

JMAP 第7回年次学術集会

2021-02-20



COVID-19

核酸検査室立ち上げにおける 精度管理システムの確立

埼玉医療生活協同組合
皆野病院

検査室 森泰彦





勝浦市



皆野町



香取市



いすみ市



大多喜町



御宿町

塩田病院・皆野病院・県立佐原病院

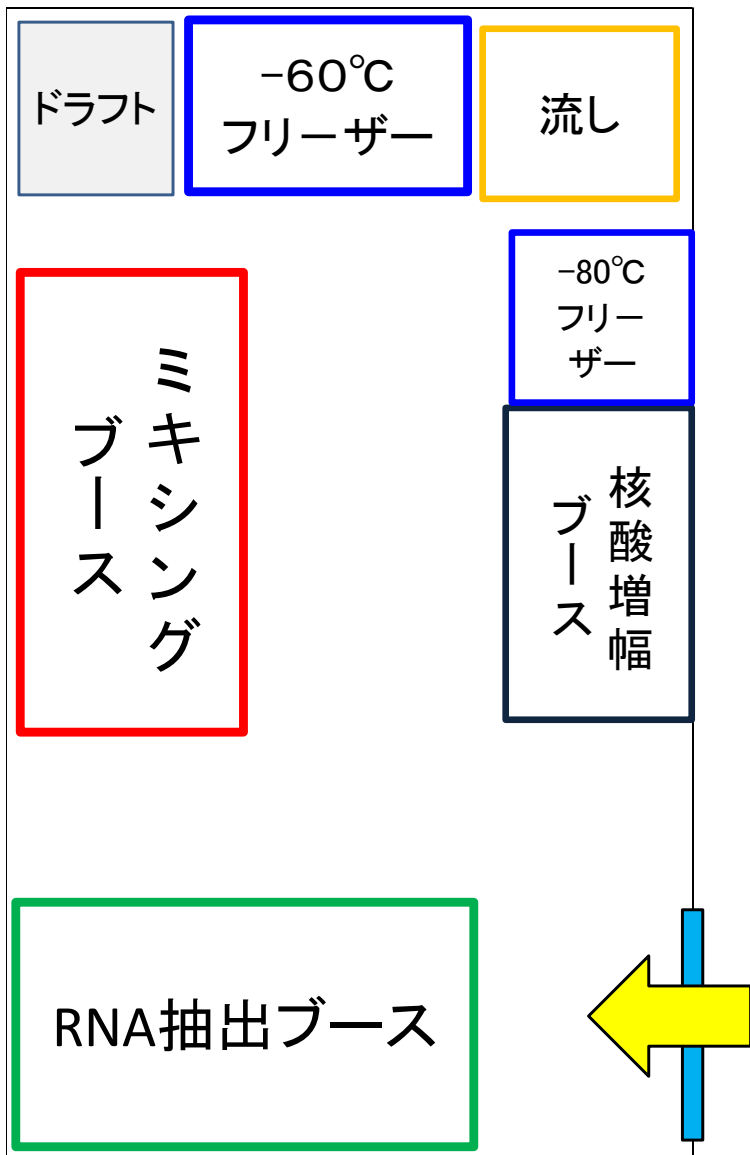
いすみ医療センター

COVID-19 核酸検査マニュアル Ver 5.0

令和2年12月18日改訂



皆野病院PCR検査室見取り図



精度管理－1

陰性・陽性判定

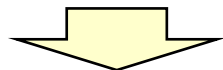


不活化法＋SmartAmp法＋融解曲線分析 COVID-19の高精度確定診断法

検体採取



直ちにSSB1mlで不活化



スピソカラムでRNA抽出精製



SmartAmp法による核酸増幅



融解曲線分析



最終判定



国立感染研法とSmartAmp法の核酸増幅反応判定の比較 疑陽性時の対応

	国立感染研方式	SmartAmp法
増幅反応検出	TaqManプローブ	Eプライマー
融解曲線解析	不可	可能
非特異反応の評価	不可	融解曲線解析で 評価し排除可能
最終判定	増幅曲線のみ で判定	増幅曲線と融解 曲線解析で判定
偽陽性時対応	再検するのみ	疑陽性はない



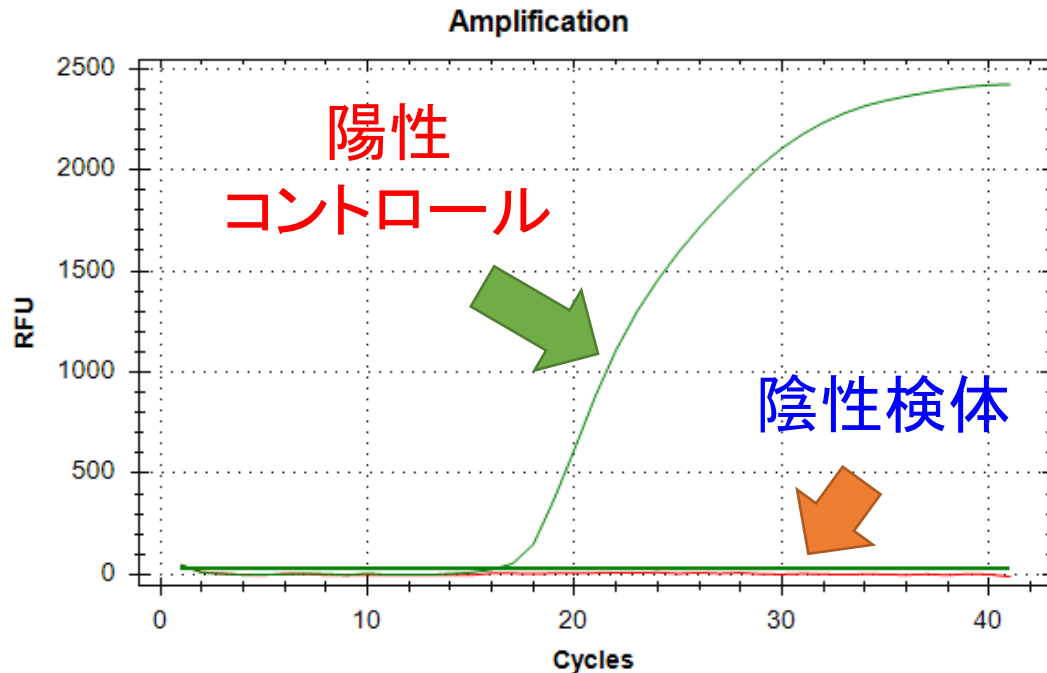
SmartAmp法・融解曲線分析による 新型コロナウイルスの核酸検査法の判定のワークフロー

増幅曲線	融解曲線 陽性コントロールと 一致する融解曲線 ピークの有無	判 定	対 応	考えられること
両方とも あり	あり	陽性		
	なし	陰性		プライマーダイマー形成
片方のみ あり	あり	判定保留	直ちに 再検査	陽性コントロールの コンタミ
	なし	陰性		プライマーダイマー形成
両方とも なし		陰性		

