検出することにより、感染の慢性化や感染の拡大が起きないように早期に適切な治療を行える可能性があるため、本品の診断的意義は高いと考えられます。

今回開発致しました「ヒタザイム C.ニューモノエAb-IgM」は、血清中の抗クラミジア ニューモノエIgM、IgA抗体検出キット「ヒタザイム C.ニューモノエAb-IgG、Ab-IgA」に続き、酵素免疫測定法により血清中の抗クラミジア ニューモノエIgM抗体を迅速、簡便に検出できるキットです。

【特徴】

1. 抗クラミジア ニューモノエIgM抗体を検出できます。
2. 検出結果がインデックスで示されるため、顕微鏡観察のような判定の難しさはなく、多数検体処理が可能です。
3. 患部からの検体採取が困難な疾患の診断において有用です。

【一般的な注意】

1. 本製品は、体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないで下さい。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断して下さい。
3. 添付文書以外の使用方法については保証を致しません。
4. 陰性及び陽性対照血清には、ヒト由来成分が含まれており、感染の危険があるので感染性のあるものとして取扱って下さい。
5. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用して下さい。
6. 本製品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが、反応停止液には3mol/L NaOHが含まれていますので、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けて下さい。

【形状・構造等(キットの構成)】

- | | |
|---|------------|
| (1) クラミジア抗原固定化プレート* | 96ウェル (1枚) |
| (2) 陰性対照血清 (IgM) * | 2.5mL (1本) |
| (3) 陽性対照血清 (IgM) * | 2.5mL (1本) |
| (4) ラテックス液* | 3mL (1本) |
| (5) 酵素標識抗ヒトIgM抗体*: アルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgM抗体
(ヤギ由来ポリクローナル抗体)を18µg/本含有 | 6mL (2本) |
| (6) 洗浄液原液* | 100mL (1本) |
| (7) 基質剤: p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 | 12錠 (1本) |
| (8) 基質剤溶解液原液 | 13mL (1本) |
| (9) 反応停止液: 3mol/L NaOH
*: アジ化ナトリウム含有 | 5mL (1本) |

【付属品】

- | | |
|---------------|------------|
| (1) プレートシール | (3枚) |
| (2) 検体希釈用プレート | 96ウェル (1枚) |

【使用目的】

血清中の抗クラミジア ニューモノエIgM抗体の検出 (呼吸器感染症の疑いのある者のクラミジア ニューモノエ感染の診断の補助)

【測定原理】

ヒタザイム C.ニューモノエAb-IgMは酵素免疫測定法 (ELISA) により血清中の抗クラミジア ニューモノエIgM抗体を検出するキットです (検出原理を図1に示します)。

クラミジア ニューモノエYK-41株より精製したクラミジア外膜抗原を固相化したマイクロプレートのウェル内で検体中の抗クラミジア ニューモノエ抗体と反応させ、さらにアルカリフォスファターゼを標識した抗ヒトIgM抗体を反応させるとウェル内で抗体量に応じた固相抗原-抗体-標識抗体の免疫複合体が形成されます。これに基質 (p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物) を加えると検体中の抗体量に応じてp-ニトロフェノールが生成します。これを405nmの波長で吸光度を測定し、抗クラミジア ニューモノエ抗体の検出を行います。判定は陰性対照血清の吸光度から求めたカットオフ値と対比して行います。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法
 - (1) 検体は冷蔵保存 (2~10℃) を厳守し、7日以内に測定して下さい。
 - (2) 検体の凍結融解は5回以内を厳守して下さい。
2. 交叉反応性について⁹⁾
 - (1) 本試薬は抗クラミジア シンダシIgM抗体との交叉反応性があり、抗クラミジア ニューモノエIgM抗体陰性でも抗クラミジア シンダシIgM抗体を有する検体の場合、陽性と判定されることがあります。
 - (2) 本試薬は抗クラミジア トラコマチスIgM抗体との交叉反応性が若干あり、抗クラミジア ニューモノエIgM抗体陰性でも抗クラミジア トラコマチスIgM抗体を有する検体の場合、陽性と判定される可能性があります。

3. 妨害物質の影響

妨害物質と考えられる乳ビは2,000ホルマジン濁度、非抱合型ビリルビンは25mg/dL、抱合型ビリルビンは25mg/dL、リウマチ因子は500IU/mL、溶血ヘモグロビンは500mg/dL存在下で測定値に影響を与えませんでした。

