

抽出操作不要の検便検査用 ノロウイルスqPCR検出法

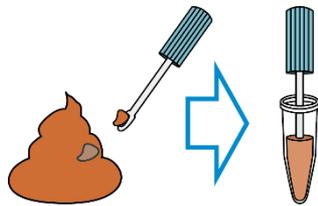
タカラバイオ株式会社

○吉崎美和、齋藤憲介、松本裕之、上森隆司、北川正成

第39回 日本食品微生物学会学術総会 (2018/9/27)

従来法の操作フロー

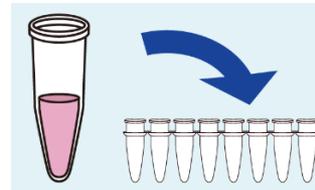
検体準備



簡易抽出



反応液調製



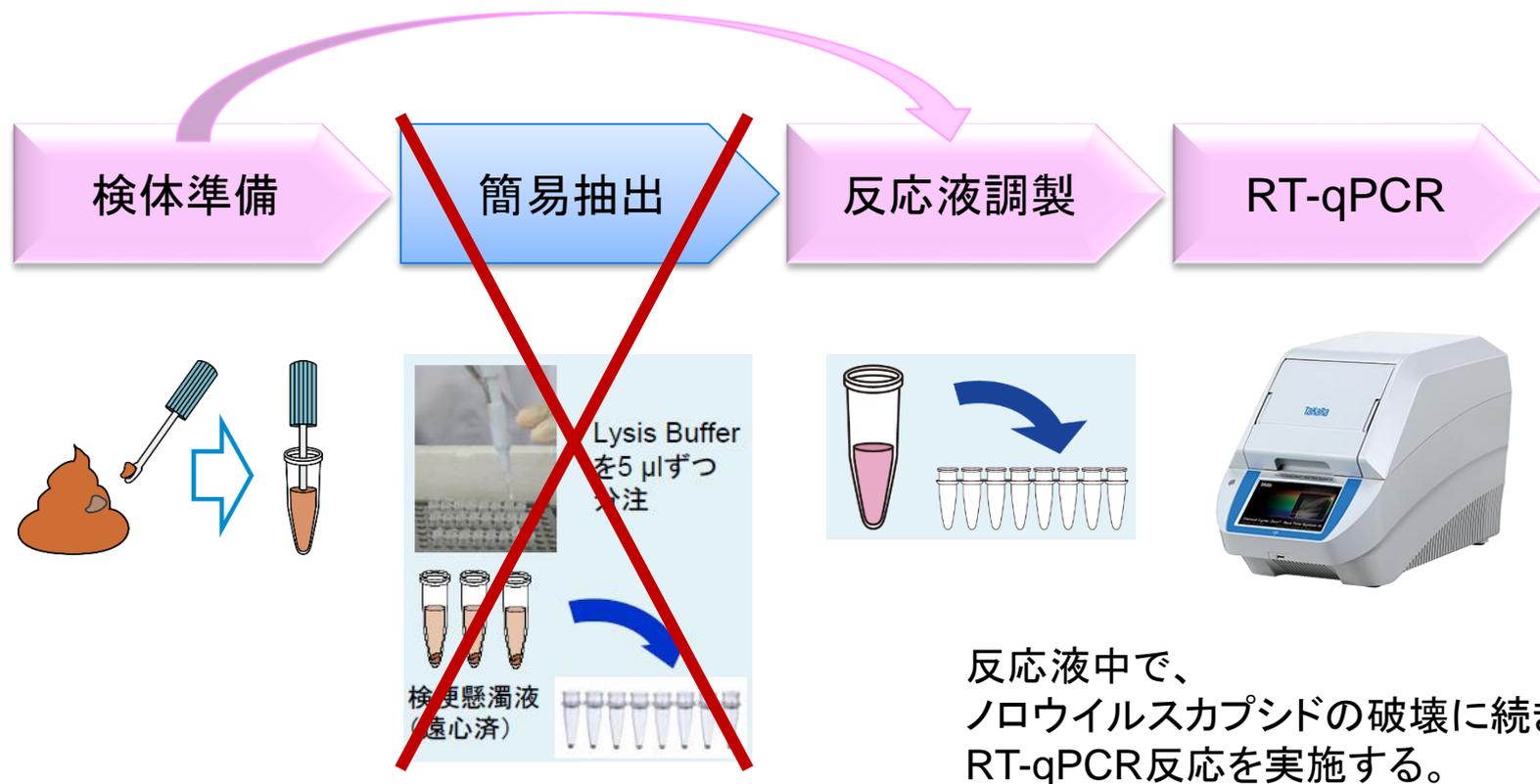
RT-qPCR



* TaKaRaノロウイルスGI/GII検出キットVer.2使用の場合。

新手法の操作フロー

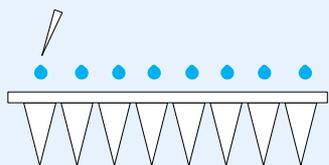
検便上清を反応液に直接添加



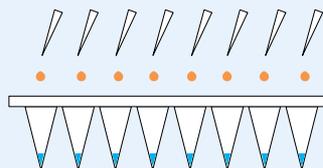
作業時間と消耗品の削減効果

従来法

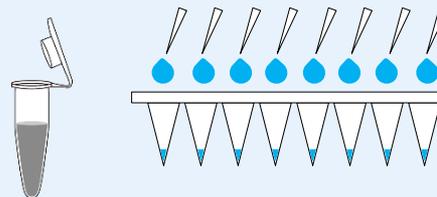
① Lysis Buffer 5 μ l 分注



② Sample 1 μ l 添加



③ Master Mixの調製と分注 (19 μ l)



