

取扱説明書

シカジーニクス® 分子疫学解析POTキット(C. ディフィシル用)
Cica Geneus® C. diff POT KIT

1. はじめに

本キットは、*Clostridioides (Clostridium) difficile* のクローン同定および菌株識別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が開発した PCR-based ORF Typing (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、*C. difficile* の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	シカジーニクス® 分子疫学解析 POT キット(C. ディフィシル用) Cica Geneus® C. diff POT KIT
製品番号	08106-97
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) 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	240 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。			
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
49898-91	NEB COOLER	1 個	試薬冷蔵保管用クーラー

5. 原理

単離培養した *C. difficile* 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 および toxin A、toxin B、binary toxin 遺伝子を検出します。検出された遺伝子の保有パターンから *C. difficile* のクローン同定およ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

	POTNo.	増幅サイズ (bp)	ターゲット領域
Reaction mixture 1	PCR PC	498	<i>C. difficile</i> 判定領域
	POT 1-1	426	Genomic Islet-1
	POT 1-2	372	Genomic Islet-2
	POT 1-3	323	Genomic Islet-3
	POT 1-4	282	Genomic Islet-4
	POT 1-5	242	Genomic Islet-5
	POT 1-6	211	Genomic Islet-6
	POT 1-7	180	Genomic Islet-7
	POT 1-8	151	Genomic Islet-8
	POT 1-9	126	Genomic Islet-9
Reaction mixture 2	PCR PC	498	<i>C. difficile</i> 判定領域
	POT 2-1	425	Genomic Island-1
	POT 2-2	331	Genomic Island-2
	POT 2-3	294	Genomic Island-3
	POT 2-4	266	Genomic Island-4
	POT 2-5	229	Genomic Island-5
	POT 2-6	185	<i>cdtA</i> (binary toxin)
	POT 2-7	145	Genomic island-6
	POT 2-8	124	<i>tcdA</i> (toxin A)
	POT 2-9	101	<i>tcdB</i> (toxin B)

PCR PC は、*C. difficile* 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

C. difficile

7. プロトコール

① DNA 抽出

単離した *C. difficile* を液体培地もしくは寒天培地で培養し、別売のシカジーニクス® DNA 抽出試薬 (製品番号: 08178-96) を用いて DNA を抽出して下さい。

・シカジーニクス® DNA 抽出試薬の使用法

- 1) 別途調製したシカジーニクス® 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 °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 溶液として下さい。

② PCR

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、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

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、下記のパターン I もしくはパターン II 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
57 °C: 30 秒 + 6 秒^{※2} } 30 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 6 秒ずつ延ばして下さい。

- 1 サイクル目 30 秒
- 2 サイクル目 36 秒
- 3 サイクル目 42 秒
- ...

パターン II

94 °C: 15 秒
57 °C: 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) 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 アプラインして下さい。
- 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. 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、*C. difficile*であるか否かを判定します。次に、PCR PCを除いた19本のバンドには、それぞれPOT1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のPOT係数が割り振られています。POT1値はPOT No. 1-1~1-10で検出されたPOT係数の合計値、同様にPOT2値はPOT No. 2-1~2-9の合計値になります。

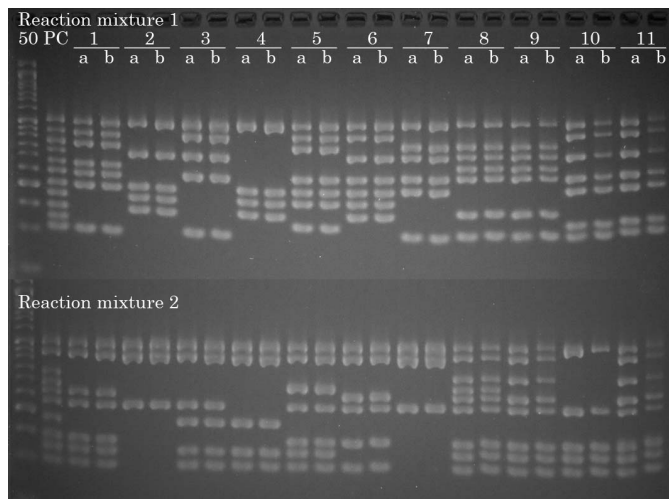


図1 電気泳動例

下記の11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、PC: ポジティブコントロール、1: ATCC® 9689™,
2: ATCC® 43593™、3: ATCC® BAA-1870™、4~11: *C. difficile* 分離株

※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	498	-	1	1	1
	POT 1-1	426	512	1	0	1
	POT 1-2	372	256	1	0	0
	POT 1-3	323	128	0	1	1
	POT 1-4	282	64	1	0	0
	POT 1-5	242	32	1	0	1
	POT 1-6	211	16	1	1	0
	POT 1-7	180	8	0	1	0
	POT 1-8	151	4	0	1	0
	POT 1-9	126	2	0	0	0
POT 1-10	107	1	1	0	1	
Reaction mixture 2	PCR PC	498	-	1	1	1
	POT 2-1	425	256	1	1	1
	POT 2-2	331	128	0	0	0
	POT 2-3	294	64	0	0	0
	POT 2-4	266	32	1	0	0
	POT 2-5	229	16	1	1	1
	POT 2-6	185	8	0	0	1
	POT 2-7	145	4	1	0	0
	POT 2-8	124	2	1	0	1
POT 2-9	101	1	1	0	1	
POT 型	POT1			881	156	673
	POT2			311	272	283

※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が陽性的の場合、*C. difficile*と判定します。POT1値は、Genomic Isletを構成するORFの保有パターンを示します。POT1値は、PCR-ribotyping型およびMLST解析によるSequence type(ST)型との相関性が高く、高病原性クローンであるかどうかを推定することができます。また、POT2値は、Genomic Island中に存在するhyper variableなORFとtoxin A、toxin B、binary toxinの保有パターンを示します。POT2値は、同一PCR-ribotyping型の分離株を細分化することができ、POT2値を比較することで、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。

10. 菌株識別能力

C. difficile 65株についてPOT法、PCR-ribotyping、MLSTで解析した結果、48のPOT型、29のPCR-ribotyping型、26のST型に分類されました。POT1値と近縁なST型をまとめたclonal complexとは1対1の対応を示しました。また、3株のATCCを含む146株をPOT法およびPCR-ribotypingで解析した結果、67のPOT型および36のPCR-ribotypingに分類されました。POT型691-279、PCR-ribotype 018(ST17と推定されるクローン)が13株と最も多く、次いでPOT型691-259、PCR-ribotype 018'及びPOT型700-309、PCR-ribotype 369(ST81と推定されるクローン)が各9株と続きました。POT法のSimpson's indexは0.976となりました。特定のPOT型やPCR-ribotype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-20℃~-25℃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リャーによっては、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。また、PCRチューブは必ず使用されるサーマルサイクリャーに合わせて、推奨されたものをお選び下さい。

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) 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。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。