取扱説明書 シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット(アシネトバクター属菌用)
Cica Geneus® Acineto POT KIT

1. はじめに
本キットは、アシネトバクター属菌の菌種同定、*A. baumannii* のクローン同定および菌株識別を行なうための遺伝子型別キットです。[1] 名古屋大学の荒川宜親先生と藤田医科大学の鈴木匡弘先生が開発した PCR-based ORF Typing 法(POT 法)を元に製品化致しました。本キットでは 2 本の反応チューブを用いてマルチプレックス PCR を行ない、目的サイズのバンドの有無を判定することで、アシネトバクター属菌の菌種同定、*A. baumannii* のクローン同定(international clone Ⅰ/Ⅱ含む)および菌株識別を遺伝学的に決定します。

2. 製品形態

製品名	シカジーニアス® 分子疫学解析 POT キット(アシネトバクター属菌用) Cica Geneus® Acineto POT KIT
製品番号	08062-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (-20 ℃～-25 ℃)

3. キット構成 (30 回)

	個別名称	容量
試薬 A (ラベル白)	AptaTaq DNA Master (5×Conc.)※1	240 μL×1 本
試薬 B (ラベル赤)	PCR サプリメント	240 μL×1 本
試薬 C (ラベル紫)	プライマーミックスα	120 μL×1 本
試薬 D (ラベル緑)	プライマーミックスβ	120 μL×1 本
試薬 E (ラベル黄)	ポジティブコントロール	240 μL×1 本
試薬 F (ラベル青)	6×ローディングバッファー	240 μL×1 本

※1 AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K.の商品です。

4. 本キット以外に必要な試薬(別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニアス® DNA 抽出試薬	120 回	テンプレート調製

5. 原理
単離培養したアシネトバクター属菌から調製した DNA 抽出液をテンプレート DNA として、マルチプレックス PCR で菌種特異的 ORF(オープンリーディングフレーム)、進化の過程で取り残された Genomic Islet、外来遺伝子の遺伝子クラスターである Genomic Island を検出し、その検出パターンによって菌種同定、*A. baumannii* のクローン同定および菌株識別を行ないます。臨床分離株からは、*A. baumannii*、*A. pittii*、*A nosocomialis* および *Acinetobacter* species close to nosocomialis の 4 種類がしばしば検出されます。これらは Multilocus sequence typing (MLST)法によって多様な Sequence type (ST 型)に分類されます。本キットは MLST 法と同程度の菌株識別能力を有し、さらに *A. baumannii* の国際流行クローン(international clone Ⅰ/Ⅱ)の識別も可能です。

表1 検出 ORF の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	POT ナンバー	増幅サイズ*(bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	553	*atpA*
	A. baumannii	465	OXA-51
	A. pittii	401	Specific gene
	A. nosocomialis	362	Specific gene
	A. sp. close to 13TU	321	Specific gene
	POT 1-1	271	Genomic Islet-1
	POT 1-2	234	Genomic Islet-2
	POT 1-3	189	Genomic Islet-3
	POT 1-4	151	Genomic Islet-4
	POT 1-5	122	Genomic Islet-5
	POT 1-6	102	Genomic Islet-6
	POT 1-7	81	Genomic Islet-7
Reaction mixture 2	*A. baumannii*	565	OXA-51
	POT 2-1	457	Genomic Island-1
	POT 2-2	388	Genomic Island-2
	POT 2-3	329	Genomic Island-3
	POT 2-4	280	Genomic Island-4
	POT 2-5	237	Genomic Island-5
	POT 2-6	209	Genomic Island-6
	POT 3-1	185	Genomic Island-7
	POT 3-2	160	Genomic Island-8
	POT 3-3	139	Genomic Island-9
	POT 3-4	120	Genomic Island-10
	POT 3-5	101	Genomic Island-11
	POT 3-6	81	Genomic Island-12

