

取扱説明書

シカジーニース® 分子疫学解析POTキット (緑膿菌用)
Cica Geneus® Pseudo POT KIT

1. はじめに

本キットは緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) および多剤耐性緑膿菌 (Multi-drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*; MDRP) 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と金沢医科大学の飯沼由嗣先生らによって開発された PCR-based ORF Typing 法 (POT 法) を基に操作性の向上を図っております。本キットでは 2 本の反応チューブを用いてマルチプレックス 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、緑膿菌の遺伝子型を決定します。

2. 製品形態

製品名	シカジーニース® 分子疫学解析 POT キット (緑膿菌用) Cica Geneus® Pseudo POT KIT
製品番号	08187-96
容量	50 回分
保管温度	冷凍 (-20 °C ~ -25 °C)

3. キット構成 (50 回)

個別名称	容量
試薬 A (ラベル白)	AptaTaq DNA Master (5 × Conc.) ^{※1} 500 µL × 1 本
試薬 B (ラベル赤)	PCR サプリメント 500 µL × 1 本
試薬 C (ラベル紫)	プライマーミックス α 250 µL × 1 本
試薬 D (ラベル緑)	プライマーミックス β 250 µL × 1 本
試薬 E (ラベル黄)	ポジティブコントロール 250 µL × 1 本
試薬 F (ラベル青)	6 × ローディングバッファー 500 µL × 1 本

^{※1} AptaTaq 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	シカジーニース® 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ース® DNA 抽出試薬の使用を推奨しております。			
72108	クロモアガーMDRP スクリーン培地	10 枚	選択分離培地
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
49898-89	PCR ラック	1 個	チューブ用ラック
49898-70	NEB COOLER	1 個	試薬冷蔵保存用クーラー

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

単離培養した緑膿菌から DNA 抽出液を調製し、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、溶原化したバクテリオファージのゲノムである Prophage を検出し、その検出パターンから菌種同定、クローン同定および菌株識別を行います。

表1 検出 ORF の種類とその PCR 増幅産物サイズ

	POT ナンバー	増幅サイズ (bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	506	<i>P. aeruginosa</i> positive control
	POT1-1	336	Genomic islet-1
	POT1-2	281	Genomic islet-2
	POT1-3	235	Genomic islet-3
	POT1-4	201	Genomic islet-4
	POT1-5	175	Genomic islet-5
	POT2-1	151	VIM
	POT2-2	126	Prophage-1
	POT2-3	103	Prophage-2
	POT2-4	85	Prophage-3
Reaction mixture 2	PCR PC	506	<i>P. aeruginosa</i> positive control
	POT1-6	324	Genomic islet-6
	POT1-7	271	Genomic islet-7
	POT1-8	238	Genomic islet-8
	POT1-9	204	Genomic islet-9
	POT1-10	176	Genomic islet-10
	POT2-5	150	Prophage-4
	POT2-6	124	Prophage-5
	POT2-7	105	IMP

PCR PC は、緑膿菌検出用の PCR ポジティブコントロール (potC) を指します。

6. 適用範囲

多剤耐性緑膿菌を含む緑膿菌

7. プロトコール

① DNA 抽出

緑膿菌や多剤耐性緑膿菌と同定された菌株を増殖可能な液体培地もしくは寒天培地を用いて培養し、別売のシカジーニース® DNA 抽出試薬 (製品番号: 08178-96) を用いて DNA の抽出を行なって下さい。

・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、培養液の原液を使用して下さい。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ご注意下さい。
- 3) 72 °C で 6 分間、94 °C 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 として下さい。

② PCR

本キットは 2 種類のプライマーミックス (試薬 C、試薬 D) を使用します。各試薬を室温で融解して下さい。融解後、直ちに転倒混和やタッピングで穏やかに混和してスピンドアウン後、氷冷して下さい。下記条件で 1 検体あたり 2 種類の反応溶液を調製して下さい。ポジティブコントロール (試薬 E) を使用する場合は、テンプレート DNA と置き換えて使用して下さい。

表2 PCR 反応溶液の調製例

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

反応溶液は、下記のパターン I もしくはパターン II のいずれかの条件で 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。

パターン I

94 °C: 15 秒
65 °C: 30 秒 + 8 秒^{※2} } 25 回繰返し

^{※2} は下記のようにインキュベーション時間を 1 サイクル毎に 8 秒ずつ延ばして下さい。

- 1 サイクル目 30 秒
- 2 サイクル目 38 秒
- 3 サイクル目 46 秒
- 4 サイクル目 54 秒
- ...