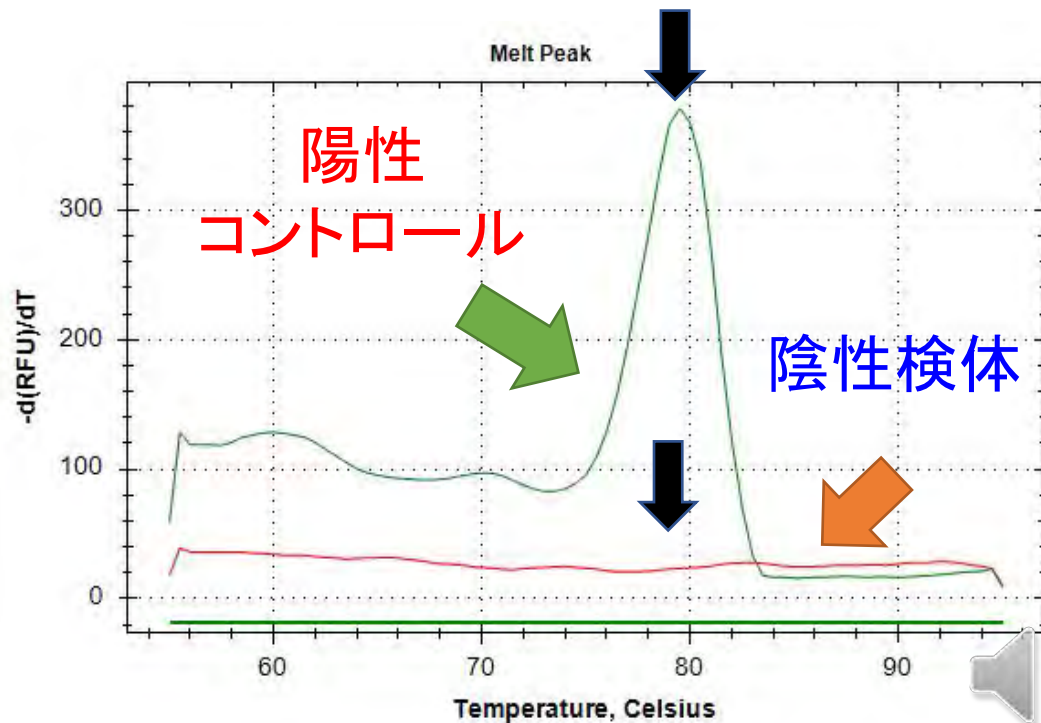


陰性例

増幅曲線

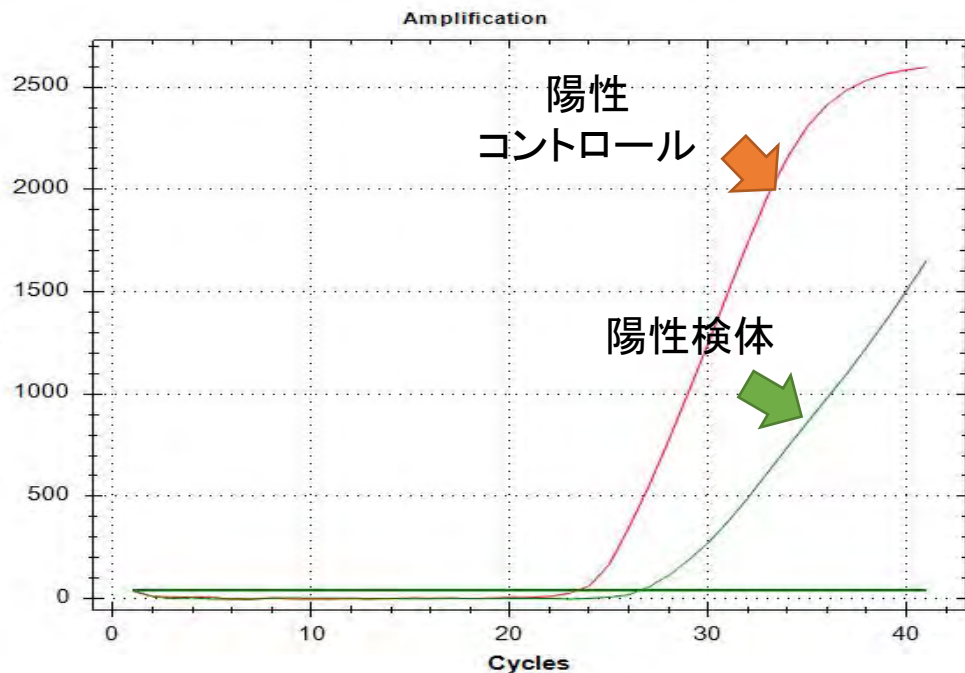


融解曲線

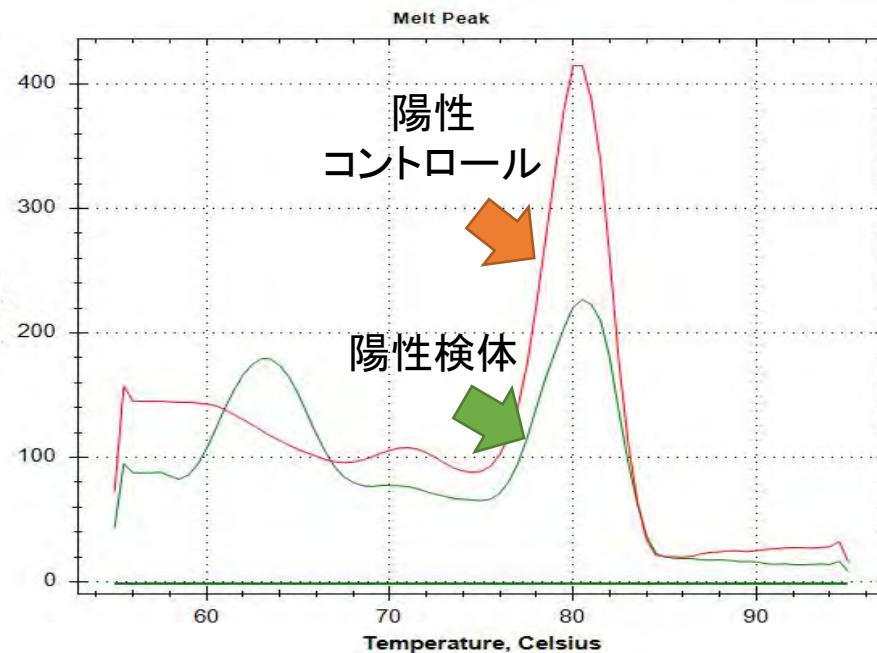


陽性例

増幅曲線

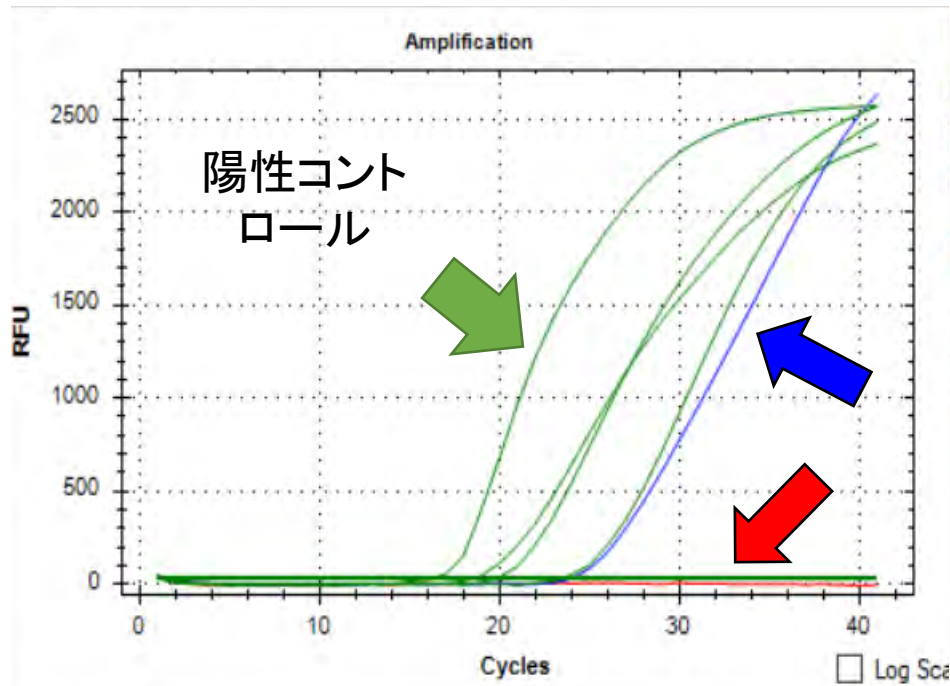


融解曲線

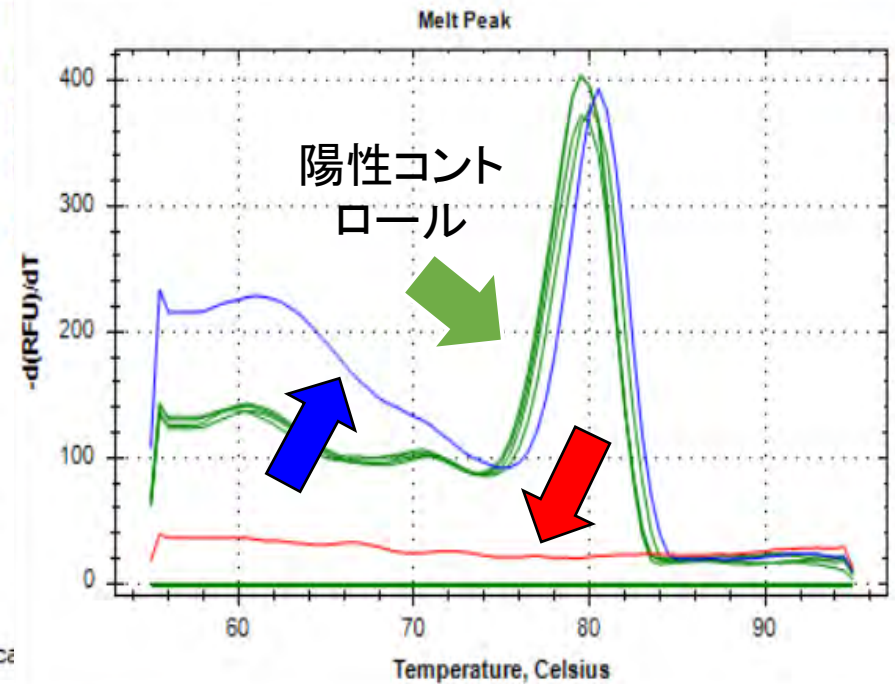


判定保留例

増幅曲線



融解曲線



同一検体を同時に測定している(赤矢印)(青矢印)が、一方は陽性で一方は陰性を示している。この原因は(青矢印)検体に陽性コントロールが混入したことでおきた事例。



精度管理－2

ウイルス量(コピー数)



