

取扱説明書

シカジーニース® カルバペネマーゼ遺伝子型リアルタイムPCR検出キット
Cica Geneus® Carbapenemase Genotype Real Time PCR Detection KIT

1. はじめに

カルバペネム系抗菌薬は、幅広い抗菌スペクトルと強い殺菌活性を持つことから、感染症治療の切り札と呼ばれる抗菌薬です。近年、カルバペネム系抗菌薬を分解する酵素であるカルバペネマーゼを産生するカルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌 (Carbapenemase-Producing Enterobacterales, CPE) の増加が世界的な問題となっています。カルバペネマーゼ遺伝子の多くはプラスミド上に存在し、接合伝達によって菌種を超えて伝播する危険性があります。感染拡大を防ぐためには、CPE を早期に検出し、速やかに感染対策を講じることが重要です。本キットは、2 種類の 4-plex リアルタイム PCR で、代表的な 6 種類のカルバペネマーゼ遺伝子型と 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® カルバペネマーゼ遺伝子型リアルタイム PCR 検出キット Cica Geneus® Carbapenemase Genotype Real Time PCR Detection KIT
製品番号	07515-96
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.) ^{※1} 240 µL × 1 本
試薬 B (ラベル赤)	PCR サプリメント 360 µL × 1 本
試薬 C (ラベル紫)	プライマー・プローブミックス 1 150 µL × 1 本
試薬 D (ラベル緑)	プライマー・プローブミックス 2 150 µL × 1 本
試薬 E (ラベル黄)	ポジティブコントロール 150 µL × 1 本

※1 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。			
72141	クロモアガー mSuper CARBA 生培地	10 枚	スクリーニング
72148	クロモアガー mSuper CARBA/ESBL 分画培地	10 枚	スクリーニング
08088-96	シカジーニース® トータル DNA ブレップキット (組織用)	100 回分	DNA の精製
96930-23	CS-INL-01 滅菌ディスボルブ 1 µL	1000 本	釣菌

5. 原理

各カルバペネマーゼ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、各カルバペネマーゼ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カルバペネマーゼの遺伝子型を判定します。

6. 適用範囲

6 種類のカルバペネマーゼ遺伝子型
VIM、IMP-(1, 2) group、カルバペネマーゼ型 GES、KPC、OXA-48 like、NDM

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 (クロモアガー mSuper CARBA 生培地 (製品番号: 72141)) 等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、別売のシカジーニース® DNA 抽出試薬 (製品番号: 08178-96) で菌体から DNA を抽出してください。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 ブレップキット (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® 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ください。
- 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ください。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ください。
- 3) 72 °C で 6 分間、94 °C で 3 分間インキュベートしてください。
- 4) 遠心分離し、その上清をテンプレート DNA 溶液としてください。

②リアルタイム PCR

各試薬を室温で融解してください。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、氷冷してください。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ください。検体と同時に必ずポジティブコントロール (試薬 E) を試験してください。なお、調製した PCR 反応液の室温放置は避けてください。

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 ^{※2}	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)	6.0 µL	6.0 µL
試薬 C (プライマー・プローブミックス 1)	5.0 µL	-
試薬 D (プライマー・プローブミックス 2)	-	5.0 µL
合計	20.0 µL	20.0 µL

※2 ポジティブコントロール (試薬 E)、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ください。

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 を行ってください。

94 °C: 15 秒
60 °C: 60 秒 * } 30 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 を参考にカルバペネマーゼの遺伝子型を判定します。

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、検体の判定を行ってください。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、試験が正常に行われていないため、再試験を行ってください。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、再試験を行ってください。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ってください。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。

