

研究用試薬

NG-Test® CARBA 5

培養コロニーからのカルバペネマーゼ KPC 型、OXA-48-like 型、VIM 型、IMP 型、NDM 型の迅速検出検査キット



* はじめに

NG-Test® CARBA 5は、医療従事者向けの迅速な研究用試薬です。5種の最も一般的なカルバペネマーゼファミリー（KPC、OXA-48-like、VIM、IMP及びNDM）を医療現場においてカルバペネマーゼ産生の腸内細菌目細菌（大腸菌、肺炎桿菌など）及び緑膿菌の純培養状のコロニーから検出し、鑑別するための視覚的な研究用多重免疫（ラテラルフロー）クロマトグラフィ検査です。

* 概要及び測定原理

β-ラクタム系抗菌薬は、腸内細菌目細菌による感染症治療における第一選択薬です。しかし、β-ラクタム環を加水分解し、抗菌薬を不活化する酵素（β-ラクタマーゼとして知られる）の産生によってその有効性が危ぶまれています。β-ラクタマーゼは Ambler 分類の4つのクラスに分類されます。クラスA、C及びDは活性部位にセリンを有するβ-ラクタマーゼ、クラスBはメタロ-β-ラクタマーゼ（MBL）とも呼ばれ、亜鉛依存性の活性部位を有します。β-ラクタム系抗菌薬が臨床診療に広く導入されてから、β-ラクタマーゼの活性範囲が広がりました。（オキシミノセファロスポリン及びモノバクタムを加水分解できるがセファマイシン又はカルバペネムを加水分解できない）拡張型の活性を有するβ-ラクタマーゼ（基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）として知られる）が1980年代に病院内で出現し、1990年代には市中でも広まるようになり、2000年代はじめにはCTX-Mファミリーに関連して拡散する[HCI]ようになりました。近年、カルバペネム系抗菌薬やペニシリン系、セファロスポリン系及びモノバクタム系薬剤を加水分解する能力を有するβ-ラクタマーゼ（カルバペネマーゼと呼ばれる）は発生率が上昇し、世界中に伝播しています。腸内細菌目細菌に認められた最も流行したカルバペネマーゼは、KPC（クラスA）、メタロ-β-ラクタマーゼIMP、VIM及びNDM（クラスB）並びにOXA-48-like酵素（クラスD）です。

本品は研究用試薬ですが、海外では体外診断用医薬品として販売されているため、製造元の添付文書には「臨床情報及び補完的診断法と共に、検査室でNG-Test® CARBA 5を使用することで、適切な抗菌薬治療の選択肢、迅速な感染対策の意思決定及び介入を補助する情報が得られます。」と記載されています。

NG-Test® CARBA 5は、5種の一般的なカルバペネマーゼ酵素（KPC（K）、OXA-48-like（O）、IMP（I）、VIM（V）、NDM（N））を細菌コロニーから複数検出する、迅速かつ視覚的な研究用多重免疫クロマトグラフィ検査です。抽出用緩衝液はコロニーと混合する際に細菌の細胞溶解液として使用します。5種のカルバペネマーゼをそれぞれ個別に認識するモノクローナル抗体を、ニトロセルロース膜上に固相しています。遊離モノクローナル抗体はコンジュゲートパッドに存在し、金コロイドで標識されています。抽出用緩衝液と混合したコロニーをサンプルパッドに添加すると、ニトロセルロースの毛細管作用により、テストストリップ上の移動抗体及び固相抗体を通してサンプルが展開されます。固相化されたコントロール抗体は、他のテストラインに結合することなく、サンプルパッド及びニトロセルロースを通過したすべての移動抗体を捕捉します。コントロールゾーン（C）に赤い線が1本現れ、テストゾーン（K、O、V、I、N）に1本以上の線が現れた場合は陽性と判定され、サンプル中に1種以上のカルバペネマーゼが含まれていることを示します。コントロールラインのみ認められた場合は陰性と判定され、サンプル中に5種のカルバペネマーゼのいずれも含まれていないことを示します。コントロールラインが表示されない場合、検査結果は無効です。

* 形状・構造等（キットの構成）

構成試薬

- テストカセット・・・・・・・・・・ 20テスト
- 菌液調製用チューブ・・・・・・・・・・ 20本
- 菌液採取用ピペット（100 µL）・・ 20本
- 抽出用緩衝液（4.5 mL）・・・・・・ 1本
- 使用説明書・・・・・・・・・・・・・・ 1部

その他検査に必要な材料、器材

- タイマー
- 使い捨て手袋
- * 白金耳（1 µL）
- ボルテックスミキサー

使用上の注意

- 本品は研究用試薬です。診断目的で使用しないでください。
- すべての作業は、医薬品安全性試験実施基準に従って行ってください。
- 使用期限を過ぎた場合は使用しないでください。
- テストカセットは、使用するまで密閉されたパウチに入れておく必要があります。
- 検体は感染の可能性があるものとして十分に注意をして操作を行ってください。
- 使用後のテストカセットは感染性があるものとして扱い、廃棄の際には感染性廃棄物容器に入れて廃棄してください。