不活化法＋SmartAmp法＋融解曲線分析 COVID-19の高精度確定診断法

検体採取



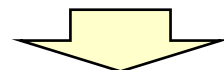
直ちにSSB1mlで不活化



スピнкаラムでRNA抽出精製



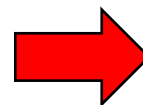
SmartAmp法による核酸増幅



融解曲線分析



最終判定

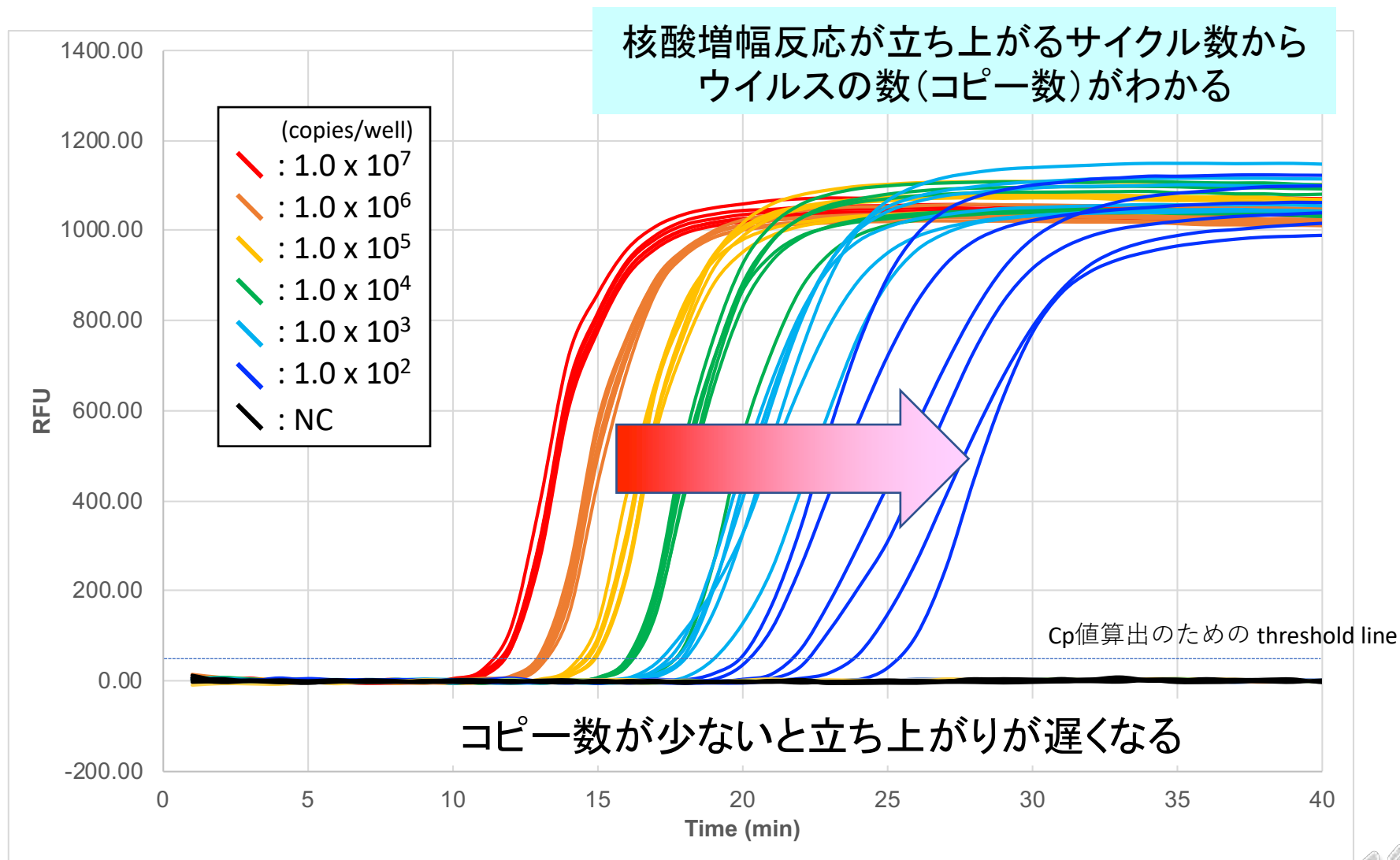


陽性検体は
ウイルス量を
算出

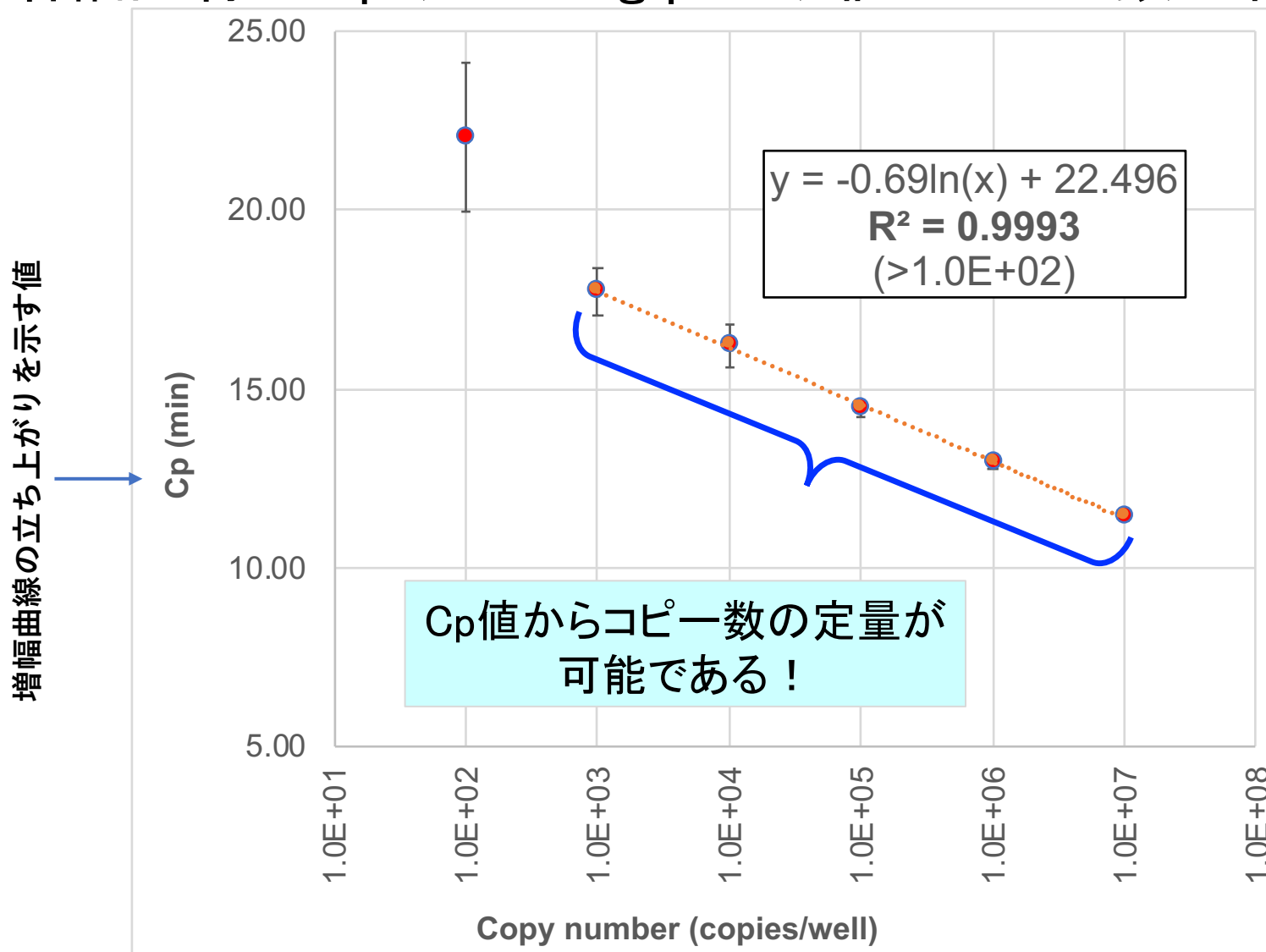


SmartAmp-SARS-CoV-2 detection kit (version 2.6.2)