所要時間: 10分
チップ本数: 1本

20分
96本

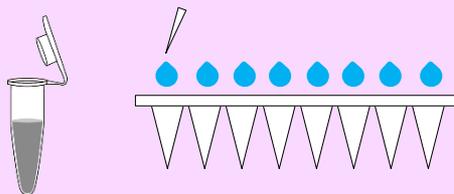
5分
3本

15分
96本

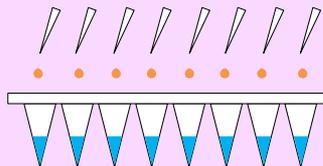
計50分
計193本

新手法

① Master Mixの調製と分注 (24 μ l)



② Sample 1 μ l 添加



所要時間: 5分 10分
チップ本数: 2本 1本

20分
96本

計35分
計97本

新手法では、
✓ 作業時間は3割減
✓ 消耗品は5割減
大幅コストダウンが可能

* 所要時間とチップ本数は、96ウェル分調製の場合。

実検体評価結果

従来法の結果

		標準法		
		GI陽性	GII陽性	陰性
従来法	GI陽性	29	0	0
	GII陽性	0	98	0
	陰性	0	1	37

感度： 99.2% (127/128)

特異度： 100.0% (37/37)

新手法の結果

		標準法		
		GI陽性	GII陽性	陰性
新手法	GI陽性	28	0	0
	GII陽性	0	99	0
	陰性	1	0	37

感度： 99.2% (127/128)

特異度： 100.0% (37/37)

