

## 取扱説明書

シカジーニース® CDtoxin遺伝子リアルタイムPCR検出キット  
Cica Geneus® CDtoxin Gene Real Time PCR Detection KIT

## 1. はじめに

*Clostridioides difficile* (旧名: *Clostridium difficile*) は、偏性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、芽胞を形成します。本菌は、一部の健常者の腸管にも常在しますが、抗菌薬の使用等で腸内細菌叢が乱れると異常増殖し、下痢症や偽膜性大腸炎などを引き起こすことがあります。これらの症状は、主に本菌が産生する毒素(toxin A, toxin B)によるものであり、さらに北米や欧州を中心に第三の毒素である binary toxin を産生する強毒株も報告されています。本菌は芽胞を形成することで環境中で長期間生存でき、アルコールなどに耐性を持つことから、手指やドアノブ等を介した接触感染や経口感染によって伝播しやすく、医療機関等で感染拡大が問題となっています。

本キットは 4-plex のリアルタイム PCR で、*C. difficile* の毒素遺伝子である *tcdA* (toxin A)、*tcdB* (toxin B)、*cdtA* (binary toxin) と PCR 阻害の有無を確認するためのインターナルコントロール(IC)を同時に検出します。

## 2. 製品形態

製品名	シカジーニース® CDtoxin 遺伝子リアルタイム PCR 検出キット Cica Geneus® CDtoxin Gene Real Time PCR Detection KIT
製品番号	07443-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (-25 °C ~ -20 °C)

## 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.) <sup>*1</sup> 120 μL × 1 本
試薬 B (ラベル赤)	PCR サプリメント 180 μL × 1 本
試薬 C (ラベル紫)	プライマー・プローブミックス 150 μL × 1 本
試薬 D (ラベル黄)	ポジティブコントロール 100 μL × 1 本

<sup>\*1</sup>AptaTaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K. の商品です。

## 4. 関連試薬 (別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニース® DNA 抽出試薬	120 回分	テンプレート調製
本キットは上記シカジーニース® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
717598-1	C.Diff 選択分離培地	10 枚	スクリーニング
08088-96	シカジーニース® トータル DNA プレップキット (組織用)	100 回分	DNA の精製
96930-23	CS-INL-01 滅菌ディスポーブル 1 μL	1000 本	釣菌

## 5. 原理

各毒素遺伝子と特異的に結合するプライマー及び蛍光標識プローブを用いたマルチプレックス リアルタイム PCR によって、各毒素遺伝子の増幅に伴う蛍光強度の上昇をリアルタイムに測定します。各プローブにはそれぞれ異なる蛍光色素が標識されており、検出された蛍光の種類から毒素遺伝子の種類を判定します。

## 6. 適用範囲

*C. difficile* が保有する 3 種類の毒素遺伝子 (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*)

## 7. 対応装置

FAM、VIC、ROX (Red610)、Cy5 の 4 種類の蛍光色素に対応したリアルタイム PCR 装置

社内検討にて性能確認済みの装置

- Thermo Fisher Scientific 社製 QuantStudio® 5
- Bio-Rad 社製 CFX Opus 96
- Roche Diagnostics 社製 LightCycler® 96
- Roche Diagnostics 社製 cobas® z 480 ※色補正(蛍光色素のキャリブレーション)が必須

## 8. プロトコール

## ①テンプレート DNA の調製

選択分離培地 (C.Diff 選択分離培地 (製品番号: 717598-1)) 等を用いて *C. difficile* を単離し、別売のシカジーニース® DNA 抽出試薬 (製品番号: 08178-96) を用いて菌体から DNA を抽出して下さい。また、別売の DNA 精製キットであるシカジーニース® トータル DNA プレップキット (組織用) (製品番号: 08088-96) を用いて調製した精製 DNA (1 ng/μL) もテンプレート DNA として利用できます。

\*シカジーニース® トータル DNA プレップキット (組織用) を *C. difficile* に使用する場合はバッファー GP とリゾチームが必要です。詳しくは弊社までお問い合わせ下さい。

## ・シカジーニース® DNA 抽出試薬の使用法

- 1) 別途調製したシカジーニース® 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) 分離培養によって得られたコロニーを滅菌生理食塩水に懸濁し、マクファーランド比濁法を用いて濁度標準液 第 3 番程度となるように菌液を調製して下さい。調製した菌液 10 μL を 1) のマイクロチューブに入れて軽く混和して下さい。
- 3) 72 °C で 6 分間、94 °C 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 溶液として下さい。

## ②リアルタイム PCR

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ドアウン後、氷冷して下さい。表 1 に従って PCR 反応液を PCR チューブに調製して下さい。検体と同時に必ずポジティブコントロール (試薬 D) を試験して下さい。なお、調製した PCR 反応液の室温放置は避けて下さい。

表 1 PCR 反応液の調製

試薬	液量
テンプレート DNA 溶液 <sup>*2</sup>	5.0 μL
試薬 A (AptaTaq DNA Master)	4.0 μL
試薬 B (PCR サプリメント)	6.0 μL
試薬 C (プライマー・プローブミックス)	5.0 μL
合計	20.0 μL

<sup>\*2</sup> ポジティブコントロール (試薬 D)、ネガティブコントロール (TE Buffer、ヌクレアーゼフリー水等) を検体にする場合は、テンプレート DNA 溶液と置き換えて使用して下さい。

