取扱説明書 シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット(E. クロアカ complex用)
Cica Geneus® *E. cloacae* complex POT KIT

1. はじめに
本キットは、PCR-based ORF Typing(POT)法の原理を用いた *Enterobacter cloacae* complex (ECC)の遺伝子型別キットです。1 検体につき 2 種類のマルチプレックス PCR を行ない、検出されたバンドパターンによって、ECC のクローン同定及び菌種識別を行ないます。
E. cloacae または ECC として分離される臨床分離株の多くは、ゲノム情報に基いた正確な菌種同定(ANI 法)を実施すると *E. hormaechei*、*E. asburiae*、*E. kobei* 等として同定されることが報告されています。[1] 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 ECC の中でも分離頻度が高い *E. hormaechei*、*E. asburiae* において、MLST 法と同程度以上の菌株識別能力を有します。

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(E. クロアカ complex 用) Cica Geneus® *E.cloacae* complex POT KIT
製品番号	08376-97
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (−25 ℃～−20 ℃)

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

※1AptaTaq 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 回分	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。			
01089-23	アガロース KANTO HC	100 g	電気泳動用
46510-79	10×TBE 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

5. 原理
単離培養した ECC から DNA を抽出します。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 及び *bla* $_{IMP-1}$ group を検出し、その検出パターンによって菌種同定、クローン同定及び菌株識別を行ないます。

表1 検出 ORF の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	POT No.	増幅サイズ(bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	668	ECC 判定領域
	E. hormaechei PC	562	*E. hormaechei* 判定領域
	E. asburiae like PC	477	*E. asburiae* like 判定領域
	E. kobei like PC	399	*E. kobei* like 判定領域
	POT 1-1	313	Genomic Island-1
	POT 1-2	261	Genomic Island-2
	POT 1-3	216	Genomic Island-3
	POT 1-4	187	Genomic Islet-1
	POT 1-5	163	Genomic Island-4
	POT 1-6	141	Genomic Island-5
	POT 1-7	116	Genomic Island-6
	POT 1-8	93	*bla* $_{IMP-1}$ group
Reaction mixture 2	*E. hormaechei* PC	562	*E. hormaechei* 判定領域
	POT 2-1	410	Genomic Island-7
	POT 2-2	344	Genomic Islet-2
	POT 2-3	312	Genomic Island-8
	POT 2-4	274	Genomic Island-9
	POT 2-5	234	Genomic Island-10
	POT 2-6	202	Genomic Islet-3
	POT 2-7	163	Genomic Island-11
	POT 2-8	144	Genomic Island-12
	POT 2-9	118	Genomic Island-13
	POT 2-10	97	Genomic Island-14
	POT 2-11	82	Genomic Island-15

PCR PC は、ECC 検出用の PCR ポジティブコントロールを指します。

6. 適用範囲
Enterobacter cloacae complex。菌種同定は *E. hormaechei*、*E. asburiae* like (大部分の *E. asburiae* と一部の *E. roggenkampii*) 及び *E. kobei* like (*E. kobei* と一部の *E. roggenkampii*) の 3 種類のみ適用します。クローン同定及び菌株識別は *E. hormaechei*、*E. asburiae* like のみ適用します。*E. kobei* like、その他 ECC は簡易的なクローン同定のみ可能です。

7. プロトコール
①DNA 抽出
単離した ECC を液体培地もしくは寒天培地で培養し、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 を抽出して下さい。

・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、培養液の原液を菌液として下さい。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 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 溶液として下さい。

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 mixture1 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

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。

1ST
94 ℃: 15 秒
60 ℃: 60 秒
15 回繰返し

2ND
94 ℃: 15 秒
60 ℃: 180 秒
10 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。

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、泳動像を写真撮影して下さい。

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

取 扱 説 明 書 シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（E. クロアカ complex用）
CIca Geneus® *E. cloacae* complex POT KIT

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※に入力して下さい。参考例として図 1 の電気泳動例を解析した結果を表 3 に示します。まず、PCR PC のバンドが検出されたかどうかで、ECC であるか否かを判定します。次に、各菌種別 PC のバンドの検出により菌種の識別を行ないます。PCR PC を除いた 22 本のバンドには、それぞれ POT 値 1 と 2 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、128、256、512、1024 の POT 係数が割り振られています。POT1 値は POT No. 1-1～1-8 で検出された POT 係数の合計値、POT2 値は POT No. 2-1～2-11 で検出された POT 係数の合計値になります。

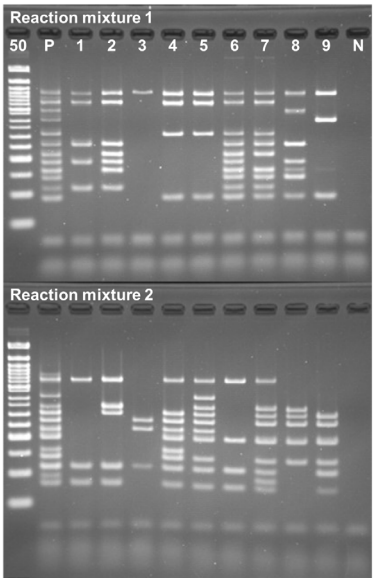

図 1　電気泳動例
下記の 9 株について POT 法で解析した電気泳動パターンの実例
50: 50 bp ラダー、P: ポジティブコントロール、1: ATCC® 700323、2: ATCC® 35030、3: ATCC® 13047、4～7: *E. homraechei* 分離株、8: *E. asburiae* 分離株、9: *E. kobei* 分離株、N: ネガティブコントロール