PCR PC は、アシネトバクター属菌検出用の PCR ポジティブコントロールを指します。
Reaction mixture.1(RM.1)の OXA-51 検出用のプライマーは、*atpA* 検出用プライマーと結合体を形成しないような設計となっているため、RM.2 の OXA-51 検出用プライマーの PCR 増幅産物のサイズと異なります。

6. 適用範囲
アシネトバクター属菌。菌種同定は *A. baumannii*、*A. pittii*、*A nosocomialis* および *Acinetobacter* species close to nosocomialis の 4 菌種のみです。クローン同定および菌株識別は *A. baumannii* のみ適用します。

7. プロトコール
①DNA 抽出
検体中に含まれるアシネトバクター属菌を増殖可能な液体培地もしくは寒天培地(MDRA 疑いの場合はクロモアガーMDRA スクリーン培地など)で培養し、別売のシカジーニアス® DNA 抽出試薬(製品番号:08178-96)を用いて DNA の抽出を行なって下さい。

・シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用方法
1) 別途調製したシカジーニアス® DNA 抽出試薬混合液 100 μL をマイクロチューブに入れて下さい。
2) 菌液 10 μL を 1)のマイクロチューブに入れて軽く混合して下さい。液体培養の場合は、培養液の原液を使用して下さい。平板培養の場合は、コロニーを滅菌水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 1～3 番程度となるように懸濁したものを菌液として下さい。菌濃度は濃すぎないように注意して下さい。
3) 72 ℃で 6 分間、94 ℃で 3 分間インキュベートして下さい。
4) 遠心分離し、その上清をテンプレート DNA として下さい。

②PCR
各試薬を室温で融解して下さい。融解後、直ちに転倒混和もしくはタッピングで穏やかに混和してスピンダウン後、氷冷して下さい。表 2 に従って、1 検体あたり Reaction mixture 1 と 2 の 2 種類の PCR 反応液を PCR チューブに調製して下さい。ポジティブコントロール(試薬 E)を検体にする場合は、テンプレート DNA と置き換えて使用して下さい。なお、調製した PCR 反応液の室温放置は避けて下さい。

表2 PCR 反応液の調製例

PCR 溶液組成	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	8.0 μL	8.0 μL
試薬 A(AptaTaq DNA Master)	4.0 μL	4.0 μL
試薬 B(PCR サプリメント)	4.0 μL	4.0 μL
試薬 C(プライマーミックスα)	4.0 μL	
試薬 D(プライマーミックスβ)		4.0 μL
合計	20.0 μL	20.0 μL

PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、下記のパターンⅠもしくはパターンⅡの条件で PCR を行なって下さい。反応終了後は 4 ℃で保存して下さい。

パターンⅠ

94 ℃: 15 秒

94 ℃: 15 秒
60 ℃: 30 秒+8 秒※2] 25 回繰返し

※2 は下記のようにインキュベーション時間を 1Cycle 毎に 8 秒ずつ延ばして下さい。
1Cycle 目 30 秒
2Cycle 目 38 秒
3Cycle 目 46 秒
…

パターンⅡ

94 ℃: 15 秒

94 ℃: 15 秒
60 ℃: 180 秒] 30 回繰返し

③アガロースゲル電気泳動
1) 1×TBE 緩衝液を用いて、4 %アガロースゲルを作製して下さい。
2) PCR 反応後のチューブに 4 μL の試薬 F (6×ローディングバッファー)を加え、良く混合して下さい。
3) この混合液をアガロースゲルのウェルに 6 μL アプライして下さい。
4) 電気泳動条件は、100 V、60 分間程度を目安にして、ローディングバッファーに含まれるブロモフェノールブルー(青紫色)の色素がゲルから抜け出す前に電気泳動を止めて下さい。
分子量マーカーは 50 bp DNA Ladder が好適です。

取扱説明書 シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット(アシネトバクター属菌用)
Cica Geneus® Acineto POT KIT

