取 扱 説 明 書 シカジーニアス® 分子疫学解析POTキット（黄色ブドウ球菌用）
Cica Geneus® Staph POT KIT

1. はじめに
本キットは黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*；MRSA）の分子疫学解析を行なうための遺伝子型別キットです。藤田医科大学の鈴木匡弘先生らによって開発された PCR-based ORF Typing 法（POT 法）を基に製品化しました。本キットでは 1 検体につき 2 種類のマルチプレックスPCRを行ない、目的サイズのバンドの有無を判定することで、黄色ブドウ球菌の菌種同定、クローン同定および菌株識別を行ないます。

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（黄色ブドウ球菌用） Cica Geneus® Staph POT KIT
製品番号	08180-96
容　　量	120 回分
保管温度	冷凍（-25 ℃～-20 ℃）

3. キット構成（120 回）

	個別名称	容量
試薬 A（ラベル白）	AptaTaq DNA Master (5×Conc.)※1	1,000 μL×1 本
試薬 B（ラベル赤）	PCR サプリメント	1,000 μL×1 本
試薬 C（ラベル紫）	プライマーミックスα	500 μL×1 本
試薬 D（ラベル緑）	プライマーミックスβ	500 μL×1 本
試薬 E（ラベル黄）	ポジティブコントロール	1,000 μL×1 本
試薬 F（ラベル青）	6×ローディングバッファー	1,000 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。			
72046	クロモアガーMRSA スクリーン培地	10 枚	スクリーニング培地
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

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(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、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。

5. 原理
黄色ブドウ球菌のゲノムには多くの場合 1～2 個のバクテリオファージが溶原化しています。このプロファージを構成する遺伝子は機能単位でモザイク状に組み合わされており、その組み合わせは菌株により異なります。POT 法ではプロファージを構成する遺伝子の読み取り枠（Open Reading Frame、ORF）から表 1 のように特に菌株識別に有効な ORF を選び、マルチプレックスPCRにて検出を行ない、その保有パターンから菌株を識別します。本キットでは加えてゲノム全体の遺伝的バックグラウンドを反映する ORF ならびに SCC*mec* 関連遺伝子を同時検出することで、黄色ブドウ球菌全体の菌株識別能力の向上を達成するとともに MRSA クローンの簡易同定が可能となっています。

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	*femA*	601	*S. aureus* positive control
	POT1-1	530	*mecA*
	POT1-2	449	*mec* gene complex class B
	POT1-3	355	SCC*mec* type Ⅱa specific
	POT2-1	304	Tn*554*
	POT2-2	271	Prophage-1
	POT2-3	228	Prophage-2
	POT2-4	197	Prophage-3
	POT2-5	161	Prophage-4
	POT2-6	131	Prophage-5
	POT2-7	104	Prophage-6
	POT2-8	81	Genomic Island(SaGIm)
Reaction mixture 2	*femA*	601	*S. aureus* positive control
	POT1-4	477	cassette chromosome recombinase A2
	POT1-5	388	遺伝的バックグラウンド(Genomic Islet)
	POT1-6	320	遺伝的バックグラウンド(Genomic Islet)
	POT1-7	273	*mec* gene complex class A
	POT3-1	243	Prophage-7
	POT3-2	197	Prophage-8
	POT3-3	171	Prophage-9
	POT3-4	140	Prophage-10
	POT3-5	115	Prophage-11
	POT3-6	95	Prophage-12
	POT3-7	78	Prophage-13

femA は、黄色ブドウ球菌検出用の PCR ポジティブコントロールを指します。

6. 適用範囲
黄色ブドウ球菌、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌。

7. プロトコール
①DNA 抽出
単離した黄色ブドウ球菌を増殖可能な液体培地もしくは寒天培地（MRSA 疑いの場合はクロモアガーMRSA スクリーン培地など）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 1～3 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 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 2 PCR 反応液の調製例

PCR 溶液組成	Reaction mixture 1	Reaction mixture 2
テンプレート DNA 溶液	8.0 μL	8.0 μL
試薬 A（Apta Taq 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。

94 ℃: 15 秒
60 ℃: 180 秒] 30 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。

8. 使用上の注意事項
1)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。
2)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。
3)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)。
4)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。

9. 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)本キットは愛知県から特許許諾を受けて販売しています。
3)試薬およ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。

T7316Z 1/2

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（黄色ブドウ球菌用）
Cica Geneus® Staph POT KIT