パターン II

1ST

94 °C: 15 秒
65 °C: 60 秒 } 15 回繰返し

2ND

94 °C: 15 秒
65 °C: 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プロモフェノールブルー (青紫色) の色素がゲルから完全に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、ゲルを染色して下さい。染色後のゲルを蒸留水の入ったバットに移して脱色し、UV トランスイルミネーター下でゲルを写真撮影して下さい。



取扱説明書

シカジーニクス® 分子疫学解析POTキット (緑膿菌用)
Cica Geneus® Pseudo 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(1)、無い場合(0)を POT 値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の電気泳動結果を解析した例を表3に示します。緑膿菌のPCR PCを除いた17個の増幅産物にはそれぞれPOT 1~2に分類されるPOT ナンバーが割り振られています。また、各POT ナンバーには表4のように1、2、4、8、16、32、64、128、256、512のPOT係数が割り振られています。本キットでは、識別性を向上させるためにバンドパターンをPOT 1値 - POT 2値からなるPOT型に変換します。POT 1値はPOT1-1~10で検出されたPOT係数の合計、POT 2値はPOT 2-1~7で検出されたPOT係数の合計となります。POT 1値 - POT 2値の組合せがPOT型となります。

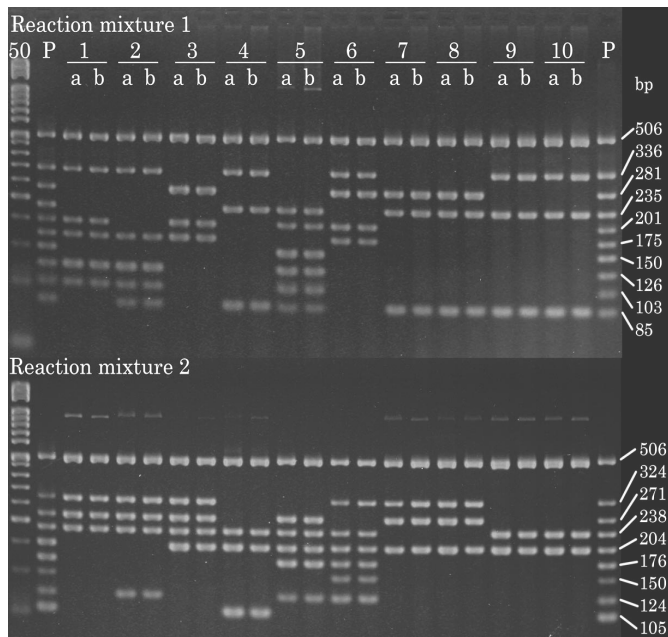


図1 電気泳動例

下記の8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® 27853、2: ATCC® 35554、3: PAO1、4: imp 陽性臨床分離株、5: vim 陽性臨床分離株、6: 臨床分離株、7、8: 集団感染事例1から得られた臨床分離株、9、10: 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(0.5×TBE 緩衝液)で、Mupid ACEの電気泳動装置を用いて、120 V、50 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ナンバー	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	10
Reaction mixture 1	PCR PC	506	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-1	336	512	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
	POT1-2	281	256	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
	POT1-3	235	128	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
	POT1-4	201	64	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
	POT1-5	175	32	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
	POT2-1	151	64	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	POT2-2	126	32	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	POT2-3	103	16	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
	POT2-4	85	8	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
Reaction mixture 2	PCR PC	506	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-6	324	16	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0
	POT1-7	271	8	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
	POT1-8	238	4	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
	POT1-9	204	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	POT1-10	176	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	POT2-5	150	4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	POT2-6	124	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	POT2-7	105	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	POT型			POT 1	636	572	382	646	207	887	410	646	646
				POT 2	48	58	0	9	122	6	8	8	8