④検出
電気泳動後のゲルを 0.5 μg/mL の臭化エチジウム溶液に約 30 分間浸し、DNA を染色して下さい。染色後のゲルは UV トランスイルミネーターを用いて観察し、泳動像を写真撮影して下さい。

8. バンドパターンの変換

バンドパターンの読み取りは濃淡に関わらず目的サイズのバンドがある場合は(1)、無い場合は(0)を解析用エクセルシート※3 に入力して下さい。参考例として図 1 の電気泳動結果を解析した例を表 3 に示します。PCR PC のバンドの検出により、アシネトバクター属菌であるか否かを判定します。次に、各菌種別のバンドの検出により菌種の識別を行ないます。
菌種別反応を除いた 19 個の増幅産物には、それぞれ POT 値 1～3 に分類される POT No.が割り振られています。また、各 POT No.には表 3 のように 1、2、4、8、16、32、64 の POT 係数が割り振られています。
POT 値 1 は POT No. 1-1～7 で検出された値(1 または 0)と POT 係数の乗算の合計値、同様に POT 値 2 は POT No. 2-1～6 の合計値、POT 値 3 は POT 3-1～6 の合計値となります。
※3 解析用エクセルシートは、弊社製品ホームページからダウンロードできます。

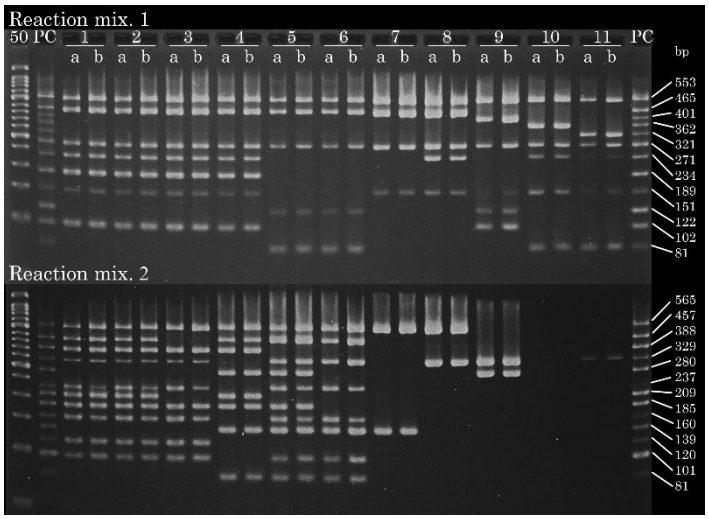

図 1　電気泳動例
下記の 11 株について POT 法解析した電気泳動パターンの実例
50: 50 bp ラダー、PC: Positive Control、1, 2: *A. baumannii* (ST2) 同一事例から得られた臨床分離株、3: *A. baumannii* (ST2)、4: *A. baumannii* (ST2) 多剤耐性 *A. baumannii*、5: *A. baumannii* (ST1) ATCC® BAA1605、6: *A. baumannii* (ST1)、7: *A. baumannii* (ST152)、8: *A. baumannii* (ST34)、9: *A. pittii* 、10: *A. nosocomialis* 、11: *A.* sp.close to *A. nosocomialis*

＊名古屋大学の荒川宜親先生と藤田医科大学の鈴木匡弘先生のご厚意により、電気泳動の実施例として本データをご提供いただきました。

表3　バンドパターンの読み取り(図 1 の電気泳動結果の場合)