- テストカセットを再使用しないでください。

保管及び安定性

テストカセットは、密閉されたパウチに入れたまま4~30℃の間で保管し、冷凍はしないでください。各キットに表示されている使用期限まで、キットはそのままの包装（乾燥剤入りの小袋）で安定しています。

培養及びサンプル採取

検査するサンプルの採取及び取り扱いにおいては、微生物に関する標準的な手順に従ってください。

妥当性確認済みの培養地

羊血液寒天培地、トリプチケースソイ寒天培地（TSA）、ミューラーヒントン（MH）寒天培地、ドリガルスキー（DRIG）乳糖寒天培地及びマッコニキ寒天培地です。

操作手順

1. 保護手袋を着用してください。
2. キットの構成品を10分間以上室温に戻してから使用ください。

サンプルの調製

1. 抽出用緩衝液5滴（150 µL）を、キットに付属の菌液調製用チューブに分注します。
2. 白金耳を使用して、培地から細菌コロニー3個を釣菌後、抽出用緩衝液150 µLの入った菌液調製用チューブに入れて懸濁します。
3. 菌液調製用チューブの蓋を閉めます。
4. 使用前に混合液が均質になるようボルテックスミキサーで攪拌します。

*注：粘性/ムコイド状のコロニーは粘性度が高いため、調製液の展開不良につながる可能性があります。粘性/ムコイド状のコロニーを用いる場合、抽出用緩衝液中のコロニーをボルテックスミキサーで3分間攪拌し、室温で10分間インキュベートしてから検査を実施します。

検査の実施

1. パウチを開封して、テストカセットを取り出します。開封後は、キットを直ちに使用します。
2. 付属の菌液採取用ピペットを使用して、調製した混合液100 µL（サンプルはピペットに表示された黒い線まで吸引してください）を「S」と表示されたサンプルウェルに添加します。
3. 15分後に結果を読み取り、以下のように判定します。

*注：偽陽性の結果が生じる可能性が高いため、20分を過ぎた場合は判定しないでください。

* 結果の判定



陰性

陰性の結果

コントロールゾーン（C）のみに赤い線が1本現れた場合：サンプルにカルバペネマーゼは含まれていない、又は検出可能なレベルのカルバペネマーゼは含まれていないため、結果は陰性と判定します。



VIM 陽性

陽性の結果

コントロールゾーン（C）に赤い線が1本現れ、テストゾーンK、O、V、I、Nに1本以上の線が現れた場合：サンプルに1種以上のカルバペネマーゼが含まれているため、結果は陽性と判定します。

注：赤い線の濃さは、サンプル中に存在するカルバペネマーゼの濃度によって異なる場合があります。線が薄くても、陽性の結果と判定してください。

無効な結果



無効

コントロールゾーン（C）に赤い線が現れなかった場合、又は文字（C）と赤い線の位置がずれている場合、検査結果は無効です。原因として考えられるのはサンプルの容量不十分又は手順の誤りです。別のテストカセットを用いて再試験を行ってください。

品質管理

本品には、内部品質管理が組み込まれています。コントロールゾーンに赤い線が現れたら、サンプルの容量が十分で手順が正しいことが確認できます。

判定上の注意

- 陰性の結果が得られても、カルバペネマーゼ産生菌の存在を否定できません（例：SME、GES、IMI）。
- 細菌分離株の複数の継代培養では偽陰性の結果が生じる可能性があります。
- * 本検査はアシネトバクター属について妥当性が確認されていません。
- * プロテウス属菌において、寒天培地上で遊走が見られる場合は3つの異なるコロニーを白金耳で釣菌してください。
- 本検査は定性的検査であるため、定量的な結果は得られません。
- 本検査は、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示す患者を迅速に同定するための補助として用いてください。得られた結果は、代替又は補助的な診断手順によって確認する必要があります。
- 検査結果が陽性又は陰性の場合いずれも他の抗菌薬耐性メカニズムを否定するものではありません。

性能及び特性

検出限界

精製された組み換え酵素を使用し、検出限界を決定しました。

KPC	600 pg/mL
OXA	300 pg/mL
VIM	300 pg/mL
IMP	200 pg/mL
NDM	150 pg/mL

***臨床評価**

NRC (National Reference Center for Antibiotic Resistance, Kremlin-Bicêtre Hospital, Paris, France) でNG-Test® CARBA 5 を評価しました。147 菌株を盲検化して検査を実施し、WGS にて特定されたβ-ラクタマーゼと比較評価しました。評価した菌株のうち、希少な2つのD179Y KPC 変異株は検出されませんでした (KPC-31 及び KPC-33)。このD179Y は、酵素のカルバペネム加水分解活性を低下させるため、カルバペネマーゼとはみなされず、生化学試験でも陰性の結果が得られました。NG-Test® CARBA 5 の感度と特異度は、変異株 KPC-31 と KPC-33 を陰性結果とすることによって算出されました。

***表1：NRC Kremlin Bicêtre で得られた結果¹¹**

		Whole Genome Sequence (WGS)		
		陽性	陰性	合計
NG-Test® CARBA 5	陽性	119	0	119
	陰性	0	28	28
	合計	119	28	147