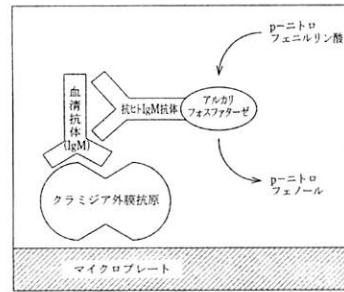


図1 検出原理

【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬類の調製法
 - (1) 洗浄液
洗浄液原液を精製水で10倍に希釈して洗浄液とします。
もし洗浄液原液に結晶が析出している場合は、37℃に加熱し溶解後希釈して下さい。
 - (2) 検体処理液 (用時調製)
ラテックス液1容に洗浄液7容を加え、撪拌混合して検体処理液とします。
(たとえば、ラテックス液2.5mLに洗浄液17.5mLを加え、撪拌混合して検体処理液とします。)
使用前に20~25℃に戻してから調製し、調製後は60分以内に使用して下さい。
なお検体処理液は使用前に撪拌してから使用して下さい。
 - (3) 基質液 (用時調製)
基質剤溶解液原液1mLに対し精製水4mLを加えて基質剤溶解液とします。
この基質剤溶解液5mLに対し、基質剤1錠を加えて溶解し基質液とします。
使用前に20~25℃に戻してから調製し、調製後は60分以内に使用して下さい。
2. 使用器具
ヒタザイム C.ニューモノエAb-IgMの使用に際し、次の器具類を用意して下さい。
 - ①マイクロピペット (10, 25, 100, 200, 1000µL) 及び使い捨てチップ
 - ②25~250µL可変連続分注器またはマルチチャンネルピペット
 - ③吸引ピンまたはマイクロプレート用洗浄器
 - ④マイクロプレートリーダー (405nm)
 - ⑤ピーカー (30~50mL)
 - ⑥インキュベーター (37℃)
 - ⑦プレートミキサー
 - ⑧ボルテックスミキサー
3. 測定操作法
 - (1) 検体の前処理
①検体は直前に20~25℃に戻し、ボルテックスミキサーでよく撪拌して下さい。
②検体を使用直前に撪拌した検体処理液で21倍に希釈し、20~25℃で10分間静置にて反応して下さい。(たとえば、検体10µLに検体処理液200µLを加え、よく撪拌し、20~25℃で10分間静置にて反応して下さい。)
 - (2) 検体血清との反応
①マイクロプレートを袋から取り出し、使用するストリップ分だけシールを剥がして内部の保護液を捨て、紙タオルに叩きつけて水分をとって下さい。
②ブラנק用として洗浄液を1ウェル、陰性対照血清を2ウェル、陽性対照血清を2ウェルに各100µLずつ分注し、以降希釈検体をそれぞれ100µLずつ分注して下さい。
なお陰性対照血清及び陽性対照血清は希釈しないでそのまま使用して下さい。
③プレートシールを貼り、インキュベーター (37℃) 中に静置し60分間反応させます。
④反応後、プレートシールを剥がし、各ウェルの試薬を吸引ピンまたはマイクロプレート用洗浄器で除去します。次に、洗浄液を各ウェルに300µL分注し、3回洗浄して下さい。
⑤反応後、紙タオルに叩きつけて水分をとって下さい。
 - (3) 抗体液との反応
①酵素標識抗ヒトIgM抗体100µLを各ウェルに加えます。
②プレートシールを貼り、インキュベーター (37℃) 中に静置し60分間反応させます。
③反応後、プレートシールを剥がし、各ウェルの試薬を吸引ピンまたはマイクロプレート用洗浄器で除去します。次に、洗浄液を各ウェルに300µL分注し、3回洗浄して下さい。
④反応後、紙タオルに叩きつけて水分をとって下さい。
 - (4) 基質液との反応
①各ウェルに基質液100µLずつ加えます。
②20~25℃で正確に10分間反応させます。
③反応後、反応停止液を25µLずつ各ウェルに加えます。
④マイクロプレートをプレートミキサーにのせ、2分間静かに混和して下さい。
 - (5) 吸光度測定
マイクロプレートリーダーで405nmでの吸光度を測定します。