リアルタイム PCR 用のキャップもしくはシールをした PCR チューブをリアルタイム PCR 装置にセットし、下記の条件で PCR を行なって下さい。

94 °C: 15 秒  
60 °C: 60 秒 \* } 35 回繰返し

\* 蛍光検出: FAM、VIC、ROX (Red610)、Cy5

(リアルタイム PCR 装置によっては ROX 補正を無効化する必要があります)

## 9. 判定

表 2 を参考に毒素遺伝子の有無を判定します。

ポジティブコントロールで全ての遺伝子が検出されていることを確認した上で、検体の判定を行なって下さい。ポジティブコントロールで何れかの遺伝子が検出されない場合は、試験が正常に行なわれていないため、再試験を行なって下さい。また、ネガティブコントロールで IC 以外の遺伝子が検出された場合は、コンタミネーションが疑われるため、再試験を行なって下さい。リアルタイム PCR 装置の解析ソフトによって Ct (Cq) 値が算出された場合も、必ず増幅曲線が立ち上がっていることを確認した上で判定を行なって下さい。検体で IC が検出されない場合は、PCR 阻害による偽陰性が疑われるため、再試験を推奨しています。

表 2 検出対象遺伝子と蛍光検出フィルター

検出対象遺伝子 (毒素)	蛍光検出フィルター
<i>tcdA</i> (toxin A)	FAM
<i>cdtA</i> (binary toxin)	VIC
<i>tcdB</i> (toxin B)	ROX (Red610)
IC	Cy5



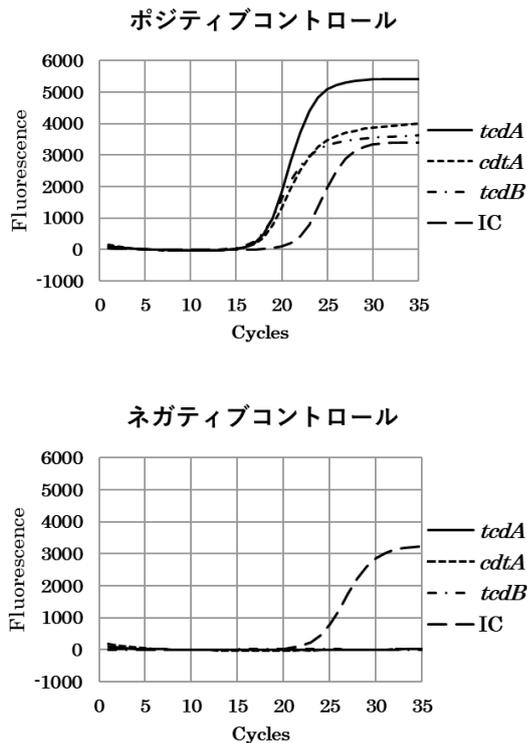


図 検出例(ポジティブコントロール(試薬 D)、ネガティブコントロールとして TE Buffer を試験した際の増幅曲線)

(Bio-Rad 社製 CFX Opus 96 Dx 使用)

## 10. 使用上の注意事項

- 1) 適用範囲の遺伝子であっても、亜型によっては検出されない場合があります。
- 2) テンプレート DNA の濃度が高すぎると偽陽性、低すぎると偽陰性を生じる可能性があります。テンプレート DNA の調製は 8. プロトコールに従って行なって下さい。
- 3) 菌株によっては、複数の毒素遺伝子を保有している場合があります。
- 4) 検体やポジティブコントロールが各試薬や PCR 反応液、ネガティブコントロールに混入しないよう注意して下さい。コンタミネーションの影響を確認するため、ネガティブコントロール(TE buffer、ヌクレアーゼフリー水等)を同時に試験することを推奨します。
- 5) 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 $-25^{\circ}\text{C}$ ~ $-20^{\circ}\text{C}$ で保存して下さい。
- 6) 試薬の小分けを行なう場合、ヌクレアーゼや試薬間のコンタミネーションを防止するため、手袋とマスクを着用して、試薬毎に新しいフィルター付きディスポーザブルチップを用いる等、操作には細心の注意を払って下さい。
- 7) 本キットには蛍光色素が含まれるため、遮光して保存して下さい。
- 8) 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。
- 9) リアルタイム PCR 装置の取扱は、それぞれの装置の取扱説明書に従って下さい。
- 10) 使用されるリアルタイム PCR 装置によっては、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。
- 11) 使用されるリアルタイム PCR 装置によっては、蛍光色素のキャリブレーションが必要となる場合があります。
- 12) PCR で  $95^{\circ}\text{C}$ 以上の加温を行なうと、DNA 合成酵素の活性が著しく低下する場合があります。
- 13) PCR チューブは必ず使用するリアルタイム PCR 装置に合わせて、推奨されたものをお選び下さい。
- 14) 増幅曲線が立ち上がっていない場合でも、ノイズや装置によるベースライン補正の影響で Ct (Cq) 値が算出されることがや、自動判定等で陽性となることがあります。必ずポジティブコントロールの蛍光強度と比較して判定を行なって下さい。

## 11. その他

- 1) 本キットは研究用として販売しております。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) 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。
- 3) 製品の仕様は、製品の改良のため変更する場合がございます。あらかじめご了承下さい。
- 4) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、関係法令に従って処理して下さい。