操作は適切な方法で前処理した検体を、抗生物質サプリメントを添加した分離培養ボトルに接種し、その分離培養ボトルを上記の医療機器にセットするだけである。分離培養ボトルは自動培養され、微生物の増殖により代謝産生される二酸化炭素のモニタリングにより、検体中の微生物の存在が自動判定される。本品と上記医療機器との組合せシステムの特徴としては以下の3点があげられる。

- ①結核菌および非結核性抗酸菌の簡易迅速培養検査が可能である。
- ②微生物の増殖に伴う代謝産物である二酸化炭素を分離培養ボトル底部の二酸化炭素センサーと医療機器の光検出器で客観的に測定できる。
- ③陽性検体の場合、判定結果がリアルタイムに報告されるため、迅速な報告が可能である。

〔操作上の注意〕

1. 分離培養ボトル

- 培地は無色透明である。分離培養ボトルは使用前に必ず室温（15～30℃）に戻すこと。
- 分離培養ボトルの使用前には、必ず損傷や劣化の確認をし、損傷や液漏れのあるものは使用しない。また、ボトル底部の二酸化炭素センサーが黄色化しているものや液体培地に濁りのあるボトルは微生物汚染の可能性があるので使用しない。

2. 検体採取

分離培養ボトルへの雑菌の混入は、誤って陽性と判定される可能性があるので、抗酸菌が存在する患者検体の正確な検査のためには、正しい検体の採取、輸送、取扱い、前処理がきわめて重要である。NCCLS指針や新結核菌検査指針(2000)の手順に従って、検体の採取および処理を注意して行う。

3. 抗生物質サプリメント、再溶解液の添加および検体の接種

- 抗生物質サプリメント、再溶解液および検体は滅菌済みの注射器を使用して、無菌的に添加および接種する。また、検体は安全キャビネット内で滅菌済みの注射器を使用して無菌的に接種する。再溶解液には抗酸菌が発育するために最適な成分が含まれている。また、再溶解液にはピンク色の成分が含まれているので、抗生物質サプリメントおよび再溶解液が正しく添加されていることが確認できる。
- 検体の接種はCDCの生物安全指針レベル3の安全基準に従って、適切な防護服を着用して、安全キャビネット内で行う。
- 検体を接種した分離培養ボトルは通気する必要はない。

※4. 培養

- 検体接種後の分離培養ボトルは感染性のあるものとして取り扱う。
- 検体を接種した分離培養ボトルを医療機器にセットするのが遅れた場合は、微生物増殖の兆候をボトル底部の二酸化炭素センサーを見て確認する。微生物が増殖した場合、センサーは緑色から黄色に変化する。
- 陽性と判定された分離培養ボトルは直ちに医療機器から取り出し、抗酸性染色およびサブカルチャーを行う。
- 分離培養ボトルを医療機器にセットした後、陰性の最終判定までは42日間の培養が必要である。
- 本品と共に固形培地も平行して用いられることが望ましい。

〔用法・用量（操作方法）〕

1. 分離培養ボトル

分離培養ボトルは検体接種前に室温（15～30℃）に戻し、患者情報などを記入し使用する。

2. MASキット

検査に必要な数の抗生物質サプリメント（凍結乾燥品）に、再溶解液を無菌的に10mLずつ加えて溶解する。再溶解後、緩やかに転倒混和し、少なくとも30分以上室温（15～30℃）にて放置してから使用する。抗生物質サプリメント1本は分離培養ボトル20本分に十分な量である。再溶解した抗生物質サプリメントは2～8℃で保存した場合、7日間安定である。残った再溶解液は非汚染検体（髄液、胸水、腹水、心膜穿刺液など無菌的に採取され、雑菌が混在していないと考えられている検体）に使用するので、2～8℃で保存する。