【測定結果の判定法】

1. ブラנקの吸光度をすべての吸光度から差し引いて下さい。
(例) ブラークの吸光度を差し引く
- | | 測定吸光度 | ブラーク補正吸光度 |
|--------|-------|-------------|
| ブラーク | 0.085 | 0.085-0.085 |
| 陰性対照血清 | 0.087 | 0.087-0.085 |
| " | 0.089 | 0.089-0.085 |
| 陽性対照血清 | 0.803 | 0.803-0.085 |
| " | 0.789 | 0.789-0.085 |
| 検体 1 | 0.432 | 0.432-0.085 |
| ... | ... | ... |
2. 陽性対照血清の平均吸光度を求め、下記の算式に従って補正係数を求めて下さい。
※ 陽性対照血清の表示値は、ロットごとに異なりますので、試薬のラベルに記載された表示値を用いて演算して下さい。
- $$\text{補正係数 (K)} = \frac{\text{陽性対照血清の表示値}}{\text{陽性対照血清の平均吸光度}}$$
- 補正係数 (K) が0.6~1.8以内であることを確認し、範囲外の場合には試験不成立とし再度試験を実施して下さい。
3. カットオフ値を下記の算式に従って求めて下さい。

$$\text{カットオフ値} = (\text{陰性対照血清の平均吸光度} \times K) + 0.30^*$$
 * : 呼吸器症状のない健康小児の血清79検体を用いて設定したカットオフ吸光度 (平均吸光度 + 2SD)
 4. 検体の吸光度を下記の算式に従って補正して下さい。

$$\text{検体吸光度補正值} = \text{検体の吸光度} \times K$$
 5. カットオフインデックスを下記の算式に従って求めて下さい。

$$\text{インデックス} = \frac{\text{検体吸光度補正值}}{\text{カットオフ値}}$$

※※6. 下記の判定表に従い、検体を判定して下さい。ただし、0.90~1.09のインデックスを示す検体は判定保留とし、再度新しく採血した血清により再検査し、判定して下さい。また再検査で再度(±)となった場合には陽性を疑い、疑陽性として下さい。

インデックス	測定結果
1.10以上	(+)
0.90~1.09	(±)
0.90未満	(-)

※ 抗体測定においては、ウィンドウ・ペリオド(感染後抗体が検出できる量までになる期間)及び免疫機能低下により抗体産生能が低下している場合では、測定結果が陰性になる場合もあります。
 ※ 自己免疫疾患患者の血清では、免疫反応の場合、非特異的反応が起こりうるので測定結果に基づく診断は、他の検査や臨床所見等を考慮して総合的に判断して下さい。

※※7. 下記の「肺炎クラミジア(*C.pneumoniae*)急性感染症診断基準^{[21][22]}」として報告されている診断基準及び他の検査や臨床所見等を考慮して、総合的に判断して下さい。

※※ 「肺炎クラミジア(*C.pneumoniae*)急性感染症診断基準^{[21][22]}」

- ①病原体検出
 ・ 確認: 分離培養 or PCR 陽性
 ・ 疑診: 抗原陽性 (IDEIAなどEIA法は、現在、属特異抗原検出法のみである)
 ②血清診断

急性感染	検体	抗体価	ヒタザイム C,ニューモニエAb	Micro-IF法
確認	シングル血清	IgM	ID ⁱⁱ ≥ 2.00	≥ 32倍 ⁱ
	ペア血清	IgG	ID1.35以上の上昇	4倍以上の上昇
疑診	シングル血清	IgA	ID1.00以上の上昇	—
		IgM	1.10 ≤ ID < 2.00	—
		IgG	ID ≥ 3.00	≥ 512倍
		IgA	ID ≥ 3.00	—

i) IDは吸光度から換算したインデックス。 ii) リウマチ因子陽性の場合には偽陽性に注意。

確認: 現時点での感染あるいは比較的近い時期の感染の可能性が高い。
 疑診: 確認とは言えないが、感染の可能性があり、他の臨床所見や検査結果などを基に総合的に判断する。

注) 血清診断においては、抗体価上昇まで比較的時間を要する場合や、一旦上昇した高抗体価が長期間持続する場合もあるので、他の検査や臨床所見等を考慮して、総合的に判断して下さい。

【性能】

1. 性能
 (1) 感度
 自社施設において、陰性管理血清^[23]を用いて測定した場合のインデックスは0.00~0.10であり、陽性管理血清 I^[23]を用いて測定した場合のインデックスは2.20~3.30を示します。
 ※ (2) 正確性
 自社施設において、陰性管理血清^[23]を用いて測定した場合、そのインデックスは常に陰性の結果が得られ、また陽性管理血清 II^[23]を用いて測定した場合、常に陽性の結果が得られました。
 (3) 同時再現性
 自社施設において、陽性管理血清 I、II^[23]を各10回同時に測定した場合のインデックスの変動係数は20%以下でした。
 脚注) 陰性管理血清の抗体価は標準法 Micro-IF 法にて8倍未満であり、陽性管理血清 I の抗体価は128倍、陽性管理血清 II の抗体価は16倍である。
 ※ (4) 測定範囲: 測定値の一例です。
 最小検出感度はMicro-IF法単位で2倍でした。
 2. 臨床性能試験におけるMicro-IF法との相関性²⁾
 クラミジア ニューモニエ感染の可能性のある呼吸器感染症を有する患者血清418検体を用いて、本試薬によるIgM抗体の測定値と標準法Micro-IF法の抗体価(16倍以上を陽性)による相関性(一致率)を検討した結果、以下の結果(表1)が得られました。

