

複数病原体検出を目的とした高齢者介護施設排水調査

調査目的

2021年1月から2023年2月に3か所（2022年からは5か所）に実施した施設排水調査の結果、SARS-CoV-2の検査方法は概ね確立。

SARS-CoV-2 以外の複数病原体検査系を検討する（下水とふき取り）

調査期間： R5.5～R5.12（月1回）

場所:特養5施設（名古屋市）

方法

採水量：100 ml（プロメガDC法）、供試料 80 ml

精度管理: VLPを用いた回収率評価とPCRコントロール(ISO標準品)測定

- 1) Duplex RT-qPCRによるFluA/B,SARS-CoV-2検出
- 2) カスタムデザインプレートを用いた2 step リアルタイムPCR検査

流入下水中の新型コロナウイルス他、複数病原体検査フロー

採水

グラブ法

2日目：AM10時前後約100 ml（4℃）

トラップ法

1日目：PM16～18時設置

2日目：AM09～10時回収（4℃）

輸送

病原体輸送業者へ委託

凍結（ドライアイス）

採水二日目午後13時～翌日午前 検査委託先着

RNA抽出

ダイレクトキャプチャー法（Promega Wizard Enviro TNA Kit, A2991）

検体（80 ml） 40 ml × 2 本の 50 ml 遠沈管

— VLP Detection Mix Orangeを添加（32 µl/tube）

— Wizard Enviro TNA Kitを使用して核酸を抽出する。（Protocol 4 を使用して抽出）

RNA 40 µl

1) Duplex RT-qPCRによるFluA/B,SARS-CoV-2検出

用いたキット

Takara SARS-CoV-2 & Flu ダイレクト PCR 検出キット (15 µl 反応系)

RNAは原液使用

精度管理の手法

- PCR コントロール：AcroMetrix Coronavirus 2019 (COVID-19) RNA Control (RUO)を反応ごとに使用し、Ct 値を確認

- VLPを用いた回収率評価

試薬：VLP Detection Mix Orange (MERMDX069-1)

添加したVLP の回収率を毎回確認

2) カスタムデザインプレートを用いた2 step リアルタイムPCR検査

複数種病原体検出プレート：TrueMark Custom Plates (サーモフィッシャー)

ターゲット：新型コロナウイルス、ノロウイルス (G I, G II)、インフルエンザウイルス (A, B)、肺炎球菌、レジオネラ属菌

検量線用標準核酸 (プール) : Custom DNA control (1×10^5 copies/µl)

逆転写反応

試薬：TaKaRa PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)

RNAは1/2希釈して使用

リアルタイム PCR

試薬：TaqPath™ BactoPure™ Microbial Detection Master Mix, no Rox
(サーモフィッシャー)

10 µl 反応系

複数病原体検出を目的とした高齢者介護施設排水調査の概要

調査期間： R5.5～R5.12（月1回）
場所:特養5施設（名古屋市）
方法
採水量：100m l（プロメガDC法）
精度管理:VLPを用いた回収率評価とPCRコントロール(ISO標準品)測定

- 1) Duplex RT-qPCRによるFluA/B,SARS-CoV-2検出
- 2) カスタムデザインプレートを用いた2 step リアルタイムPCR 検査

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
B	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
C	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
D	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
E	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
F	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
G	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			
H	SC_ORF/N		NG1/2		Flu A/B		LP		SP			

新型コロナウイルス
ノロG1,G2
FluA/B
レジオネラ
肺炎球菌

1.新型コロナウイルス/インフルエンザA,B同時検出キット使用(インフルはすべて陰性、コロナのみ検出)

	5/29-30	6/26-27	7/18-19	8/28-29	9/25-26	10/23-24	11/27-11/28	12/25-12/26
A	N.D.	SC (1.6E+01)	N.D.	5.4E+02	SC (2.2E+02)	N.D.	N.D.	N.D.
B	N.D.	N.D.	SC (4.4E+01)	4.4E+01	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	SC (1.6E+02)	SC (1.7E+01)
D	SC (3.0E+00)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.0E+03
E	N.D.	N.D.	N.D.	3.6E+02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C拭き取り	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

2.カスタムプレート使用（1と同じ検体を使用していますが違うPCR検査手法）

採取場所	5/29-30	6/26-27	7/18-19	8/28-29	9/25-26	10/23-24	11/27-11/28	12/25-12/26
A	LP(2.5E+02)	NV- G1G2(4.5E+02)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
B	N.D.	NV- G1G2(1.1E+05)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C	N.D.	NV- G1G2(1.5E+04)	N.D.	NV- G1G2(1.5E+03)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
D	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	NV- G1G2(2.7E+02)	N.D.	N.D.
E	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
C拭き取り	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

検出下限値 500 GC/L 赤字は1ウエルのみ反応

2023年 5 月から 1 2 月までの調査（まとめ）

- ・ 高齢者介護施設排水中の新型コロナウイルスゲノム採水、検査法を各種検討
- ・ コロナ、インフル同時測定キットのほうが、カスタムプレートによる検出より感度が高い。
- ・ なおカスタムプレート中の新型コロナ検出系は変異株に対応していないこと、2倍希釈したRNAを用いたことが、原因と考えられる。
- ・ カスタムプレートでノロウイルスとレジオネラ属の検出ができた。
- ・ ふき取りサンプル（職員オフィス）はすべて陰性
- ・ カスタムプレート検査は一枚 5 万円＋試薬代でおよそ 6 ～ 7 万円程度が原価（ 6 種類、 4 施設まで検査可能）ただし採水費用、輸送費用含まず
- ・ 4 施設まとめてなら 1 施設 2 万弱で 6 種類の検査（原価）
- ・ カスタムなので施設の要望で対象病原体のアレンジ可能（現在、最小オーダーは 2 0 枚）
- ・ 施設の健康診断的な活用の可能性