	POTナンバー		係数	bp	図におけるサンプル番号 1	2	3	4	5
Reaction mixture 1	PCR PC	*Acinetobacter* positive control		553	1	1	1	1	1
	A. baumannii	OXA-51		465	1	1	1	1	1
	A. pittii	Specific gene	1000	401	0	0	0	0	0
	A. nosocomialis	Specific gene	2000	362	0	0	0	0	0
	A. sp. close to13TU	Specific gene	3000	321	0	0	0	0	0
	POT1-1	Genomic Islet-1	64	271	1	1	1	1	1
	POT1-2	Genomic Islet-2	32	234	1	1	1	1	1
	POT1-3	Genomic Islet-3	16	189	1	1	1	1	0
	POT1-4	Genomic Islet-4	8	151	1	1	1	1	0
	POT1-5	Genomic Islet-5	4	122	1	0	0	0	1
	POT1-6	Genomic Islet-6	2	102	0	0	0	0	1
	POT1-7	Genomic Islet-7	1	81	1	0	0	0	1
Reaction mixture 2	*A. baumannii*	OXA-51		565	1	1	1	1	1
	POT2-1	Genomic Island-1	32	457	1	1	0	1	1
	POT2-2	Genomic Island-2	16	388	1	1	1	1	0
	POT2-3	Genomic Island-3	8	329	1	1	1	0	1
	POT2-4	Genomic Island-4	4	280	0	0	0	1	1
	POT2-5	Genomic Island-5	2	237	1	1	1	0	1
	POT2-6	Genomic Island-6	1	209	1	1	0	1	0
	POT3-1	Genomic Island-7	32	185	1	1	1	1	1
	POT3-2	Genomic Island-8	16	160	1	1	1	0	1
	POT3-3	Genomic Island-9	8	139	0	0	0	1	1
	POT3-4	Genomic Island-10	4	120	1	1	1	0	0
	POT3-5	Genomic Island-11	2	101	1	1	1	0	1
	POT3-6	Genomic Island-12	1	81	0	0	0	1	1
	POT型			POT1	122	122	122	122	69
				POT2	59	59	26	53	46
				POT3	54	54	54	41	59

	POTナンバー		係数	bp	図におけるサンプル番号 6	7	8	9	10	11
Reaction mixture 1	PCR PC	*Acinetobacter* positive control		553	1	1	1	1	1	1
	A. baumannii	OXA-51		465	1	1	1	0	0	0
	A. pittii	Specific gene	1000	401	0	0	0	1	0	0
	A. nosocomialis	Specific gene	2000	362	0	0	0	0	1	0
	A. sp. close to13TU	Specific gene	3000	321	0	0	0	0	0	1
	POT1-1	Genomic Islet-1	64	271	1	1	1	1	1	1
	POT1-2	Genomic Islet-2	32	234	0	0	1	0	1	1
	POT1-3	Genomic Islet-3	16	189	0	0	0	0	0	0
	POT1-4	Genomic Islet-4	8	151	0	1	1	1	1	1
	POT1-5	Genomic Islet-5	4	122	1	0	0	1	0	0
	POT1-6	Genomic Islet-6	2	102	0	0	0	1	0	0
	POT1-7	Genomic Islet-7	1	81	1	0	0	0	1	1
Reaction mixture 2	*A. baumannii*	OXA-51		565	1	1	1			
	POT2-1	Genomic Island-1	32	457	1	0	0			
	POT2-2	Genomic Island-2	16	388	0	0	0			
	POT2-3	Genomic Island-3	8	329	1	0	1			
	POT2-4	Genomic Island-4	4	280	0	0	0			
	POT2-5	Genomic Island-5	2	237	1	0	0			
	POT2-6	Genomic Island-6	1	209	0	0	0			
	POT3-1	Genomic Island-7	32	185	0	0	0			
	POT3-2	Genomic Island-8	16	160	1	1	0			
	POT3-3	Genomic Island-9	8	139	1	1	0			
	POT3-4	Genomic Island-10	4	120	0	0	0			
	POT3-5	Genomic Island-11	2	101	1	0	0			
	POT3-6	Genomic Island-12	1	81	1	0	0			
	POT型			POT1	69	72	104	1078	2105	3105
				POT2	42	0	8	0	0	0
				POT3	27	8	0	0	0	0

