

キット性能について

Q1. 陽転後、前処理までの経過時間はどの程度まで測定できるか？

A. 現在、検討中です。

ただ、真菌のように陽転直後に菌数が少ない菌種では、一定時間経過した方が同定率が向上する場合がございます。
逆に時間経過とともに膨らんで破裂してしまう菌種もあります。

Q2. 培養液中に 2 菌種存在した場合、2 菌種ともキャプチャー可能か？

A. いずれの菌とも結合すると考えていますが、同定の可否は MALDI-TOF MS の性能に依存します。
当キットを用いた結果として複数菌種の同定が可能になることはございません。

Q3. 保存検体の仕様は可能か？

A. 迅速同定用キットのため、基本的に保存検体の仕様は想定しておりません。
ただ、菌量や金の状態によっては使用が可能な場合もございます。

Q4. 尿や髄液中の菌体はキャプチャー可能か？

A. 血液培養検査において陽性となった血液培養液が対象です。

Q5. 同定不可能な菌種はあるか？

A. 臨床研究実施先のご施設からは、特定の菌種で同定できないとのご報告はございません。

Q6. 血液培養後の陽性ボトル以外では使用できないか？

A. 血液培養ボトルの陽転後の検体が対象です。培養前の検体では不可能です。

Q7. 菌体をキャプチャーするには最低で何個の菌が必要か？

A. MALDI-TOF MS の同定には装置の感度として、 $10^5 \sim 10^6$ cell/spot の菌量が必要です。

Q8. カチオン性粒子のマスピークは検出されるか？

A. 推奨プロトコルに従って処理し、細菌同定用のソフトで測定する場合には検出されることはほとんどありません。

キット同梱の試薬について

Q1. 試薬を使いきれないため、小分けにして保存して良いか？

A. 小分け保存はおやめください。

pH が低下すると菌との結合力が低下し、同定率に影響します。
別容器に移すことで、pH が低下しやすくなる可能性があります。
また、弊社はその際の開封後 1 ヶ月間の安定性を保証いたしかねます。

Q2. カチオン性粒子溶液と Reaction buffer を混合して保存して良いか？

A. 自己凝集が進み、菌の捕獲力が低下しますのでおやめください。
全ての試薬において、小分け保管は行わないでください。

プロトコルについて

Q1. 工程の一部変更は可能か？（上清除去をデカントにする、FA 添加量を変える、等）

- A. 推奨プロトコルは、各工程における操作方法や試薬濃度、添加量を作業間差や施設間差なく処理するために設定しています。推奨プロトコルに従って処理した場合、安定した同定結果を得ることができます。
- 各ご施設で独自に検討し、プロトコルを変更することは構いませんが、その結果について弊社は保証いたしかねます。
- あくまで、各ご施設の判断で実施してください。

Q2. Lysis buffer 添加後の遠心工程を推奨プロトコルよりも高回転（12,000rpm）にし、時間を短縮（1min）したいが問題ないか？

- A. 弊社内の検討（疑似検体）では、12,000g 以上であれば、遠心時間 1 min で、チビタンで 3min と同等の回収率でした。
- ただし、推奨プロトコルの変更になりますので、各施設の判断に委ねてください。

Q3. キット操作上、特に注意が必要なポイントはあるか？

- A. カチオン性粒子溶液と Reaction buffer の混合（手順書③）、菌液との混合（手順書⑦）時の攪拌は、ポータブルミキサー等を用い、液面が渦を巻いていることを確認してください。
- 上清除去工程（手順書⑤、⑨、⑫）の残液は同定率に影響する可能性がありますので、残液は極力少なくしてください。

Q4. 作業工程はどこで一時中断が可能か？

- A. 上清除去後（手順書⑤、⑨、⑫の終了後）は、一時中断（1 時間以内）は可能です。
- 必ず、上清を除去した後に行ってください。除去前で中断した場合、ペレットが崩れやすくなる可能性があります。
- ⑤での中断は、⑨、⑫での中断と異なり、生菌数が減少する可能性が考えられます。
- 弊社内の検討では、同定スコアへの影響がありませんでしたが、⑨、⑫と比べ、同定スコアが悪くなる可能性があります。