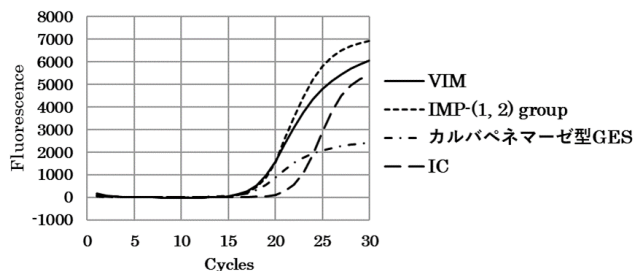
表 2 検出対象遺伝子型と蛍光検出フィルター

	検出対象遺伝子型	蛍光検出フィルター
Reaction mixture 1	VIM	FAM
	IMP-(1, 2) group	VIC
	カルバペネマーゼ型	ROX (Red610)
	GES	ROX (Red610)
Reaction mixture 2	IC	Cy5
	KPC	FAM
	OXA-48 like	VIC
	NDM	ROX (Red610)
	IC	Cy5

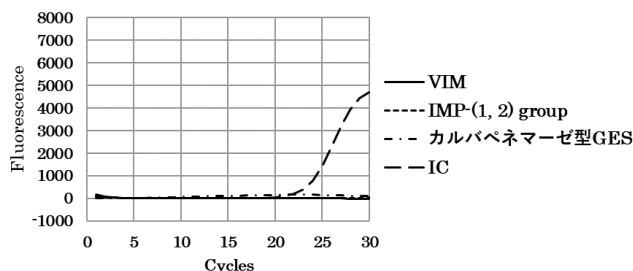


Reaction mixture 1

ポジティブコントロール

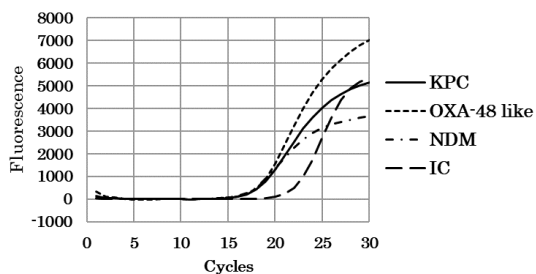


ネガティブコントロール



Reaction mixture 2

ポジティブコントロール



ネガティブコントロール

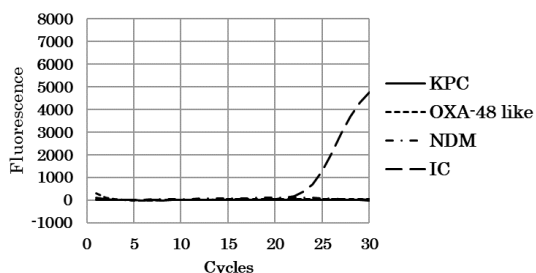


図 検出例(ポジティブコントロール(試薬 E)、ネガティブコントロールとして TE Buffer を試験した際の増幅曲線)
(Bio-Rad 社製 CFX Opus 96 Dx 使用)

10. 使用上の注意事項

- 1) 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) 適用範囲の遺伝子であっても、垂型によっては検出されない場合があります。
- 3) 本キットでは、IMP-1 group (IMP-6 を含む)、IMP-2 group をまとめて IMP-(1, 2) group として検出します。

- 4) 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。^{1), 2)}
- 5) 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ってください。
- 6) PCR のサイクル数が 30 回より多い場合、偽陽性を生じる可能性があります。PCR は 8. プロトコールに従って行ってください。
- 7) 菌株によっては、複数のカルバペネマーゼ遺伝子を保有している場合があります。
- 8) 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。
- 9) 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ください。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。
- 10) 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 °C ~ -20 °C で保存してください。
- 11) 試薬の小分けを行う場合、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ください。
- 12) 本キットには蛍光色素が含まれるため、遮光して保存してください。
- 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) 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ください。
- 15) 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。
- 16) 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。
- 17) PCR で 95 °C 以上の加温を行うと、DNA 合成酵素の活性が著しく低下する場合があります。
- 18) 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ください。
- 19) 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ってください。

11. 参考文献

- 1) Poirel, L. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (9): 2598 – 2603, 2001.
- 2) Wachino, J. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48** (8): 2905 – 2910, 2004.

12. 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ください。
- 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ください。
- 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。あらかじめご了承ください。
- 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ください。

EA260804