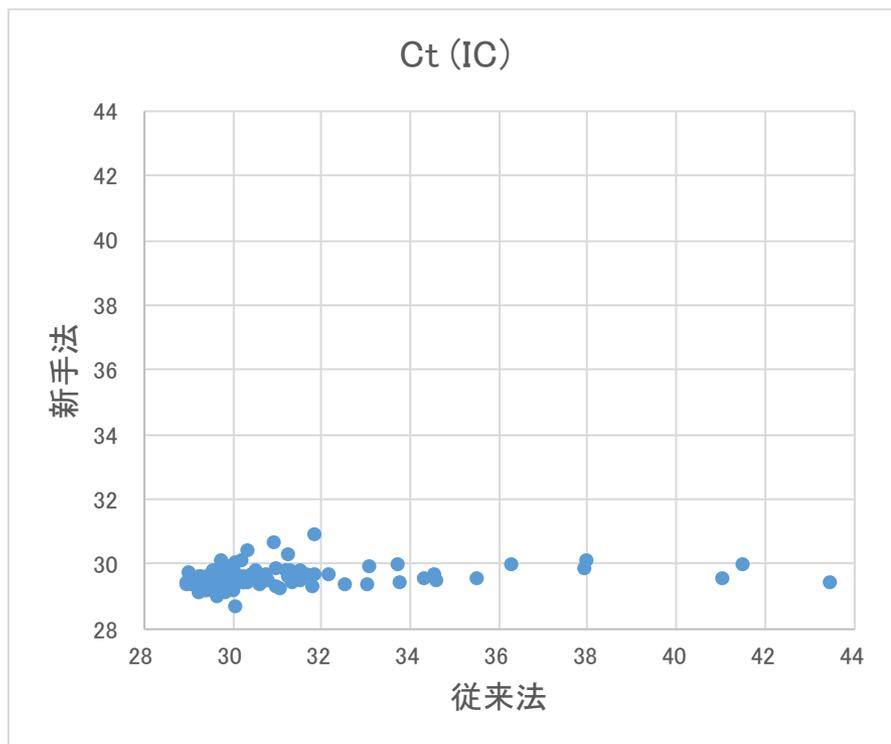
判定結果が不一致となった原因

- 新手法では、GI陽性検体の内、1検体が不検出となった。
→従来法でのCt値が42.6であり、非常に低コピーであったため。
- 従来法では、GII陽性検体の内、1検体が不検出となった。
→ICも不検出であったことから、PCR阻害が原因の偽陰性と考えられる。

* 本試験は、大阪健康安全基盤研究所より検体の提供を受けて実施した。

PCR阻害の状況

インターナルコントロールのCt値の比較



新手法の結果

- Ct値が安定している。

従来法の結果

- 検体によって、Ct値の遅れが認められる。
- 12/165検体(7%)でICが不検出となった。

新手法の方がPCR阻害の影響を受けにくいと推測される。

実検体で検出が確認された遺伝子型

<GI>

GI.3

GI.4

GI.6

GI.7

<GII>

GII.1

GII.2

GII.3

GII.4 Sydney 2012

GII.6

GII.7

GII.17

<Pol-VP1の遺伝子型情報があるもの>

GII.P2-GII.2

GII.P7-GII.6

GII.P7-GII.7

GII.Pe-GII. 4 Sydney 2012

GII.P16-GII.2

GII.P16-GII.4 Sydney 2012

GII.P17-GII.17

「大量調理施設衛生管理マニュアル」より

注7：ノロウイルスの検査に当たっては、遺伝子型によらず、概ね便1g当たり 10^5 オーダーのノロウイルスを検出できる検査法を用いることが望ましい。ただし、検査結果が陰性であっても検査感度によりノロウイルスを保有している可能性を踏まえた衛生管理が必要である。

