取扱説明書 シカジーニアス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット 2
Cica Geneus® Carbapenemase Genotype Detection KIT2

1. はじめに
カルバペネマーゼはカルバペネム系抗菌薬を含むほぼ全てのβ-ラクタム系抗菌薬を分解する酵素です。近年、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示すカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae, CPE)の増加が世界的な問題となっており、感染管理対策を講じる必要が高まってきています。[1)]本キットは、広島大学 院内感染症プロジェクト研究センター 鹿山鎮男先生、菅井基行先生、大毛宏喜先生との共同研究の成果を用いて開発されたもので、1 検体につき 2 種類のマルチプレックス PCR を行なうことで、代表的な 5 種類のカルバペネマーゼ遺伝子型の検出に加え、カルバペネマーゼ型 GES 遺伝子の検出、IMP-6 遺伝子の鑑別を行なうことができます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニアス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット 2 Cica Geneus® Carbapenemase Genotype Detection KIT2
製品番号	08158-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍保存 (-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	420 μL×1 本
試薬 C **(ラベル紫)**	プライマーミックスα (IMP-1、VIM、GES)	120 μL×1 本
試薬 D **(ラベル緑)**	プライマーミックスβ (KPC、NDM、OXA-48、IMP-6)	120 μL×1 本
試薬 E **(ラベル黄)**	ポジティブコントロール	100 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

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

4. 原理
カルバペネマーゼ遺伝子を特異的に増幅するプライマーを用いて、マルチプレックス PCR で標的配列を増幅します。増幅産物を電気泳動で分離し、目的サイズのバンドの有無でカルバペネマーゼの遺伝子型を判定します。

5. 適用範囲
カルバペネマーゼ遺伝子型 6 種類(IMP-1、VIM、カルバペネマーゼ型 GES、KPC、NDM、OXA-48)と IMP-6 遺伝子

6. プロトコール
①DNA 抽出
選択分離培地(クロモアガー mSuper CARBA 生培地(製品番号:72141))などを用いてカルバペネマーゼ産生が疑われる菌株を単離し、別売のシカジーニアス® DNA 抽出試薬(製品番号:08178-96)で菌体から 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アス® トータル DNA プレップキット(製品番号:08204-96)やフェノール/クロロホルム法など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 抽出試薬の混合液 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 1～3 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 ℃で 6 分間、94 ℃で 3 分間インキュベートして下さい。
4) 遠心分離した上清をテンプレート DNA として下さい。

注:シカジーニアス® DNA 抽出試薬の取扱説明書に記載されている培養液を菌液として混合する方法およびコロニーを直接懸濁する方法は本キットには適用できません。上記プロトコールに従って DNA 抽出を行なって下さい。

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 1 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 1 PCR 反応液の調製

試薬	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	5.0 μL	5.0 μL
試薬 A(AptaTaq DNA Master)	4.0 μL	4.0 μL
試薬 B(PCR サプリメント)	7.0 μL	7.0 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。

94 ℃: 15 秒
63 ℃: 15 秒
72 ℃: 40 秒
30 回繰返し

③アガロースゲル電気泳動
1) 1×TAE 緩衝液を用いて、2 %アガロースゲルを作製して下さい。
2) PCR 反応後の PCR 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) 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) 100 V で 30 分間程度(ミニゲル電気泳動装置の場合)電気泳動を行なって下さい。分子量マーカーは 100 bp DNA Ladder が好適です。

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。染色したゲルは UV トランスイルミネーターを用いて観察して下さい。

7. 判定

表 2 検出対象遺伝子とその増幅サイズ

	検出対象遺伝子	増幅サイズ(bp)
Reaction mixture 1	*bla* IMP-1 group	587
	bla VIM group	401
	bla GES group (カルバペネマーゼ)	228
Reaction mixture 2	*bla* KPC group	798
	bla NDM group	616
	bla OXA-48 group	442
	bla IMP-6	282

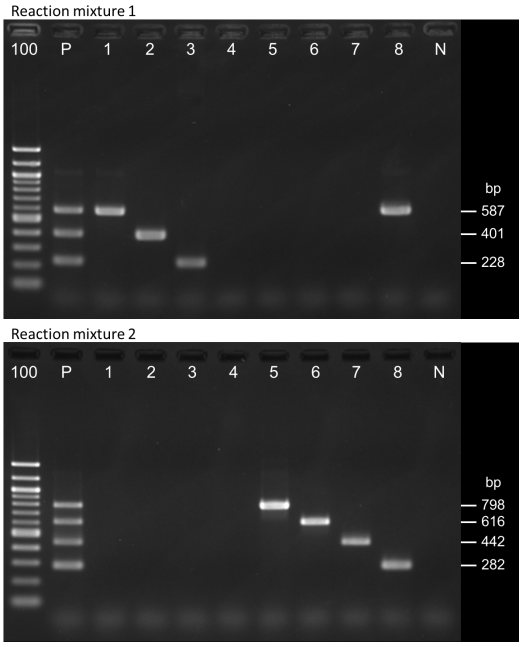

図 1 電気泳動像
下記の菌株を本キットで解析した電気泳動像
100: 100 bp DNA Ladder、P: ポジティブコントロール(試薬 E)、1: IMP-1 陽性菌株、2: VIM 陽性菌株、3: カルバペネマーゼ型 GES 陽性菌株、4: ESBL 型 GES 陽性菌株、5: KPC 陽性菌株、6: NDM 陽性菌株、7: OXA-48 陽性菌株、8: IMP-6 陽性菌株、N: ネガティブコントロール(TE 緩衝液)