※POT 値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。

表4 POT型 への変換方法例 (図1の菌株番号1 (ATCC® 27853))

	POTナンバー	bp	POT係数	結果	POT値
Reaction mixture 1	PCR PC	506	-	1	
	POT1-1	336	512	x	1 = 512
	POT1-2	281	256	x	0 = 0
	POT1-3	235	128	x	0 = 0
	POT1-4	201	64	x	1 = 64
	POT1-5	175	32	x	1 = 32
	POT2-1	151	64	x	0 = 0
	POT2-2	126	32	x	1 = 32
	POT2-3	103	16	x	1 = 16
	POT2-4	85	8	x	0 = 0
Reaction mixture 2	PCR PC	506	-	1	
	POT1-6	324	16	x	1 = 16
	POT1-7	271	8	x	1 = 8
	POT1-8	238	4	x	1 = 4
	POT1-9	204	2	x	0 = 0
	POT1-10	176	1	x	0 = 0
	POT2-5	150	4	x	0 = 0
	POT2-6	124	2	x	0 = 0
	POT2-7	105	1	x	0 = 0
				POT 1 = a + c = 636	
				POT 2 = b + d = 48	

9. 判定

PCR PC が陽性の場合、*Pseudomonas aeruginosa* です。POT1 値は Genomic islet を検出しており、菌株の系統依存的な保有パターンを示します。POT2 値は Prophage とメタロ-β-ラクタマーゼに関連する遺伝子領域を検出しております。

同一 POT 型(POT1 値-POT2 値の数値がすべて同一)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。関連のない分離株同士が同一 POT 型に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、総合的にご判断下さい。

POT2 値が 64 以上または奇数の場合は、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子を保有していると推定され、その多くに MDRP の可能性があります。なお、MDRP の判定は薬剤感受性試験結果に従って下さい。

日本で分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生緑膿菌について POT1 値と Sequence type(ST 型)との関係を表5に示します。

表5 メタロ-β-ラクタマーゼ産生の報告がある緑膿菌の POT1 値の例と ST 型との関係

POT 1	ST	備考
108	ST654	
207	ST235	分離事例の多いクローン。MDRP の報告も多い。
383	ST244	
574	ST360/ST864	メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の報告は ST360
575	ST17/ST991	メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の報告は ST991
646	ST357	分離事例の多いクローン。MDRP の報告も多い。

10. 菌株識別能力

本キットでは Genomic islet の検出パターン(POT1 値)によって MLST 法の clonal complex(CC)レベルの識別能力を有しており、さらに、Prophage の検出(POT2 値)によって同一 CC 間での菌株識別能力を高めています。また、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子(vim, imp)を検出することで、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の推定が可能です。

緑膿菌 415 株を本キットで試験したところ、107 の POT 型に分類されました。また、緑膿菌 109 株を本キットと MLST 法で試験したところ、MLST 法で 40 の ST 型に分類された 85 株は POT1 値と ST 型が 1 対 1 で対応しました。また、15 の ST 型に分類された 24 株は 10 種類の POT1 値に分類され、同一の POT1 値に 2 種類の ST 型が含まれる場合が 6 通り、同一 ST 型が 2 つの POT1 値に分かれたものが 1 組見られました。

11. 使用上の注意事項

- 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)。
- 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、小分けして保存して下さい。
- PCR 反応溶液の室温放置は結果に影響を及ぼす可能性があります。反応溶液の調製は、氷上または PCR クーラーの使用を推奨します。
- 使用されるサーマルサイクラーによって、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。
- 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。

12. 参考文献

・厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業、新型薬剤耐性菌に関する研究 平成 23 年度 総括・分担研究報告書、研究代表者 荒川宜親

13. その他

本キットは愛知県と金沢医科大学から特許許諾を受けて販売しています。