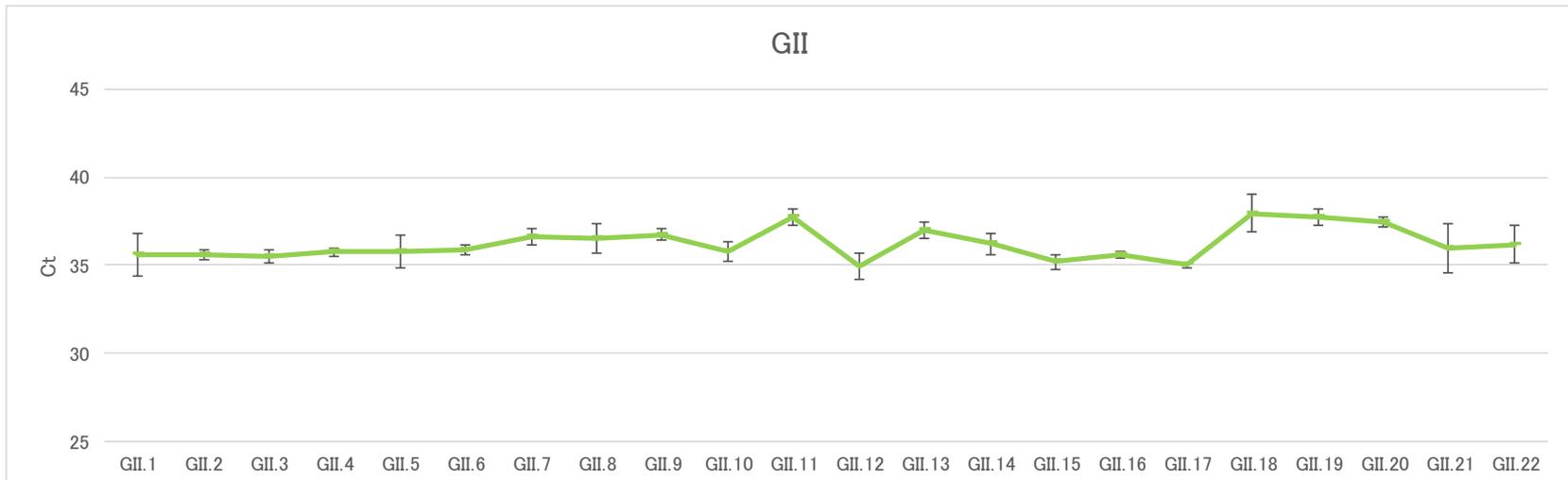
各種遺伝子型の検出感度試験



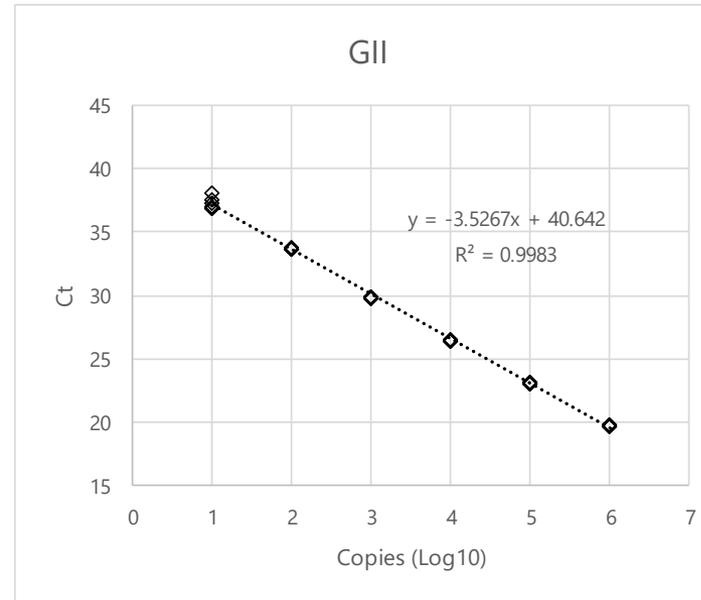
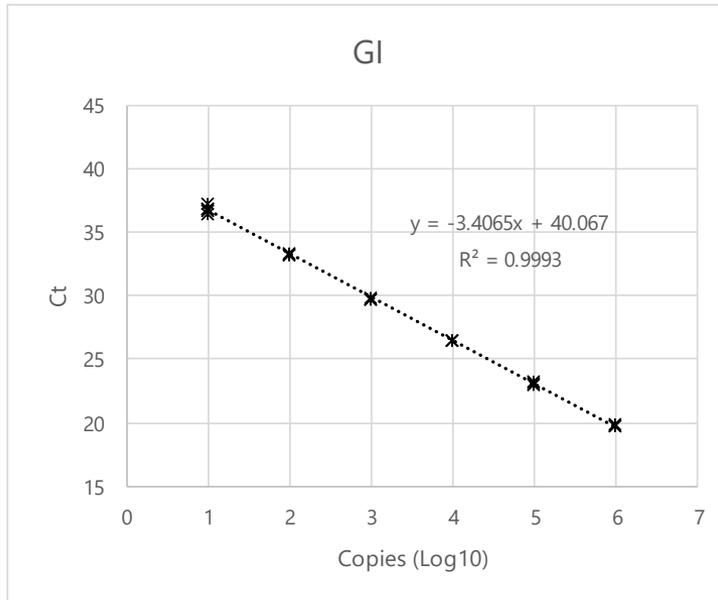
GI 9種、GII 22種の遺伝子型につき、
50コピーを再現性良く検出可能。

