

取扱説明書：カネカ核酸クロマト カルバペネマーゼ遺伝子検出キット

使用上の注意事項

- 本キットは保護具（ゴム手袋や保護メガネ、マスク等）を着用の上、ご使用ください。
- 本キットで得られた結果の判断・利用については、お客様の責任のもと実施してください。結果の判断・利用によって生じた損害や損失について、当社は直接・間接を問わず一切の責任を負いません。
- 本取扱説明書に記載のない操作手順で実施して得られた検出結果の妥当性はお客様にて検証してください。
- 本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助の目的で使用することはできません。

1. 本キットの概要

本キットは、マルチプレックス PCR 法と核酸クロマト法に基づき、菌懸濁液または菌培養液から代表的な 5 種類のカルバペネマーゼ遺伝子（IMP、VIM、NDM、KPC、OXA48）を検出するためのキットです。

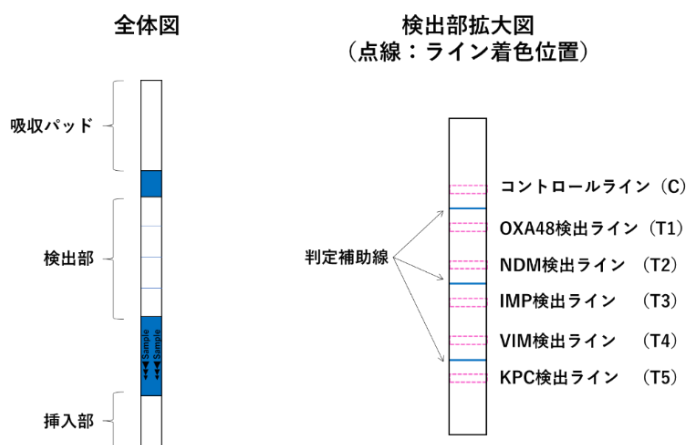
2. キット構成/保存条件

内容物	容量 (20 テスト)	保管温度	使用期限
テストストリップ	20 本	室温 (2-30°C)	各内容物のラベル に記載
展開バッファー	4 mL × 1 本		
PCR ミックス※1	200 μL × 1 本	冷凍 (-20°C以下)	
プライマーミックス	100 μL × 1 本		

※1. DNA Polymerase dU plus dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)、UNG (Uracil DNA Glycosylase) を含みます。

3. 検出原理

カルバペネマーゼ遺伝子の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 により標的遺伝子を増幅します。増幅産物をテストストリップに展開し、ライン着色パターンからカルバペネマーゼ遺伝子型を判定します。ライン着色は目視にて確認可能であり、結果判定にゲル撮像装置やリアルタイム PCR 機等の装置は不要です。



4. 使用方法

4.1. 本キット以外に必要な器具・機器等

- ・ マイクロピペットおよびマイクロピペット用フィルター付きチップ
- ・ サーマルサイクラー（本キットの性能は LifeECO Thermal Cycler（Bioer Technology 社）で確認済み）
- ・ ヒートブロック（サーマルサイクラーで代用可能）
- ・ 0.2 mL チューブ（PCR 用）
- ・ 卓上遠心機

4.2. DNA 抽出液の調製

選択分離培地などを用いて単離したカルバペネマーゼ産生が疑われる菌株を検体として、市販の DNA 抽出キット（カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2（カネカ）、DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）など）を用いて DNA を抽出してください。なお、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 や熱抽出法により抽出した DNA も検体として使用できます。

例) カネカ簡易 DNA 抽出キット version 2 を用いる方法

- ① 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 0.5~2 番程度となるように調製する。
- ② 懸濁液 15 μ L を 0.2 mL チューブに移し（液体培養の場合は、培養液の原液を菌液として使用ください）、試薬 A 100 μ L と混合後、ヒートブロックにて 98°C/10 分間加熱する。
- ③ 氷冷後、試薬 B 15 μ L を添加し、ピペッティングする。

例) 熱抽出による方法

- ① コロニー懸濁液、もしくは液体培養液の原液 100 μ L を 0.2 mL チューブに移し、ヒートブロック（もしくはサーマルサイクラー）にて 98°C/10 分間加熱する。

4.3. PCR 反応液の調製

- ① PCR ミックスとプライマーミックスを予め融解する^{※2}。
- ② マスターミックス調製用の 0.2 mL チューブに PCR ミックス 10 μ L とプライマーミックス 5 μ L、滅菌蒸留水 3 μ L の割合で、必要数分を分注・混合し、マスターミックスを調製する^{※3}。
- ③ 新しい 0.2 mL チューブに、4.2. で調製した DNA 抽出液 2 μ L を入れる。
- ④ ③の 0.2 mL チューブに、マスターミックス 18 μ L を添加し、ピペッティングで混合する。