3. 検体採取と前処理

NCCLS指針及び新結核菌検査指針(2000)等の手順に従って、検体の採取を行う。検体の前処理は喀痰についてはN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム法（NALC-NaOH法）または喀痰融解酵素剤（Semi-Alkaline-Protease：SAP）とN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウムを併用する方法（SAP-NALC-NaOH法）による雑菌汚染除去が推奨される。喀痰以外の汚染検体（気管支洗浄液、胃液など雑菌による汚染が考えられる検体）の前処理は新結核菌検査指針(2000)の喀痰以外の検体の前処理に記載の方法に従う。脳脊髄液、胸水、腹水、などのような一般細菌の混合汚染の可能性が低い検体はそのまま使用する。

<SAP-NALC-NaOH法>

- ①50mLの滅菌遠心管に喀痰検体と5倍量のSemi-Alkaline-Protease（SAP）950units/mLを分注する。
- ②よく攪拌した後、室温（15～30℃）で10分間静置する。
- ③滅菌リン酸緩衝液（0.067mol/L、pH6.8）で全体量50mLまで希釈混合し、3,000×gで20分間遠心する。
- ④遠心沈渣に1mLの滅菌リン酸緩衝液と3mLのSAPを添加し、よく攪拌した後、室温（15～30℃）で10分間静置する。
- ⑤滅菌リン酸緩衝液で全体量50mLまで希釈混合し、3,000×gで20分間遠心する。
- ⑥遠心沈渣に5mLの滅菌リン酸緩衝液を添加した後、再時調整したN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウムを10mL添加する。
- ⑦よく攪拌した後、室温（15～30℃）で15分間静置する。
- ⑧滅菌リン酸緩衝液で全体量50mLまで希釈混合し、3,000×gで20分間遠心する。
- ⑨遠心沈渣を1～2mLの滅菌リン酸緩衝液にて再浮遊させ、その0.5mLを分離培養ボトルに接種する。

※4. 検体の接種

- 分離培養ボトル上部をアルコール綿か同様のもので消毒する。再溶解した抗生物質サプリメントまたは再溶解液を分離培養ボトルに分注する前に、分離培養ボトル上部のゴム栓を乾かす。
 - 検体接種前に、汚染検体に使用する分離培養ボトルには、再溶解した抗生物質サプリメント0.5mLを無菌的に添加する。また、非汚染検体に使用する分離培養ボトルには再溶解液0.5mLを無菌的に添加する。注：次の操作からはCDCの生物安全指針レベル3の安全基準に従って、適切な防護服を着用して、安全キャビネット内で行う。
 - 前処理した検体または非汚染検体0.5mLを滅菌済みツベルクリン用注射器などを用いて、適切な分離培養ボトルに無菌的に接種する。この際、分離培養ボトルを通気する必要はない。
 - 抗酸菌に有効な消毒薬を含ませた綿か同様のもので分離培養ボトルの上部を拭き、乾いたら安全キャビネットから取り出す。
 - 平行して、固形培地への接種も行われることが望ましい。
5. 医療機器へのセット
- 検体を接種した分離培養ボトルを医療機器の取扱説明書に従って速やかにセットし、35～37℃で培養する。
6. 培養・判定
- 分離培養ボトルを医療機器にセットした後、42日間以上または陽性と判定されるまで培養する。結果は自動判定される。

〔測定結果の判定法〕

医療機器にセットした分離培養ボトルの判定は、医療機器のもつ3つのアルゴリズム（陽性判定基準）に従い自動判定される。

- 陽性と判定された分離培養ボトルは、医療機器の取扱説明書に従って取り出した後、抗酸性染色とサブカルチャーによる確認試験を行う。抗酸性染色が陽性の場合、検査室独自の抗酸菌同定法により菌種同定検査を行う。抗酸性染色が陰性の場合、グラム染色を行う。抗酸性染色とグラム染色の両方が陰性の場合、偽陽性の可能性があるので、分離培養ボトルを再設置して検査を続ける。
- 最大検査時間（42日間以上）が過ぎて陰性と判定された分離培養ボトルは、濁りがあるかどうか外観的に確認する。濁りが認められた場合は、廃棄前に抗酸性染色用とサブカルチャー用に内容物を取り出し、検査室独自の手順に従って試験を行う。

