

取扱説明書

シカジーニアス® ESBL遺伝子型検出キット 2
Cica Geneus® ESBL Genotype Detection KIT2

1. はじめに

ESBL(Extended Spectrum β -Lactamase: 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ)はペニシリン系やセファロスポリン系、モノバクタム系など多くの β -ラクタム系抗菌薬を分解する酵素です。近年、ESBL 産生菌は医療関連感染のみならず、市中感染や健康人の保菌が大きな問題となっており、感染管理対策を講じる必要性が高まっています。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 池田光泰先生、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 を行うことで、代表的な ESBL の遺伝子型 9 種類を検出することができます。

2. 製品形態

製品名	シカジーニアス® ESBL 遺伝子型検出キット2 Cica Geneus® ESBL Genotype Detection KIT2
製品番号	08116-96
容量	30 回分
保管温度	冷凍 (-20 °C ~ -25 °C)

3. キット構成 (30 回)

個別名称	容量
試薬 A(ラベル白) Aptaq DNA Master (5 × Conc.) ^{※1}	240 μ L × 1 本
試薬 B(ラベル赤) PCR サプリメント	420 μ L × 1 本
試薬 C(ラベル紫) プライマーミックス α (ESBL-1) (CTX-M-25, CTX-M chimera, CTX-M-1, CTX-M-8)	120 μ L × 1 本
試薬 D(ラベル緑) プライマーミックス β (ESBL-2) (SHV, CTX-M-2, CTX-M-9, ESBL 型 GES, TEM)	120 μ L × 1 本
試薬 E(ラベル黄) ポジティブコントロール	100 μ L × 1 本
試薬 F(ラベル青) 6 × ローディングバッファー	240 μ L × 1 本

^{※1}Aptaq DNA Master は、Roche Diagnostics K. K. の商品です。

4. 原理

ESBL 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 ESBL の遺伝子型を判定します。

5. 適用範囲

ESBL の遺伝子型 9 種類 (CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-8 group, CTX-M-9 group, CTX-M-25 group, CTX-M chimera, ESBL 型 GES, TEM, SHV)

6. 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-ESBL: 製品番号 72101) などを用いて ESBL 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/ μ L) 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 抽出試薬の使用法

- シカジーニアス® DNA 抽出試薬の試薬 A と試薬 B を 1 対 10 の比率で混合し、マイクロチューブに 100 μ L ずつ分注して下さい。
- 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。
- 菌液 10 μ L を 1) のマイクロチューブに入れて軽く混和して下さい。
- 72 °C で 6 分間、94 °C で 3 分間インキュベートしたものをテンプレート 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ドアウン後、水冷して下さい。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 μ L	5.0 μ L
試薬 A (Aptaq DNA Master)	4.0 μ L	4.0 μ L
試薬 B (PCR サプリメント)	7.0 μ L	7.0 μ L
試薬 C (プライマーミックス α)	4.0 μ L	—
試薬 D (プライマーミックス β)	—	4.0 μ L
合計	20.0 μ L	20.0 μ L

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 °C で保存して下さい。

94 °C: 15 秒	} 30 回繰返し
63 °C: 15 秒	
72 °C: 40 秒	

③アガロースゲル電気泳動

- 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。
- PCR 反応後の PCR チューブに 4 μ L 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。
- 混合液をアガロースゲルのウェルに 6 μ L アプライして下さい。
- 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 μ g/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	<i>bla</i> CTX-M-25 group	522
	<i>bla</i> CTX-M chimera	391
	<i>bla</i> CTX-M-1 group	268
	<i>bla</i> CTX-M-8 group	189
Reaction mixture 2	<i>bla</i> SHV	655
	<i>bla</i> CTX-M-2 group	475
	<i>bla</i> CTX-M-9 group	350
	<i>bla</i> GES (ESBL type)	228
	<i>bla</i> TEM	132

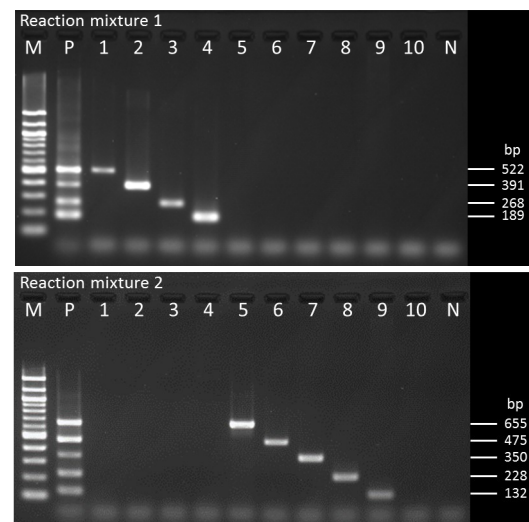


図 1 電気泳動例

下記の遺伝子型を解析した電気泳動像

M: 100 bp DNA Ladder, P: ポジティブコントロール (試薬 E), 1: CTX-M-25, 2: CTX-M-64 (chimera), 3: CTX-M-1, 4: CTX-M-8, 5: SHV, 6: CTX-M-2, 7: CTX-M-9, 8: GES-1 (ESBL 型), 9: TEM, 10: GES-2 (カルバペネマーゼ型), N: ネガティブコントロール (TE 緩衝液)



取扱説明書

シカジーニクス® ESBL遺伝子型検出キット 2
Cica Geneus® ESBL Genotype Detection KIT2

8. 関連試薬(別売)

製品番号	製品名	容量	用途
08178-96	シカジーニクス® 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クス® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
72101	クロモアガー-ESBL 生培地	10 枚	スクリーニング
72120	クロモアガーオリエンタシオン/ESBL 生培地	10 枚	スクリーニング
08204-96	シカジーニクス® 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	滅菌ディスボループ 1 µL	1000 本	釣菌

機器類は、ヒートブロック、1.5 mL 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(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)、1.5 mL マイクロチューブ、20 µL および 200 µL 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) 本キットは、旧製品(シカジーニクス® ESBL 遺伝子型検出キット, 製品番号 08112-96)と PCR 条件が異なりますのでご注意ください。
- 2) 本キットで ESBL 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。
- 3) 適用範囲の遺伝子型であっても、亜型によっては検出されない場合があります。
- 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) 本キットでは、non-ESBL の SHV 及び TEM 遺伝子も検出されます。
- 6) 本キットでは、SHV 遺伝子と相同性が高い non-ESBL の LEN および OKP 遺伝子は検出されません。
- 7) テンプレート DNA の濃度が高いと、カルバペネマーゼ型 GES 遺伝子を ESBL 型 GES 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下さい。
- 8) 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を増幅した時に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)。
- 9) 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。
- 10) 菌株の保管状況によっては、プラスミド上に存在する ESBL 遺伝子が脱落する場合があります。
- 11) 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。
- 12) 電気泳動の泳動距離が長いと、Reaction mix-1 のポジティブコントロールにおいて CTX-M-25 と CTX-M chimera のバンドの間または CTX-M-1 と CTX-M-8 のバンドの間に僅かに非特異的なバンドが検出される場合があります。
- 13) 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 °C ~ -25 °C で保存して下さい。
- 14) 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。
- 15) 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 °C 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) Poiriel, L. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45** (9): 2598 - 2603, 2001.
- 2) 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。