陽性一致率	100%	95%信頼区間 = 96.9 - 100%
陰性一致率	100%	95%信頼区間 = 87.9 - 100%

***妥当性確認時におけるNG-Test® CARBA 5 が検出した変異株の要約**

微生物群	標的	妥当性確認時における検出された変異株 ^{8:11:12}
腸内細菌目細菌 ^{*1}	KPC	2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 28, 39
	OXA-48-like	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 370, 405, 436, 484, 505, 515, 517, 519, 535, 793
	VIM	1, 2, 4, 5, 6, 11, 19, 23, 27, 31
	IMP	1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 26, 47, 58
	NDM	1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 19
緑膿菌	KPC	2, 3, 5
	OXA-48-like	181
	VIM	2, 5, 11
	IMP	1, 2, 5, 7, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 26, 29, 31, 37, 39, 46, 56, 63, 71, 79
	NDM	1

***公表文献におけるNG-Test® CARBA 5 が検出した変異株の要約**

微生物群	標的	公表文献における検出された変異株 ^{8:9:10:11:12:13}
腸内細菌目細菌 ^{*1}	KPC	2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 14, 19, 23, 28, 35, 39, 78, 79
	OXA-48-like	48, 162, 163, 181, 204, 232, 244, 245, 370, 405, 436, 484, 505, 515, 517, 519, 535, 793
	VIM	1, 2, 4, 5, 6, 11, 19, 23, 26, 27, 31, 39, 46, 51, 52, 54, 56, 58, 59
	IMP	1, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 22, 26, 47, 58, 61
	NDM	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 19
緑膿菌	KPC	1, 2, 3, 5
	OXA-48-like	181
	VIM	2, 5, 11
	IMP	1, 2, 4, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 26, 29, 31, 37, 39, 46, 56, 63, 71, 79
	NDM	1

*1一部を含む：Citrobacter braakii, C. freundii, C. koseri, C. sedlakii, Enterobacter asburiae, E. cloacae, E. cloacae complex, Escherichia coli, E. hermannii, Klebsiella aerogenes, K. variicola, K. ozaenae, K. oxytoca, K. pneumoniae, Kluyvera ascorbate, Morganella morgannii, Proteus mirabilis, Providencia stuartii, P. rettgeri, Pantoea spp., Providencia alcalifaciens, Raoultella ornithinolytica, Salmonella enterica, S. senftenberg, Serratia marcescens, Shigella boydii, S. sonnei, S. bicestrii, Yersinia enterocolitica

主要文献

- Yohei D et al. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. Semin Respir Crit Care Med. 2015; 36(1): 74-84.
- Nordmann P et al. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerging Infectious Diseases. 2012; 18(9).
- Bush K et al. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010; 54(3):969-976.
- Nordmann P et al. Carbapenemases in enterobacteriaceae. Archives de Pédiatrie. 2010;17:S154-S162.
- Demir Y et al. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in Enterobacteriaceae strains. Pak J Pharm Sci. 2015; May;28(3 Suppl):1127-33.
- Oteo J et al. Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: what should be expected in the future? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014; 32 Suppl 4:17-23.
- Kulkarni MV et al. Use of imipenem to detect KPC, NDM, OXA, IMP, and VIM carbapenemase activity from gram-negative rods in 75 minutes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2014; 52(7):2500-5.
- Boutal H et al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother.
- * Baeza LL, et al. A comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae with proposal of a new algorithm. Clinical Microbiology and Infection.
- Hopkins KL, Meunier D, Naas T, Volland H, Woodford N. 2018. Evaluation of the NG-Test® CARBA-5 multiplex immunochromatographic assay for the detection of KPC, OXA-48-like, NDM, VIM and IMP carbapenemases. J Antimicrob Chemother 73:3523-3526
- Volland H et al., Improvement of the immunochromatographic NG-Test® CARBA-5 assay for the detection of IMP-variants previously undetected. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2019
- Klavins A et al. Evaluation of NG-Test® CARBA-5 with Carbapenemase producing organisms and non-carbapenemase producing organisms. CPHM 991. ASM Microbe 2019- Chicago
- * Hazim O. et al. Comparative Evaluation of Five Assays for Detection of Carbapenemases with a Proposed Scheme for Their Precise Application, The Journal of Molecular Diagnostics 2020;22(9)

記号

	内容物 20 回用		使用期限
	In-Vitro Diagnostics ※		再使用禁止
	ロット番号		カタログ参照
	使用説明書を参照		保管温度
	製造業者		0.01%アジ化ナトリウム含有

※本品は海外で体外診断用医薬品として承認されていますが、日本では承認されていません。

包装単位

NG-Test® CARBA 5 20回用 Code 07855

***お問合せ先**

〒110-0005 東京都台東区上野3-24-6
島津ダイアグノスティクス株式会社 カスタマーサポート担当
電話：03-5846-5707

NG Biotech
Z. A. Courbouton,
Secteur 1 35480 Guipry France



*販売元

島津ダイアグノスティクス株式会社

〒110-0005 東京都台東区上野 3-24-6 カスタマーサポート担当 TEL 03-5846-5707