増幅結果



増幅曲線のCp (crossing point) 値とコピー数の相関性



100 (1.0E+02) コピー/well では、Cp値のばらつきが大きく生じているが、1000 (1.0E+03) コピー/well 以上では、ばらつきも少なく、それ以上のコピー数でのCp値では、高い相関性を有している ($R^2 = 0.999$)。

新型コロナウイルス定量マニュアル

(いすみ医療センター・県立佐原病院・皆野病院・塩田病院)

基礎検討の結果、1000 (1.0E+03) コピー/well 以上では、ばらつきも少なく、それ以上のコピー数でのC_p値では、高い相関性を有している (R² = 0.999)ことから、当検査室では、臨床検体のPCR検査では、

- ① 陰性コントロール(蒸留水)、
- ② 陽性コントロールー1(10万コピー/10 μ l、測定キット添付品)、
- ③ 陽性コントロールー2(1万コピー/10 μ l、測定キット添付品の10倍希釈)、
- ④ 陽性コントロールー3(1,000コピー/10 μ l、測定キット添付品の100倍希釈)

陽性コントロールは、②～④の3つを用いる。

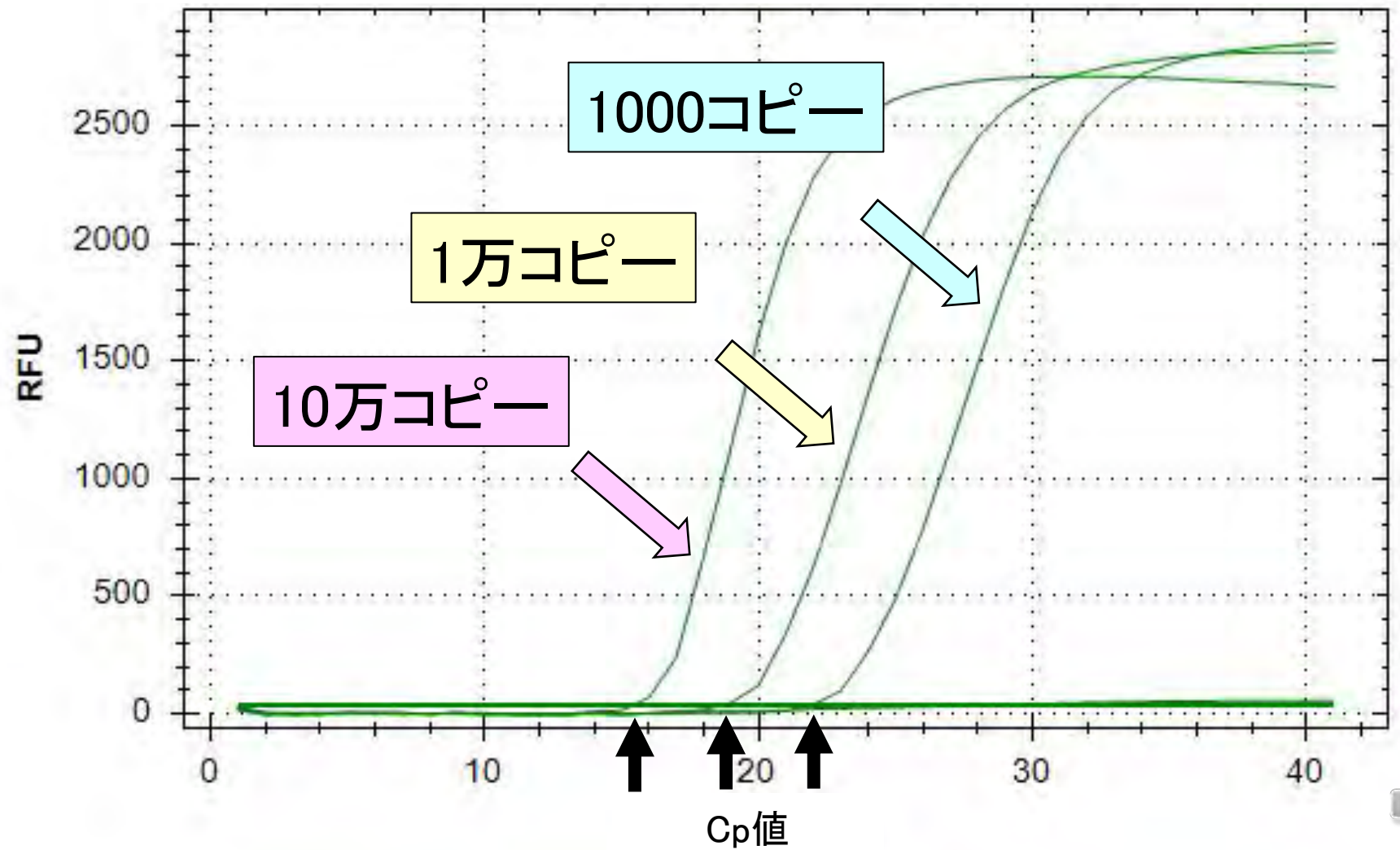
試薬キットの測定可能検体数の制限がある場合は、②および④の2つを陽性コントロールとして用いる。



標準物質をもちいた検量線解析

CFX96touchを使用

2020-12-04



標準物質による標準検量線解析

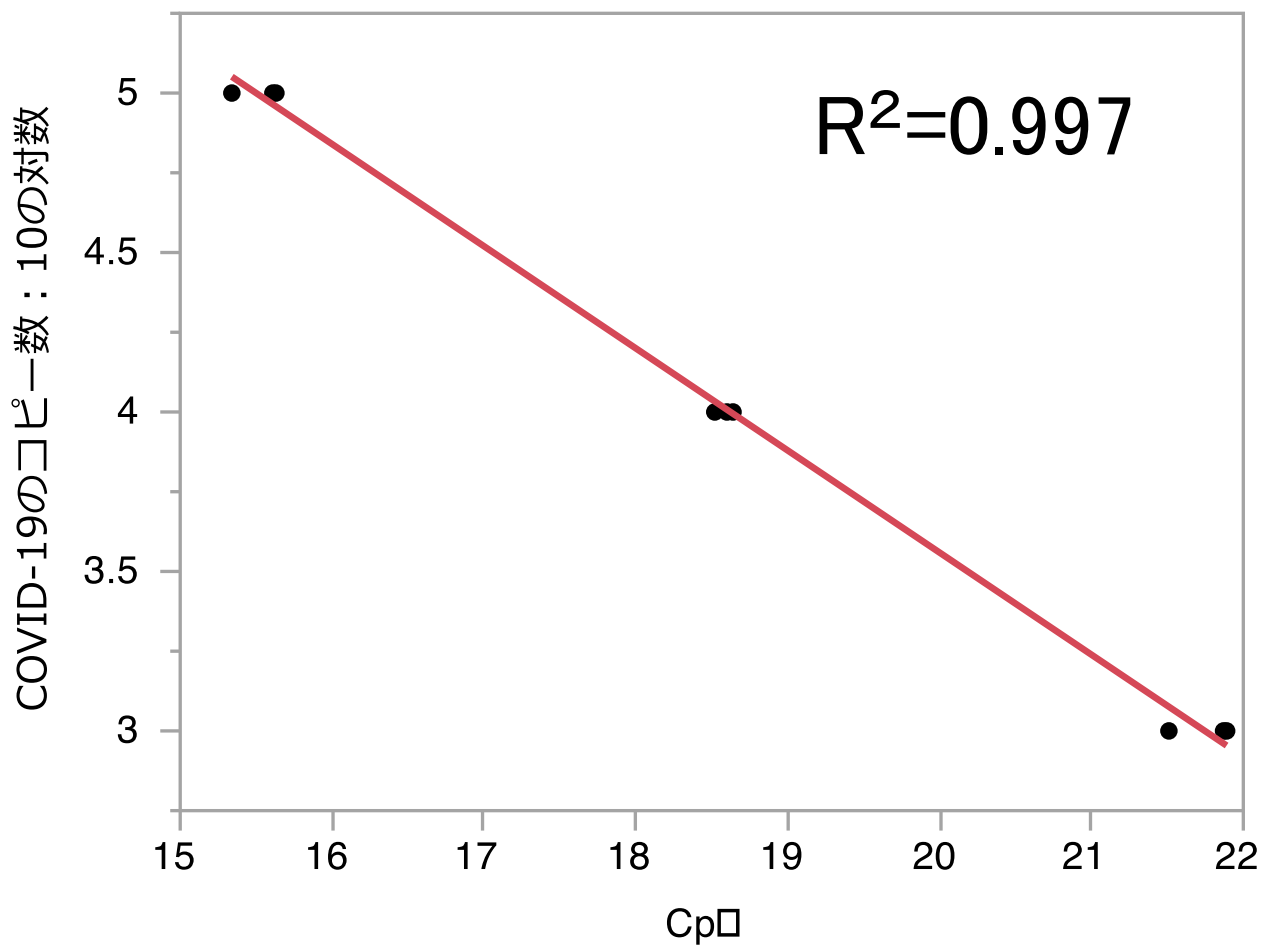
2020-12-04

COVID-19コピー数	対数表示	Cp値
1000	3	21.51
1000	3	21.87
1000	3	21.89
10000	4	18.52
10000	4	18.60
10000	4	18.64
100000	5	15.63
100000	5	15.34
100000	5	15.61