10. 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※2 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。黄色ブドウ球菌の PCR ポジティブコントロールである *femA* を除いた 22 個の増幅産物にはそれぞれ POT1～3 に分類される POT No.が割り振られています。次に、認識性向上のため POT1-POT2-POT3 からなる POT 型へ変換しますが、POT1 は POT1-1～7 で検出された POT 係数の合計値、POT2 は POT2-1～8 で検出された POT 係数の合計値、POT3 は POT3-1～7 で検出された POT 係数の合計値となります。計算は表 4 のように行ないます。

※2 解析用エクセル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。

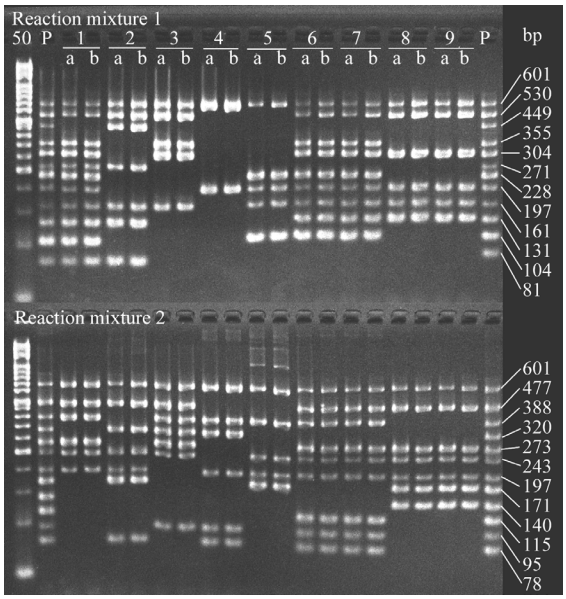

図 1　電気泳動例

下記の 9 株について POT 法解析した電気泳動パターンの実例
50: 50 bp ラダー、P: positive control、1: ATCC® 700699（MRSA Mu50）、
2: ATCC® BAA-1556（MRSA USA300）、3:ATCC® 43300（MRSA）、4: ATCC® 25923（MSSA）、5: ATCC® 29213（MSSA）、6,7: 集団感染事例 1 から得られた臨床分離株、
8,9: 集団感染事例 2 から得られた臨床分離株

泳動条件は 4 %アガロース KANTO HC(1×TBE 緩衝液)で、Mupid-exU を用いて、100 V、60 分間としました。Mupid シリーズのトレイ、25 穴のコームを使い、サンプルを 3 μL アプライし泳動しました。

＊藤田医科大学の鈴木匡弘先生のご厚意により、電気泳動の実施例として本データをご提供いただきました。

表 3　バンドパターンの読み取り(図 1 の電気泳動結果の場合)

	POT No.	bp	POT 係数	図 1 におけるサンプル番号 1	2	3	4	5	6	7	8	9
Reaction mixture 1	*femA*	601	–	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-1	530	64	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	POT1-2	449	32	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	POT1-3	355	16	1	0	1	0	0	1	1	0	0
	POT2-1	304	128	1	0	1	0	0	1	1	1	1
	POT2-2	271	64	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	POT2-3	228	32	1	0	0	0	1	1	1	0	0
	POT2-4	197	16	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	POT2-5	161	8	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	POT2-6	131	4	1	1	0	0	0	1	1	1	1
	POT2-7	104	2	1	0	0	0	1	1	1	0	0
	POT2-8	81	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Reaction mixture 2	*femA*	601	–	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-4	477	8	1	1	1	0	0	1	1	1	1
	POT1-5	388	4	1	0	1	1	1	1	1	0	0
	POT1-6	320	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0
	POT1-7	273	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
	POT3-1	243	64	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	POT3-2	197	32	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	POT3-3	171	16	0	1	0	0	1	0	0	1	1
	POT3-4	140	8	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	POT3-5	115	4	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	POT3-6	95	2	0	0	1	1	0	1	1	0	0
	POT3-7	78	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0
POT 型	POT1			93	106	95	6	4	93	93	73	73
	POT2			255	77	136	16	58	190	190	156	156
	POT3			96	113	66	35	112	103	103	120	120