Q5. 遠心機、遠心条件に関する制約はあるか？

- A. 遠心条件は 2,000 g ～5,000 g に設定をお願いします。
- 2,000g 以下では、ペレットが形成され難く、また崩れやすくなります。
- 5,000g 以下では、細菌だけでなく、血液成分等も沈殿しやすくなります。
- 遠心時間は、プロトコルの指定時間より短い場合、ペレット形成が不十分になります。
- 指定時間より長い場合は、血液成分等も沈殿しやすくなります。
- ※ご施設で遠心条件を設定する場合は、「g」表記と「rpm」表記を間違わないようご注意ください。

Q6. Lysis 処理後のペレットが粘性を持っている場合の対処法はあるか？

- A. 現在、検討中です。
- 各ご施設の判断で精製水を用いた洗浄を追加し、ご検討いただく事は問題ございませんが、Lysis buffer の繰り返しのご使用は、菌体を壊す可能性がありますので本キットでは推奨いたしません。

Q7. 推奨プロトコルを守らなかった場合の影響はどうか？（※ATCC 株を用いた弊社検討結果になります。）

- ① Lysis buffer と検体を混合し放置した場合
 - A. 混合後 30 分以上経過すると、生存菌数が減少する菌種があります。
混合後はすみやかに処理を行ってください。
- ② カチオン性粒子溶液と Reaction buffer を事前に混合しておく。
 - A. 混合後、カチオン性粒子が自己凝集を起こし、菌の捕獲力が低下します。
弊社内の検討では、混合後 1 時間までは処理可能でしたが、混合後はすみやかに処理を行ってください。
- ③ カチオン性粒子溶液と Reaction buffer の混合の際に、Reaction buffer を先に入れ、後からカチオン性粒子溶液を加えた。
 - A. 攪拌がし辛くなりますが、ポータブルミキサー等を用いて、十分に（液面が渦を巻く）攪拌をすれば問題ありません。
なお、攪拌が十分にできていれば、同定率への影響はありません。
- ④ カチオン性粒子溶液+Reaction buffer に菌液を添加した状態で中断する。
 - A. 血液成分との反応が起こりやすくなります。
菌液とカチオン性粒子溶液+Reaction buffer を混合後は、速やかに遠心処理を行ってください。
作業中断は上清除去後にしてください。
- ⑤ 70%エタノールを添加した状態で中断する。
 - A. 菌が破裂し、同定不可になる可能性があります。
弊社内の検討では、添加 30 分後には同定不可になる菌種もありました。
作業中断は上清除去後にしてください。

その他

Q1. ポリマーと菌の結合イメージはどんな感じか？

- A. 菌のまわりに立体的にカチオン性粒子が結合します。
パンフレット右下の顕微鏡画像をご参考になさってください。

Q2. カチオン性粒子の結合に関する詳しい資料はあるか？

- A. 特許公開中です。（WO 2015/146487 A1）

Q3. カチオン性粒子は何でも結合するのか？

- A. カチオン性粒子自体は微生物だけではなく、血液中のタンパク質とも結合しますが、一定の条件下において微生物との反応性がより高くなるように設計してあります。

Q4. ポリマーと細菌を分離する方法は開発するか？

- A. 現在のところ予定はございません。

Q5. エタノール等の溶液類はセット販売するか？

- A. 現在のところ予定はございません。

Q6. チューブは別売りするか？

- A. 現在のところ予定はございません。

Q7. マトリクスの指定はあるか？

- A. MALDI-TOF MS メーカーの推奨するマトリクスを使用してください。
マトリクスによって得られるマススペクトルが異なる可能性があります。

Q8. ヘモグロビン由来のピークがない方が、同定スコアが高くなる理由とは？

- A. ヘモグロビンピークが高い強度で検出された場合、細菌由来のピークは検出され難くなります。
そのため、スペクトルマッチングの際に、ピークは認識されない可能性があります。
ヘモグロビンピークも含むスペクトルパターンをデータベースとマッチングさせるため、誤った菌種のスペクトルパターンと認識される可能性があります。

Q9. 論文文化はどうなっているか？

- A. 現在、準備中です。しばらくお待ちください。

Q10. 尿中細菌用キット、抗酸菌用キットを出す予定はあるか？

- A. 現在、予定はございません。