標準物質を用いたCOVID-19検量線解析

2020-12-04



$$\text{COVID-19のコピー数：10の対数} = 9.96 - 0.320 \times \text{Cp値}$$



COVID-19PCRウイルス定量検査研修評価指標

PCRプレートへの試薬・試料アプライ

評価指標と規定因子

①標準物質(10万コピー)のC_p値とその再現性

- ・試薬調製の再現性
- ・PCRプレートの温度管理

- ・試薬と検体の添加手技の再現性
- ・試薬と検体の攪拌混合の再現性

②陰性コントロールのコンタミの有無

③検量線のY切片・傾きと再現性



検査室PCR検査担当人材育成工程表

- 12月3日～12日 M技師集中研修開始
(研修指標) ①RNA抽出＋核酸増幅の一連作業を実検体を用いて7回実施
②実検体なし(蒸留水をもちいて)を含めて、標準物質を用いて検量線作成を10回実施→結果はメール送信
- 12月7日～18日 PCR担当技師を2名追加選任し、実検体を用いてRNA抽出を習得
- 12月14日～18日 M技師は、実検体を用いて核酸増幅＋検量線作成のみを5回実施
- 12月21日～28日 M技師は、実検体を用いて核酸増幅＋検量線作成のみを7回実施

達成目標: 検量線: 25本以上の作成



ウイルスコピー数定量の精度管理指標

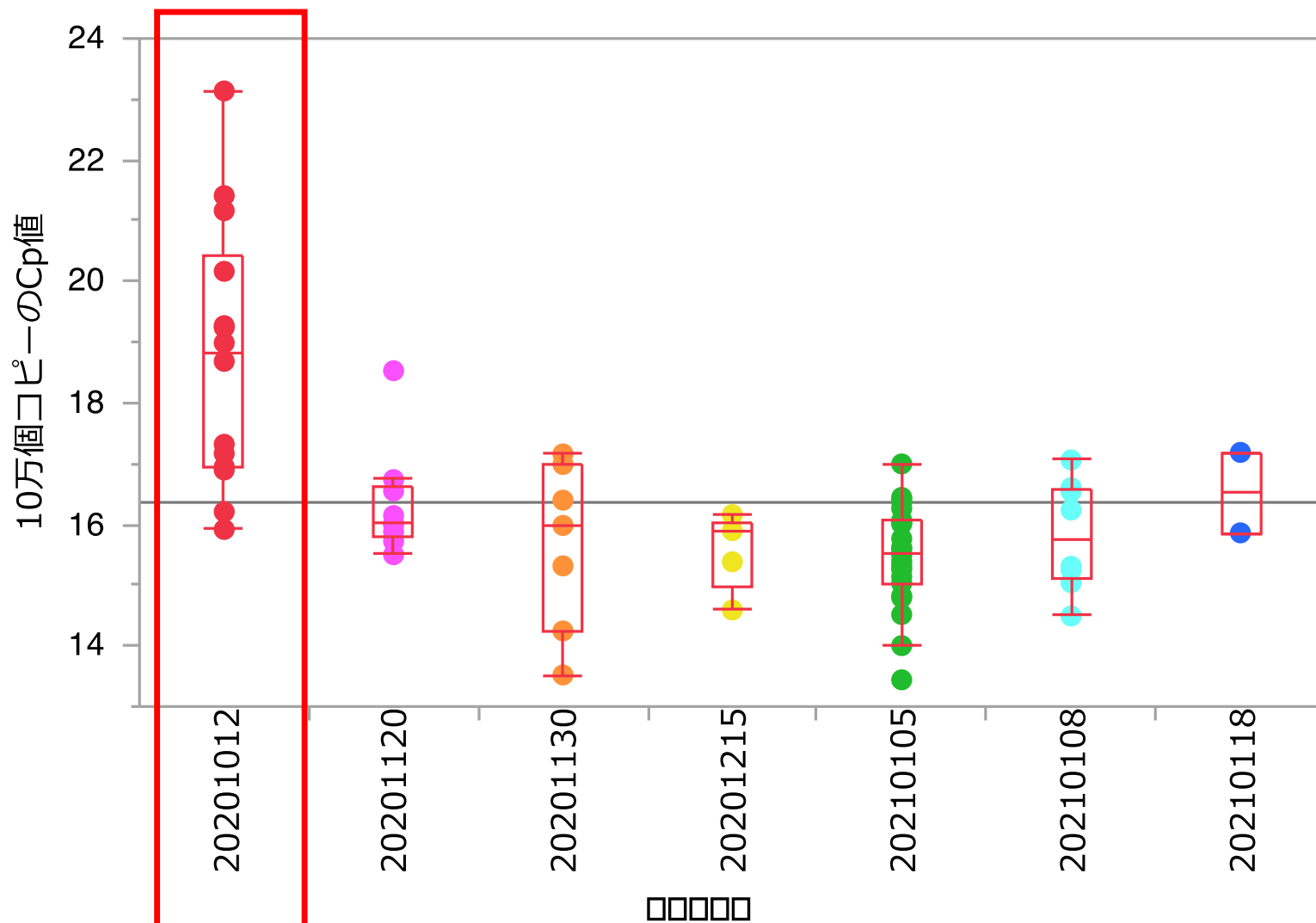
1. 標準物質(10万コピー)のCp値とその再現性

2. 検量線の ①相関係数 ②Y切片 ③傾き