取 扱 説 明 書 シカジーニアス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット 2
Cica Geneus® Carbapenemase Genotype Detection KIT2

8. 関連試薬(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
本キットは上記シカジーニアス® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
72141	クロモアガー mSuper CARBA 生培地	10 枚	スクリーニング
08204-96	シカジーニアス® トータル DNA プレップキット(組織用)	100 回	DNA の精製
01098-23	アガロース KANTO LE	100 g	電気泳動用
46509-79	10×TAE 緩衝液	1 L	電気泳動用
14575-43	臭化エチジウム溶液(2 mg/mL)	10 mL	電気泳動用
49881-60	TriDye 100bp DNA Ladder	125 回	電気泳動用
96930-23	滅菌ディスポループ 1 µL	1000 本	釣菌

機器類は、ヒートブロック、マイクロチューブおよび PCR チューブ対応型遠心機、サーマルサイクラー、電気泳動装置、UV トランスイルミネーター、ゲル撮影装置などが必要です。また、この他 0.2 mL PCR チューブ(使用されるサーマルサイクラーに合わせて、推奨されたものを必ずお選び下さい)、1.5 mL マイクロチューブ、マイクロピペット、マイクロピペット用チップ、アガロースゲル染色用トレイなどが必要です。

9. 使用上の注意事項

1) 本キットでカルバペネマーゼ遺伝子が検出されても、遺伝子の変異や発現等の影響で、抗菌薬に耐性を示さない場合があります。
2) 本キットでは、一部検出できないカルバペネマーゼ遺伝子があります(図 2)。また、適用範囲の遺伝子型であっても、亜型によっては検出できない場合があります。
3) 本キットでは、G170N または G170S の変異を持つ GES 遺伝子をカルバペネマーゼ型 GES 遺伝子、それ以外を ESBL 型 GES 遺伝子と表現しています。[2、3)]
4) 本キットでは、IMP-6 遺伝子は IMP-1 グループとしても検出されます。
5) テンプレート DNA の濃度が高いと、ESBL 型 GES 遺伝子をカルバペネマーゼ型 GES 遺伝子として、IMP-1 遺伝子を IMP-6 遺伝子として検出する可能性があります。テンプレート DNA の調製はプロトコールに従って行なって下さい。
6) クロモアガー mSuper CARBA 生培地では、カルバペネマーゼを産生しないカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae, CRE)も分離されます。
7) 菌株によっては、非特異的な増幅産物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を判定基準として下さい(図 1)。
8) 菌株によっては、複数の耐性遺伝子を保有する場合があります。
9) 菌株の保管状況によっては、プラスミド上に存在するカルバペネマーゼ遺伝子が脱落する場合があります。
10) 電気泳動の緩衝液は、TAE 緩衝液をご使用下さい。TBE 緩衝液を使用すると、電気泳動像が乱れる場合があります。
11) 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。
12) 本キットを使用する際は、同じロット番号の試薬を組み合わせて下さい。異なるロット番号の試薬を組み合わせた場合の性能は保証しておりません。
13) 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。
14) 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。PCR で 95 ℃以上の加温を行なうと、遺伝子増幅酵素の活性が著しく落ちる場合があります。

10. 参考文献

1) Kayama, S. et al. *The Infection.* **45** (1): 30 – 38, 2015.
2) Poirel, L. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (9): 2598 – 2603, 2001.
3) Wachino, J. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (8): 2905 – 2910, 2004.

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。

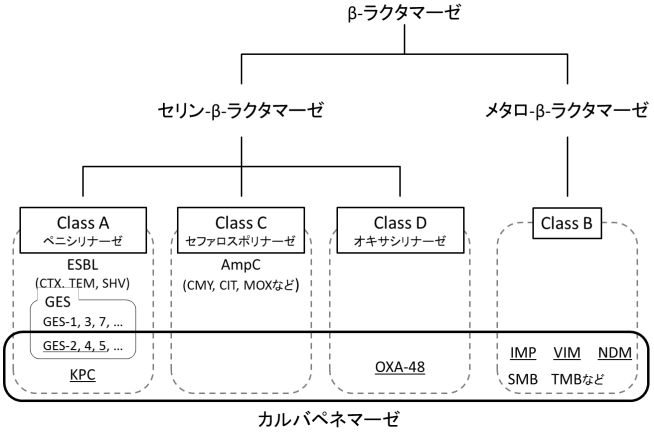

図 2 代表的なβ-ラクタマーゼの分類
本キットの適用範囲に含まれるカルバペネマーゼ遺伝子型に下線を付しています。