表1 本試薬とMicro-IF法との一致率

	Micro-IF法		計
	+	-	
本品	+	12	61 (14.6%)
	-	313	357 (85.4%)
計	93 (22.2%)	325 (77.8%)	418 (100%)

(一致率)
 陽性一致率: 49 / 93 = 52.7%
 陰性一致率: 313 / 325 = 96.3%
 全体一致率: 362 / 418 = 86.6%

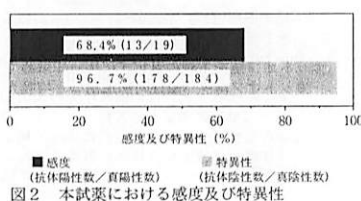
両法による判定不一致検体(56検体)についてウェスタンブロット法による確認試験を行い、クラミジア ニューモニエ種特異的な43, 46, 53kDa蛋白のうちいずれか一つでも反応性を認めたものを抗体陽性とした結果、本試薬とウェスタンブロットとの陽性一致率は50% (6/12)、陰性一致率は、84.1% (37/44)、全体の一致率は、76.8% (43/56) でありました。

3. 臨床性能試験における感度及び特異性
 初診時の検体255例を対象とし、抗原陽性かつMicro-IF法で抗体陽性例をクラミジアニューモニエ真陽性例として、本試薬による抗体陽性率(感度)を求め、抗原陰性かつMicro-IF法で抗体陰性例をクラミジア ニューモニエ真陰性例として、本試薬による抗体陰性率(特異性)を求めました。

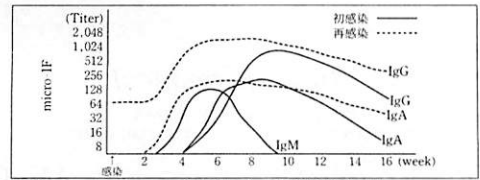
表2. 図2にIgM抗体の感度及び特異性を示しました。
 真陽性例(抗原陽性かつMicro-IF法でIgM抗体陽性)が19例あり、そのうち本試薬による抗体陽性は13例で、その感度は68.4% (13/19) でありました。また、真陰性例(抗原陰性かつMicro-IF法でIgM抗体陰性)が184例であり、そのうち本試薬による抗体陰性は178例で、本試薬によるIgM抗体に対する特異性は96.7% (178/184) でありました。なお対象とした255例のうち、真陽性19例と真陰性184例の合計は203例であり、残り52例(抗原陽性かつMicro-IF法陰性が14例、抗原陰性かつMicro-IF法陽性が38例)は真陽性でも真陰性でもないため、本検討からは除外しました。