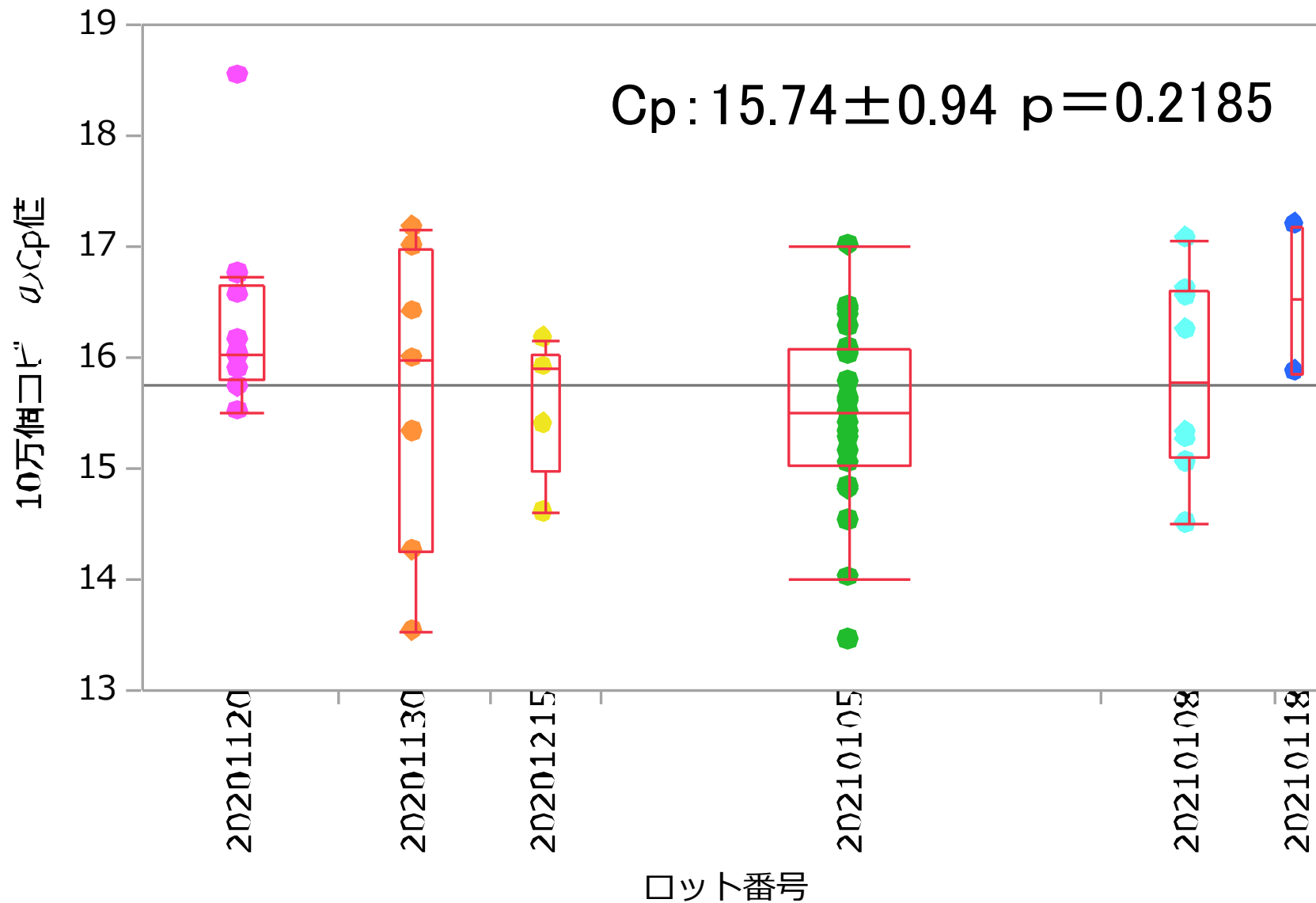
ロット	20201012	20201120	20201130	20201215	20210105	20210108	20210118
測定回数	14	9	7	5	23	8	2
10万のCp値	18.7513	16.3413	15.6583	15.5840	15.4740	15.8163	16.5225
相関係数	0.6713	0.9524	0.9494	0.9310	0.9536	0.9582	0.9416
Y切片	10.9760	10.5384	11.1183	8.1975	11.5777	11.3049	11.9682
傾き	0.3407	0.3463	0.3927	0.2101	0.4285	0.4047	0.4224



評価指標① 標準物質(10万コピー)のCp値とその再現性 (全期間)



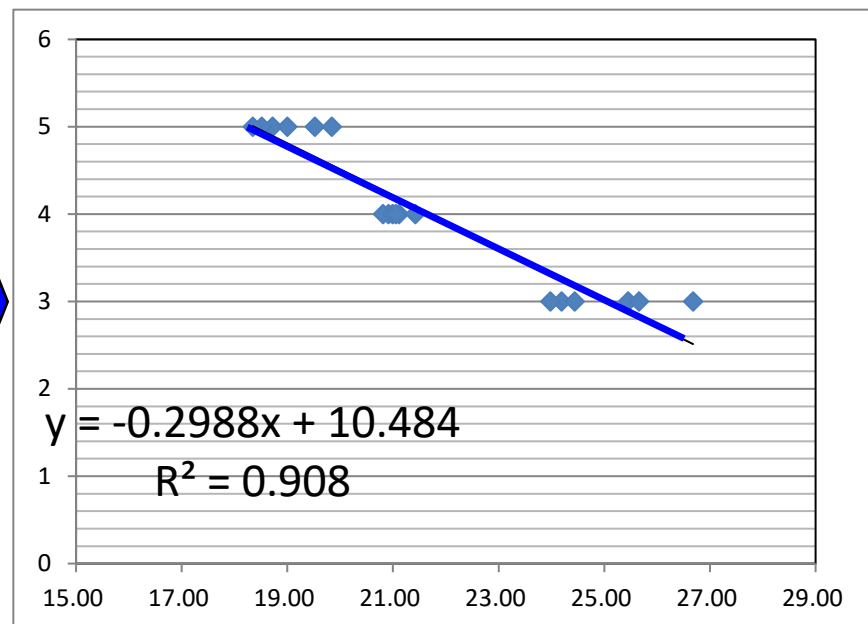
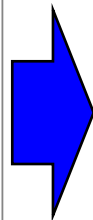
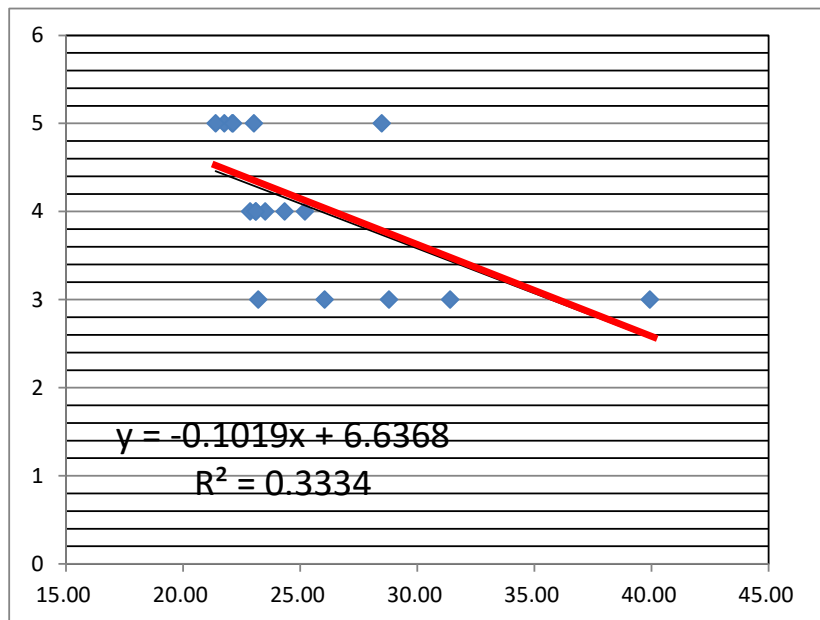
評価指標① 標準物質(10万コピー)のC_p値とその再現性 (本運用期間)



M技師による COVID-19検量線作成の手技向上

2020-12-07
(自力測定第1回)

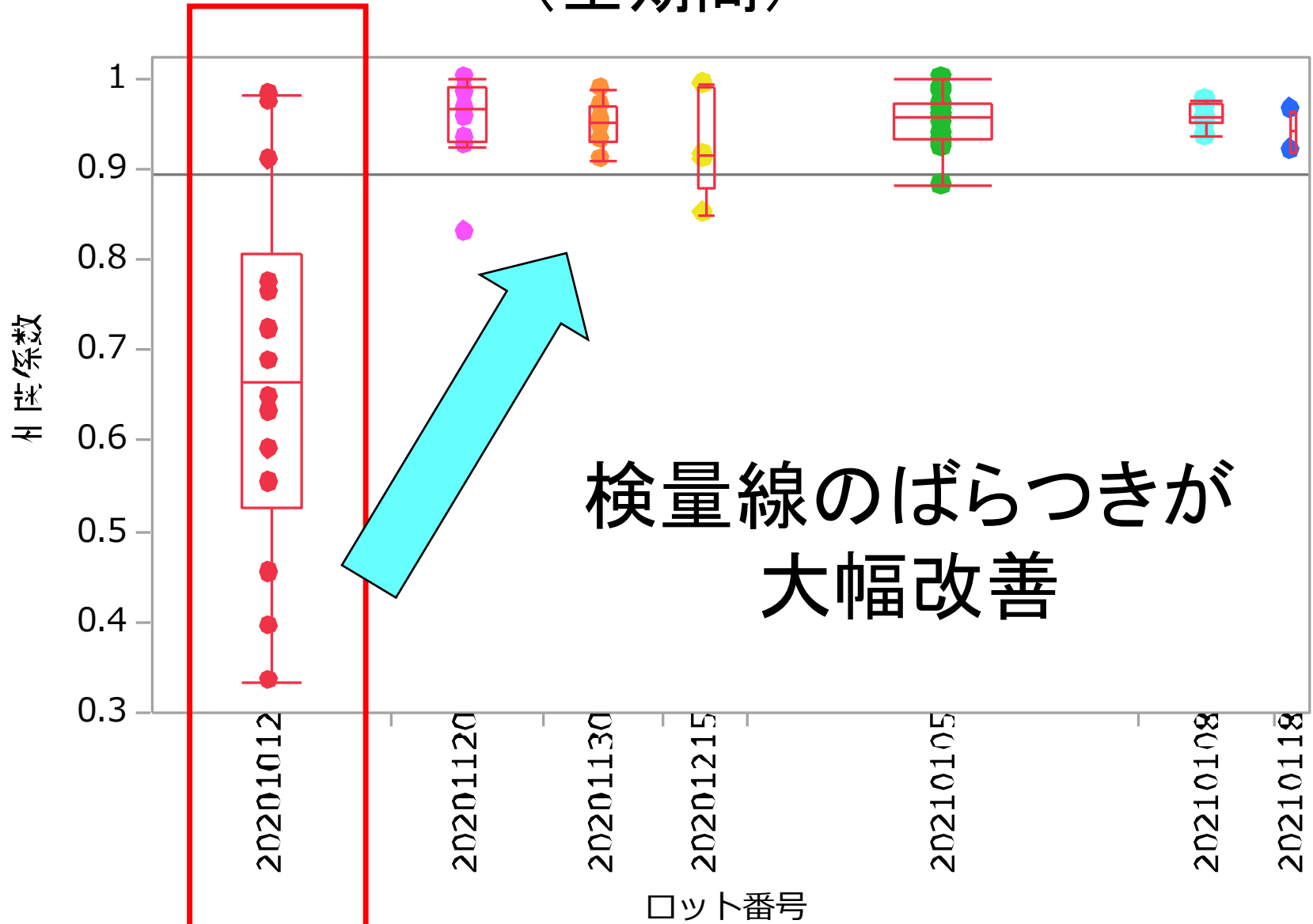
2020-12-16
(自力測定第8回)