表3　バンドパターンの読み取り（図 1 の電気泳動例の場合）

	POT No.	bp	POT 係数	図 1 のサンプル番号 1	2	3
Reaction mixture 1	PCR PC	668	–	1	1	1
	E. hormaechei PC	562	1000	1	1	0
	E. asburiae like PC	477	2000	0	0	0
	E. kobei like PC	399	3000	0	0	0
	POT 1-1	313	128	0	0	0
	POT 1-2	261	64	1	1	0
	POT 1-3	216	32	0	1	0
	POT 1-4	187	16	1	1	0
	POT 1-5	163	8	0	1	0
	POT 1-6	141	4	0	0	0
	POT 1-7	116	2	1	1	0
	POT 1-8	93	1	0	0	0
Reaction mixture 2	*E. hormaechei* PC	562	–	1	1	0
	POT 2-1	410	1024	0	0	0
	POT 2-2	344	512	0	1	0
	POT 2-3	312	256	0	1	0
	POT 2-4	274	128	0	0	1
	POT 2-5	234	64	0	0	1
	POT 2-6	202	32	0	0	0
	POT 2-7	163	16	0	0	0
	POT 2-8	144	8	0	0	0
	POT 2-9	118	4	1	1	1
	POT 2-10	97	2	0	0	0
	POT 2-11	82	1	1	1	0
POT 型		POT1		1082	1122	0
		POT2		5	773	196

※解析用エクセル計算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。

9. 判定

PCR PC が陽性の場合、ECC 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。
POT1 値は、Genomic Island、Genomic Islet を構成する ORF と *bla* $_{IMP-1}$ group の保有パターンを示します。POT1 値が 1000 以上 2000 未満であれば、*E. hormaechei*、2000 以上 3000 未満であれば *E. asburiae* like(大部分の *E. asburiae*と一部の *E. roggenkampii*)、3000 以上であれば *E. kobei* like（*E. kobei* と一部の *E. roggenkampii*）、1000 未満であればその他 ECC と判定されます。また、菌種が *E. hormaechei*、*E. asburiae* like の場合、POT1 値は MLST 解析による ST 型と高い相関性を示します。
POT 値 2 も同様に、Genomic Island、Genomic Islet を構成する ORF の保有パターンを示します。POT1 値と POT2 値を組み合わせて比較することで、菌株識別が可能となります。同一 POT 型（POT1 値と POT2 値が同一）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 型となりますが、複数株による集団感染や同一患者が複数遺伝子型株を保有する事例も報告されています。その一方で、関連のない分離株同士が同一 POT 型になる場合もありますので、被検菌の検出背景（同一集団感染が疑われる要素）を加味して、総合的に判断して下さい。
なお、試験株の菌種が *E. kobei* like、その他 ECC の場合、POT1 値と MLST 解析との相関性は低く、同じ ST 型の菌株でも異なる POT1 値または POT 型になることや、異なる ST 型の菌株でも同じ POT1 値または POT 型を示す場合があります。

10. 菌株識別能力

E. hormaechei 57 株について、POT 法と MLST 法で識別試験を行なったところ、25 の POT 型及び 22 の ST 型に分類されました。分類された POT 型のうち、13 種は POT 値と ST 型が 1 対 1 で対応しました。POT 法の Simpson's index は 0. 950 となりました。
また、*E. asburiae* like 12 株について同様の識別試験を行なったところ、11 の POT 型及び 10 の ST 型に分類されました。分類された POT 型のうち、9 種は POT 値と ST 型が 1 対 1 で対応しました。POT 法の Simpson's index は 0.985 となりました。
特定の POT 型や ST 型が多く検出される傾向があるため、疫学的な情報も加味して慎重に判断して下さい。

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）一部の液体培地によっては PCR を阻害する場合があります。
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-25 ℃～-20 ℃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。
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。
また、PCR チューブは必ず使用されるサーマルサイクラーに合わせて、推奨されたものをお選び下さい。
6）DNA を染色する際に使用する臭化エチジウム溶液は強い変異原性と刺激性を有するため、必ず保護具を着用して取り扱って下さい。
7）*E. kobei* には複数の Type Strain（基準株）が登録されており、その中には遺伝学的に異なる系統の菌株が含まれています。本キットでは National Center for Biotechnology Information（NCBI）に *E. kobei* の Reference Sequence として登録されている Accession No. GCA_000534275.1 のゲノム配列を基準として、Average Nucleotide Identify（ANI）法で同種と判定される菌株を *E. kobei* としています。
8）テンプレート DNA の濃度が低いと *E. asburiae* like、*E. kobei* like 及びその他 ECC と判定された菌では一部のバンドが検出されなくな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。

12. 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）ECC を対象とした POT 法は藤田医科大学と特許を共同出願しております。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。
3）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。

13. 参考文献

1）松井理乃 他、日本臨床微生物学会雑誌 31(2):113-115 (2021)