9. 判定

PCR PC が陽性の場合、アシネトバクター属菌と判定します。各菌種別プライマーで増幅されたバンドの検出により、菌種を判定します。
POT 値 1 は Genomic islet を検出しており、流行クローンの同定の為の識別を行ないます。POT 値 1 が 1000 未満であれば *A. baumannii* 、1000 以上 2000 未満であれば *A. pittii*、2000 以上 3000 未満であれば *A. nosocomialis*、3000 以上であれば *A.* sp. close to 13TU、4000 以上であればアシネトバクター属菌だが菌種は不明と判定されます。POT 値 2, 3 は、外来遺伝子からなる遺伝子クラスターである Genomic Island を検出しており、菌株の相同性を識別します。クローン同定および菌株識別は *A. baumannii* のみに適用できます。菌種が同一かつ同一 POT 型(POT 値 1～3 の数値がすべて同一)の分離株は、水平伝播の可能性が疑われます。集団感染から得られた分離株は多くの場合、同一 POT 型となります。関連のない分離株同士が同一 POT 型になることもあるため、被検菌の検出背景(同一集団感染が疑われる要素)を加味し、総合的に判断して下さい。日本国内で分離された *A. baumannii* について POT 値 1 と MLST 法の Sequence type(ST 型)との関係を表 4 に示します。

表 4　日本国内で分離された *A. baumannii* の POT 値 1 と ST 型との関係

POT 1	ST	備考
122	ST2 (2-2-2-2-2-2-2) CC2	International clone Ⅱと推定
69	ST1 (1-1-1-1-5-1-1) CC1	International clone Ⅰと推定
8	ST33(3-5-7-1-7-1-4) CC33	
8	ST148(3-40-7-3-7-1-16)	
32	ST236slv(3-5-7-1-12-1-2) CC33	
104	ST34(8-1-14-3-12-1-13) CC34	
104	new(27-2v-2v-1-9-2-5)	
104	ST145(1-4-2-2-13-1-2) CC216	

10. 菌株識別能力

A. baumannii 81 株について、POT 法と MLST 法で識別試験を行なったところ、17 の POT 型および 18 の Clonal Complex(CC)に分類されました。分類された POT 型のうち、11 種は POT 値 1 と CC 型が 1 対 1 で対応しました。
また、臨床分離株で *A. baumannii* 以外と判定されたアシネトバクター属菌株は、POT 値 1 が菌種ごとに 3～5 の POT 値に分類されました。[2)]

11. 使用上の注意事項

1)菌株によっては非特異的なバンドが検出される場合があります。ポジティブコントロールで検出されるバンドサイズのみを判定基準として下さい(図 1)。
2)PCR 反応液は最大 50 μL 程度までスケールアップすることができます。
3)各試薬は、凍結融解を繰り返すと性能が低下する可能性があります。一度に使用しきれない場合は、小分けして-20 ℃～-25 ℃で保存して下さい。
4) PCR 反応液の室温放置は結果に影響を及ぼす可能性があります。反応液の調製は、氷上または PCR クーラーの使用を推奨します。
5)使用されるサーマルサイクラーによっては、温度制御誤差や昇温スピード等の違いにより、PCR 条件の最適化が必要な場合があります。

12. 参考文献

1) 特開 2014-207895
2) Suzuki. M. *et.al. J. Clin. Microbiol.* 52(8) : 2925-2932 (2014)

13. その他

1)本キットは試験研究用です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的には使用しないで下さい。
2)本試験法は、厚生労働科学研究費補助金　新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進事業(H24-新興-一般-010)により開発されたものです。また、本製品に関しては愛知県と名古屋大学から特許許諾を受けております。他メーカーの製品に関するライセンス・パテントについては、各メーカーにご確認下さい。

関東化学株式会社 試薬事業本部 〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 (03)6214-1090 https://www.kanto.co.jp