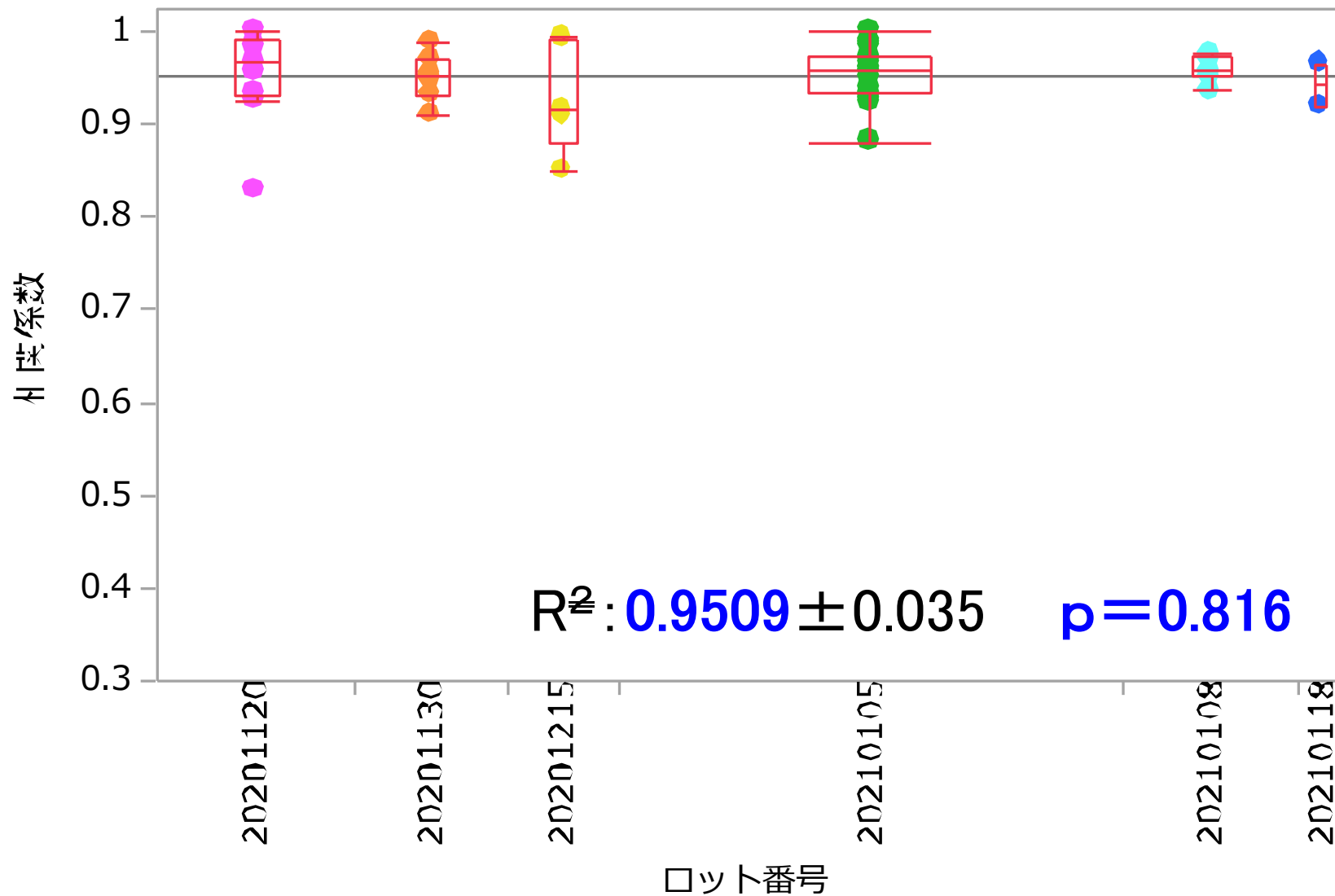
測定値のバラツキの大幅な改善
相関係数(R^2)の大幅な改善



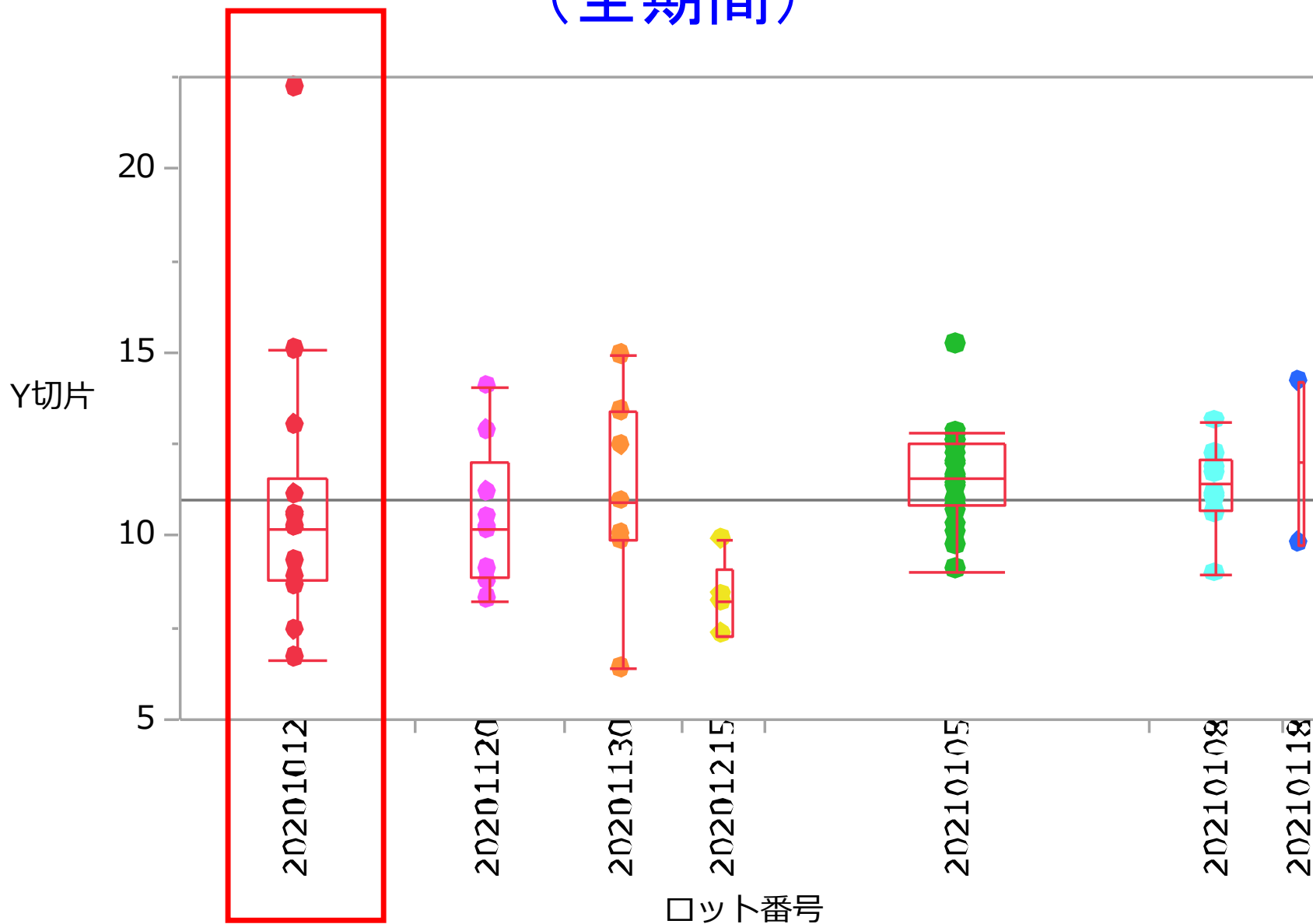
評価指標②-1 検量線の相関係数とその再現性 (全期間)