表 4　POT 型への変換方法例（図 1 の菌株番号 1（ATCC® 700699））

	POT No.	bp	POT 係数		結果		POT 値	
Reaction mixture 1	*femA*	601	–		1			
	POT1-1	530	64	×	1	=	64	a＝80
	POT1-2	449	32	×	0	=	0	
	POT1-3	355	16	×	1	=	16	
	POT2-1	304	128	×	1	=	128	b＝255
	POT2-2	271	64	×	1	=	64	
	POT2-3	228	32	×	1	=	32	
	POT2-4	197	16	×	1	=	16	
	POT2-5	161	8	×	1	=	8	
	POT2-6	131	4	×	1	=	4	
	POT2-7	104	2	×	1	=	2	
	POT2-8	81	1	×	1	=	1	
Reaction mixture 2	*femA*	601	–		1			
	POT1-4	477	8	×	1	=	8	c＝13
	POT1-5	388	4	×	1	=	4	
	POT1-6	320	2	×	0	=	0	
	POT1-7	273	1	×	1	=	1	
	POT3-1	243	64	×	1	=	64	d＝96
	POT3-2	197	32	×	1	=	32	
	POT3-3	171	16	×	0	=	0	
	POT3-4	140	8	×	0	=	0	
	POT3-5	115	4	×	0	=	0	
	POT3-6	95	2	×	0	=	0	
	POT3-7	78	1	×	0	=	0	
	POT1 = a+c =93 POT2 = b = 255 POT3 = d = 96							

11. 判定

femA が陽性の場合、*S. aureus* と判定します。菌株によっては、Reaction mixture 1 または 2 において *femA* のバンドが薄い、もしくは検出されないことがありますが、どちらかが陽性であれば *S. aureus* と判定します。
同一 POT 型（POT1～3 の数値が全て同一）の分離株については水平伝播の可能性を検討します。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。関連のない分離株同士が同一 POT 型となることもあるため、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。
MRSA の場合、POT1 は 64 以上となります。POT1 の値から MLST 解析で得られる ST 型のうち近縁なものをまとめた clonal complex（CC）型と、SCC*mec* 型の推定が可能です。日本で分離される代表的な MRSA について、POT1 の値との関係を表 5 に示します。

表 5　代表的な MRSA と POT1 値との関係

POT1	CC	SCC*mec*	備考
64	59	Ⅴ	PVL産生株が多い
64	89	Ⅴ	ETB産生株が多い
65	89	不明	壊れたSCC*mec* typeⅡb保有株の可能性
70	121	Ⅴ	ETA産生株が多い
73	89	Ⅱb	小児流行クローン、ETB産生株が多い
77	5	Ⅱut	SCC*mec* typeⅡ、subtype不明
85	5	不明	壊れたSCC*mec* typeⅡa保有株の可能性
93	5	Ⅱa	院内感染型MRSA（NY/Japanクローン）
98	8	Ⅰ	
104	12	Ⅳ	
104	59	Ⅳ	
104	72	Ⅳ	
104	89	Ⅳ	
106	1	Ⅳ	
106	8	Ⅳ	USA300の多くは106-77-113
108	5	Ⅳ	
110	30	Ⅳ	PVL産生株が多い

MRSA の POT1 値は、表中の CC と SCC*mec* の組み合わせになります。本キットでは、SCC*mec* type ⅡとⅣ以外の遺伝子を検出しておりませんので、POT1 値からのクローンの推定は経験則による参考情報になります。MSSA の POT1 の値は 30 以下の偶数で、多くの場合 0、2、4、または 6 となります。また、POT1 値が通常検出されない稀な数値の場合は、新種およびコンタミネーションや複合感染の疑いがございますので、純粋培養からの再試験を推奨しております。

12. 菌株識別能力

2000～2007 年に 10 施設で分離された黄色ブドウ球菌 552 株について、POT 法と PFGE 法で識別試験を行なった結果を表 6 に示します（使用菌株の内訳は、NY/Japan クローン MRSA 388 株、その他の MRSA 82 株、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA） 82 株）。
POT 法の Simpson's index は約 0.99 であり、PFGE 法と同等の識別能を示しました。

表 6　菌株識別能力

全菌株対象

	型別数	Simpson's index
POT	233	0.9945
PFGE	249	0.9931

MSSA のみ

	型別数	Simpson's index
POT	56	0.9867
PFGE	61	0.9941

13. 参考文献

1) Suzuki. M. *et al.* Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open reading frames. *J. Appl. Microbiol.* **101(4)** : 938-947 (2006)
2) Suzuki. M. *et al.* Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets. *J. Appl. Microbiol.* **107(4)** : 1367-1374 (2009)

T7316 2/2