- 抗酸菌以外の菌がグラム染色で見つかった場合は、分離培養ボトルより内容物を取り出し、再度検体前処理手順に従って汚染菌の除去を行い、新しい分離培養ボトルに接種するか、再度検体を採取して検査を行う。

〔性能〕

①感度試験

下記の菌種を試験するとき、下記の日数で陽性になる。

②正確性試験

滅菌生理食塩水を試料として試験するとき陰性になる。

③同時再現性試験

下記の菌種を3回試験するとき、3回とも下記の日数で陽性になる。

菌種	菌濃度(CFU/mL)	検出時間
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC 25177	0.5mL×10 ⁸ CFU/mL	16日以内
<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	0.5mL×10 ⁸ CFU/mL	16日以内

〔相関〕

- 臨床検体1,066のうち呼吸器系検体802(喀痰605、気管支肺胞洗浄液172、気管支洗浄液24、他気管支より得た検体1)、非呼吸器系検体264(胸水64、尿64、便30、組織36、胃液19、滑液14、脳脊髄液13、腹水12、心膜穿刺液12)、環境検体（水道水）2で合計1,068検体について、それぞれの抗酸菌分離率を検討した。汚染検体(雑菌による汚染が考えられる検体)についてはN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム法（NALC-NaOH法）で前処理を行った。髄液、胸水、腹水のような一般細菌の混合汚染の可能性が低い検体はそのまま遠心分離をした。前処理及び遠心後の最終沈澱物をpH6.8のリン酸緩衝液2mLに溶解し試料とした。総検体1,068のうち陽性検体が120（呼吸器系検体106、非呼吸器系検体13、環境検体1）で対照品とほぼ同等な検出率が認められた。

	検体数	本品	対照品	Löwenstein-Jensen培地
結核菌	96	85(88.5%)	84(87.5%)	70(72.9%)
塗抹陽性	51	50(98%)	50(98%)	48(94.1%)
塗抹陰性	45	35(77.8%)	34(75.6%)	22(48.9%)
非定型抗酸菌	24	15(62.5%)	15(62.5%)	14(58.3%)
塗抹陽性	5	5(100%)	5(100%)	5(100%)
塗抹陰性	19	10(52.6%)	10(52.6%)	9(47.4%)
合計	120	100(83.3%)	99(82.5%)	84(70%)

- 本品、対照品(液体培地)、他社の抗酸菌用固形培地及びLöwenstein-Jensen培地（小川培地に準ずる卵固形培地）の4種類の少なくとも1種類の培地より菌の増殖が検出された120検体についてDNAプローブ法を利用したAccuProbeによる菌種同定における一致率は対照品が96.8%に対して本品は100%一致した。
- 抗酸菌検出時間については下記のように対照品とほぼ同等で、固形培地よりは検出時間が早いという結果を得た。

	本品	対照品	Löwenstein-Jensen培地
陽性検体(120件)	15.9日(6～44日)	13.2日(4～40日)	22.2日(13～45日)
結核菌(96件)	15.9日(6～40日)	12.6日(4～37日)	22.1日(13～45日)
非定型抗酸菌(24件)	16.1日(6～44日)	16.6日(5～40日)	22.4日(15～44日)
<i>M. kansasii</i> Genotype I(14件)	14.1日(6～24日)	8.9日(5～16日)	19.2日(15～27日)

4. 喀痰以外の検体についての検討

臨床検体5,208について喀痰と喀痰以外の検体について鏡検、Löwenstein-Jensen培地及び本品で検討した。下記の結果から本品は喀痰以外の検体においても抗酸菌を分離できることが確認された。