※2 PCR ミックスおよびプライマーミックスは、十分に融解・混合してください。特に PCR ミックスは解凍時に白色の沈殿を認める場合があります。この場合、ピペッティングにより沈殿を完全に溶解してご使用ください。

※3 調製後、酵素の失活や非特異的な増幅反応を防ぐため、氷上等に置いて冷却してください。

4.4. PCR 反応

サーマルサイクラーに、0.2 mL チューブをセットして下表の PCR 条件にて増幅反応を行う^{※4}。

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル
25	300	1
95	180	1
94	20	35
58	20	
72	45	
72	300	1

※4. PCR 反応終了後、テストストリップによる検出をすぐに実施しない場合は、PCR 反応液を冷凍保存しておくことをおすすめします。冷凍保存した PCR 反応液は、常温にて完全に融解させてから、テストストリップによる検出を行ってください。

4.5. テストストリップによる検出

- ① 反応終了後の PCR 用チューブを取り出し、蓋を開け、展開バッファー 160 μL を添加する。
- ② テストストリップの上部を持ってケースから取り出し^{※5}、そのままの向きでテストストリップの挿入部（「◀◀◀Sample」の文字記載側）を PCR 用チューブの底までしっかりと挿入する^{※6}（PCR 反応液の展開が開始されます）。
- ③ 展開 10 分時点で、目視にてライン着色パターンを確認し、判定する。

※5. テストストリップを扱う際は、ゴム手袋等を着用し、必ず上部の吸収パッドを持つようにしてください。テストストリップの挿入部や検出部には直接手を触れないでください。

※6. テストストリップを PCR 用チューブに挿入する際は、PCR 反応液の飛散による汚染に十分ご注意ください。

5. 結果判定

陰性：コントロールライン（C）のみがピンク～赤紫色に着色する。

陽性：コントロールライン（C）に加えて、検出ライン（T1～T5）がピンク～赤紫色に着色する。

無効：コントロールライン（C）が着色しない（下図は一例）^{※7}。

判定	陰性	陽性					無効	
	C のみ	OXA48	NDM	IMP	VIM	KPC	C なし	C なし
着色パターン								

※7. コントロールラインが着色しない場合、誤操作や機器の不具合等の可能性があるため、4.2 項 DNA 抽出液の調製から再試験を実施してください。

※8. DNA 抽出液に多量の夾雑物が含まれる場合、PCR 反応が阻害され、ライン着色が薄くなる可能性があります。その際は DNA 抽出液を希釈することで改善されることがあります。

※9. 検出時の環境温度が著しく低い場合（冬の屋外等）、ライン着色が薄くなることがありますので、15°C以上に空調された屋内にてご使用ください。

6. 使用上の注意事項

- 本取扱説明書に記載する保存条件、使用期限を厳守してください。
- 本キットの仕様は予告なく変更される場合があります。
- 使用する器具や機器類について、製造・販売元が指定する使用方法に従ってください。
- テストストリップは湿気を含む状態で長時間放置すると検出性能が低下する恐れがありますので、開封後は容器の蓋をしっかりと閉じて保管し、吸湿には十分ご注意ください。
- マイクロピペット用チップは使用毎に交換し、コンタミネーションに注意してください。また、マイクロピペット用チップはフィルター付きのものを使用してください。
- 本キットの使用前後に、0.55%次亜塩素酸ナトリウム水溶液や DNA 除去剤、紫外線（UV）等を用いて実験台等をクリーニングしてください。
- コンタミネーションによる誤判定を防ぐため、DNA 抽出、PCR 反応液の調製、テストストリップによる検出の各ステップは、別々の区域で実施することを推奨しております。
- 試薬や DNA 抽出液等の入ったチューブを開ける前に、卓上遠心機等でスピンドウンを行ってください（内容物の飛散を避けるため）。
- コンタミネーションが確認された場合、使用する器具や機器類について、製造・販売元が指定する方法でクリーニングしてください。
- 使用後のテストストリップおよび PCR 反応液を廃棄する際は、テストストリップの挿入部や検出部、PCR 反応液に直接触れないように注意し、PCR 反応液が飛散しないよう、ビニール袋等に入れて廃棄してください。
- 本キットや PCR 反応液、DNA 抽出液等を廃棄する場合は、当該地域の廃棄物に関する規程、および、当該施設の規則に従い、衛生面、環境面に配慮し廃棄してください。
- 本キットは Bioer Technology 社 LifeECO Thermal Cycler で性能を確認しております。他機種をご利用の場合には、テストストリップのライン着色が不鮮明になる可能性があります。

<問い合わせ先>

株式会社カネカ Medical Devices Solutions Vehicle

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8 TEL 079-445-2406（受付時間：平日 9:00-17:00）

URL <https://www.kaneka-labtest.com>