表2 本試薬における感度及び特異性

	抗原・Micro-IF法		計
	+	-	
本品	+	6	19
	-	178	184
計	19	184	203



4. 抗体価推移パターン
 典型的な抗体価推移パターンを図3に示しました^[11]。



【使用上または取扱い上の注意】

- 取扱い上(危険防止)の注意
 - 操作中は、保護具(手術用ゴム手袋、マスク、安全メガネ等)を使用して下さい。
 - 検体は、HIV、HBV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取扱って下さい。また、本試薬中の陰性及び陽性対照血清は、認可試薬を用いてHBs抗原、HCV抗体及びHIV抗体陰性であることを確認しておりますが、現在の試薬方法では絶対に感染しないという保証はできませんので、検体同様感染の恐れがあるものとして、取扱って下さい。また、口によるビベッティングは行わないで下さい。
 - 本製品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれていますので、誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けて下さい。その他試薬の場合にも、同様の措置を行って下さい。
 - 反応停止液に3mol/L NaOHを用いておりますので、皮膚などに付着しないよう十分注意して下さい。万一、付着した場合には十分水で洗い流して下さい。
 - キット中の容器、付属品等は他の目的に転用しないで下さい。
- 使用上の注意
 - 本試薬は凍結すると使用できなくなることがありますので、冷蔵保存(2~10℃)を厳守して下さい。
 - 使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
 - 本試薬開封後はなるべく早く使用し、保存する場合には蓋をしめて貯法に従い保存して下さい。
 - ロットの異なる試薬を混ぜて使用しないで下さい。
 - 試薬は20~25℃に戻してから使用し、直射日光は避けて下さい。
 - 検体間の汚染を防ぐため、検体ごとにマイクロピペットのチップを取り替えて下さい。
 - クラミジア抗原固定化プレートのシールを、使用するストリップだけ切り離し、シールを剥がし内部保護液を除去した後、直ちに使用して下さい。未使用のストリップは2~10℃で保存して下さい。
 - 一度使用したストリップは未使用のウェルがあっても使用しないで下さい。
 - プレートのウェル底面に手を触れたり、強く擦りつけたりしないで下さい。
 - ウェル洗浄に吸引ピン等の洗浄器を使用する場合、洗浄ノズルの先端がウェル底面に触れないようにして下さい。
 - 基質液は調製後必ず60分以内に使用して下さい。
 - 基質液添加から反応停止液添加までの基質反応時間を一定にするため、基質液との反応時間(10分間)は正確に守って下さい。
- 廃棄上の注意
 - 検体や検体に接触した器具、試薬及び試薬容器等にはHIV、HBV、HCV等の感染の危険性がある場合がありますので、廃液、使用済み器具等はオートクレーブ等で滅菌処理するか、又は1%次亜塩素酸ナトリウムなどの消毒剤に浸して処理して下さい。また、検体などが飛散して拭き取りの必要性が生じた場合には、消毒用アルコール等を用いて処理して下さい。
 - 本試薬中に、アジ化ナトリウムを含む試薬があります。アジ化ナトリウムは鉛または銅と反応し爆発性のアジ化金属を生産することがありますので、廃液を処理する時は、大量の水で希釈して下さい。
 - 試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理して下さい。

【貯蔵方法・有効期間】

- 貯蔵方法 2~10℃に保存
- 有効期間 18箇月
 ※使用期限は、外装に記載してあります。

【包装単位】

1キット(96テスト分)

【主要文献】

- Grayston J.T., et al.: *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int. J. Sys. Bacteriol. 39: 88-90, 1989.
- 岸本寿男: *Chlamydia pneumoniae* (TWAR株) 感染症に関する研究(第2報) - 健康者及び急性呼吸器感染症患者における血清疫学的検討, 感染症誌, 64: 986-992, 1990.
- Grayston J.T., et al.: A new respiratory tract pathogen: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. J. Infect. Dis. 161: 618-625, 1990.
- Grayston J.T.: Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Clin. Infect. Dis. 15: 757-763, 1992.
- Kanamoto Y., et al.: Prevalence of antibody to *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR in Japan. J. Clin. Microbiol. 29: 816-818, 1991.
- 副島林造: *Chlamydia pneumoniae* 呼吸器感染症の臨床的検討, 感染症誌, 69: 333, 1995.
- Wang S. P., et al.: Immunological relationship between genital TRIC, Lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescent test. Am. J. Ophthalmol. 70: 367-374, 1970.
- 岸本寿男ら: ELISA法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 1. 外殻複合体を用いたELISAキットの評価, 感染症誌, 70: 821-829, 1996.
- 岸本寿男ら: ELISA法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 2. 臨床的有用性及び血清学的診断基準の検討, 感染症誌, 70: 830-839, 1996.
- Grayston J.T.: *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. Chest. 95: 664-669, 1989.
- 岸本寿男: *Chlamydia pneumoniae* 感染症の基礎と臨床 診断-血清学的診断, 化学療法領域, 12: 2250-2256, 1996.
- ※※12) 岸本寿男ら: ELISA法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 3. 血清学的診断基準の設定, 感染症誌, 73: 457-466, 1999.
- ※※13) Kishimoto T., et al.: Assay of *Chlamydia pneumoniae*-specific IgM antibodies by ELISA method-Reduction of non-specific reaction and resetting of serological criteria by measuring IgM antibodies-. Japanese Journal of Infectious Diseases 62:260-264,2009.

※※【問い合わせ先】

日立化成工業株式会社 機能性材料事業部 ライフサイエンス部門
 〒163-0449 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
 TEL (03) 5320-9380 (ダイヤルイン)
 FAX (03) 5320-9673

※※【製造販売元】 日立化成工業株式会社

〒163-0449 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
 TEL (03) 5320-9380 (ダイヤルイン)