【方法】

増幅領域の人工合成DNAを使用
1反応当り50コピーで各3連で実施
図中の垂直バーは±1 SDを示す



標準プラスミドによる検量線作成



copies/rxn	GI				GII			
	1	2	3	Ave.	1	2	3	Ave.
1.00E+00	ND	ND	39.4	39.4	40.8	ND	ND	40.8
1.00E+01	36.7	36.8	36.7	36.7	37.0	38.0	36.9	37.2
	36.6	37.2	36.4		36.8	37.5	37.2	
1.00E+02	33.2	33.3	33.1	33.2	33.6	33.6	33.7	33.6
1.00E+03	29.7	29.8	29.6	29.7	29.8	29.9	29.7	29.8
1.00E+04	26.5	26.5	26.4	26.4	26.3	26.3	26.4	26.4
1.00E+05	23.1	22.9	23.0	23.0	23.1	23.0	23.0	23.0
1.00E+06	19.8	19.7	19.7	19.7	19.8	19.6	19.7	19.7

GI、GIIとも10コピーまで再現性良く
検出可能なことが確認された。

* 本試験は、国立感染症研究所より大阪健康安全基盤研究所へ分与された標準プラスミドを用いて実施した。

実検体による検出感度試験

95%陽性カットオフ値の確認

	GI			GII		
	X0.33	X1	X3	X0.33	X1	X3
Average	41.1	38.1	35.3	38.1	35.5	33.6
SD	1.620	1.006	0.475	1.894	0.587	0.402
Positive No.	18	24	24	22	24	24
Positive%	75%	100%	100%	92%	100%	100%

【方法】

GIおよびGII陽性検体を適宜希釈し、検出限界付近の3段階濃度で各24連の反応を実施し、95%以上の確率で検出される濃度を確認した。

【結果】

95%陽性カットオフ値

GI: Ct = 38.1 (3.8コピー相当*)

GII: Ct = 35.5 (28.7コピー相当*)

* 標準プラスミドで作成した検量線より算出

GI、GIIとも、少なくとも30コピー程度の鋳型が存在すれば再現性良く検出可能と推測される。

* 本試験は、大阪健康安全基盤研究所より検体の提供を受けて実施した。

低コピー検体の検出率

GI検出系

Dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Average	35.2	36.3	37.2	38.8	39.7
SD	0.217	0.396	0.618	1.139	0.979
Positive No.	20	20	20	17	15
Positive%	100%	100%	100%	85%	75%

GII検出系

Dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16
Average	35.4	36.4	37.7	38.5	39.1
SD	0.376	0.801	1.067	1.237	1.361
Positive No.	20	20	20	18	11
Positive%	100%	100%	100%	90%	55%

【方法】

GIおよびGII陽性検体を適宜段階し、検出限界付近の濃度で1/2希釈シリーズを調製し、各20連の反応を実施した。

【結果】

100%検出された範囲

GI: Ct = ~37.2 (6.9コピー相当*)

GII: Ct = ~37.7 (6.8コピー相当*)

* 標準プラスミドで作成した検量線より算出

GI、GIIとも、37サイクル付近まで再現性良く検出可能なことが確認された。

* 本試験は、大阪健康安全基盤研究所より検体の提供を受けて実施した。

まとめ

- 操作性の向上
 - 新手法では、抽出操作が不要で、検便上清をPCR反応液に直接添加できるため、操作性が大幅に向上した。
- 検出網羅性について
 - 陽性128検体、陰性37検体につき試験した結果、感度99.2% (127/128)、特異度100% (37/37)の良好な結果が得られた。
 - GI 9種、GII 22種の遺伝子型につき、人工合成DNAを鋳型とした試験にて、いずれも50コピーを検出可能であった。
- 検出感度について
 - 国立感染症研究所から分与された標準プラスミドを使用した場合、10コピーを再現性良く検出可能であった。
 - 実検体を用いて検出限界を確認した結果、37サイクル付近まで再現性良く検出可能なことが分かった。