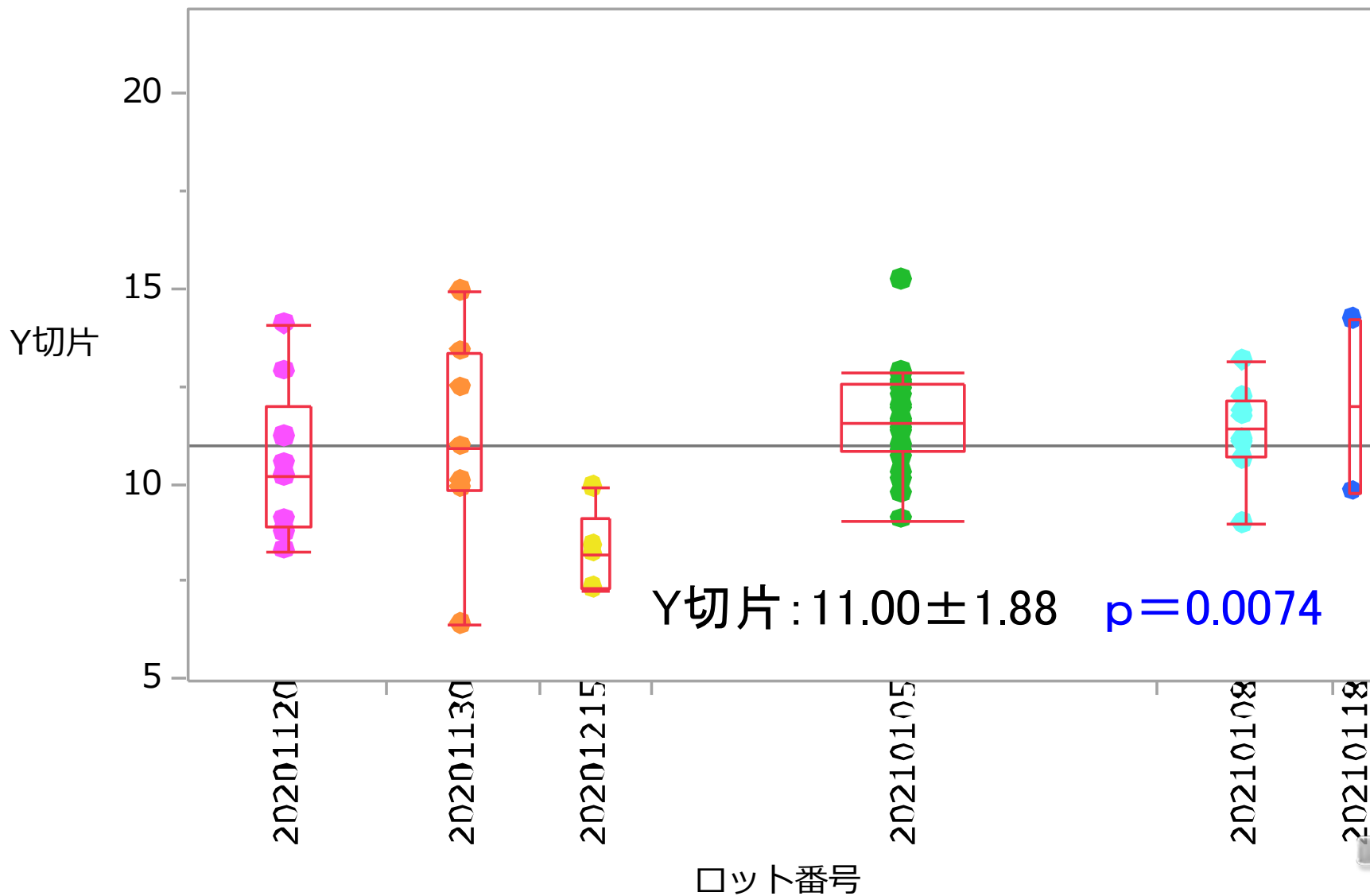
評価指標②-1 検量線の相関係数とその再現性 (本運用期間)



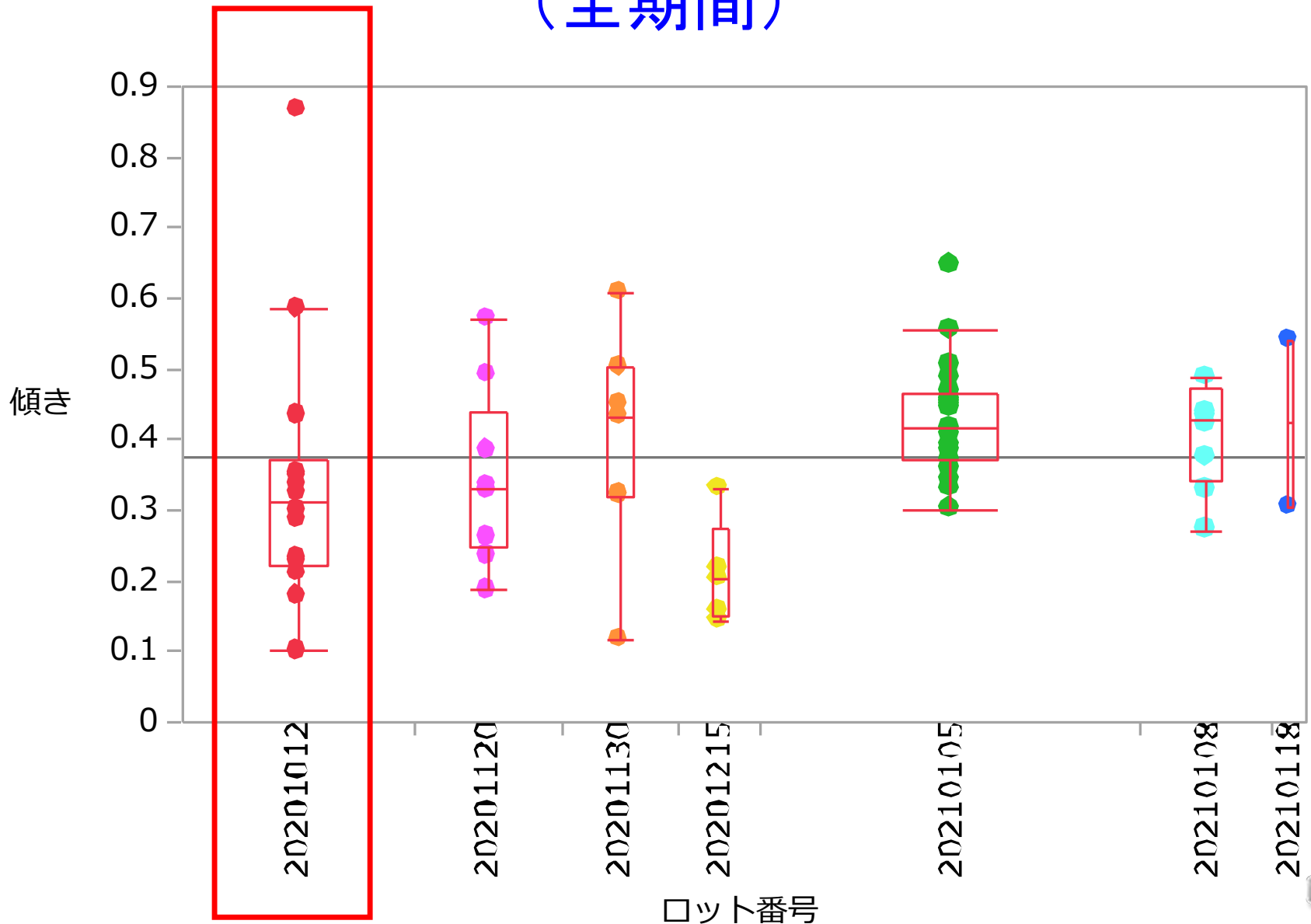
評価指標②-2 検量線のY切片とその再現性 (全期間)



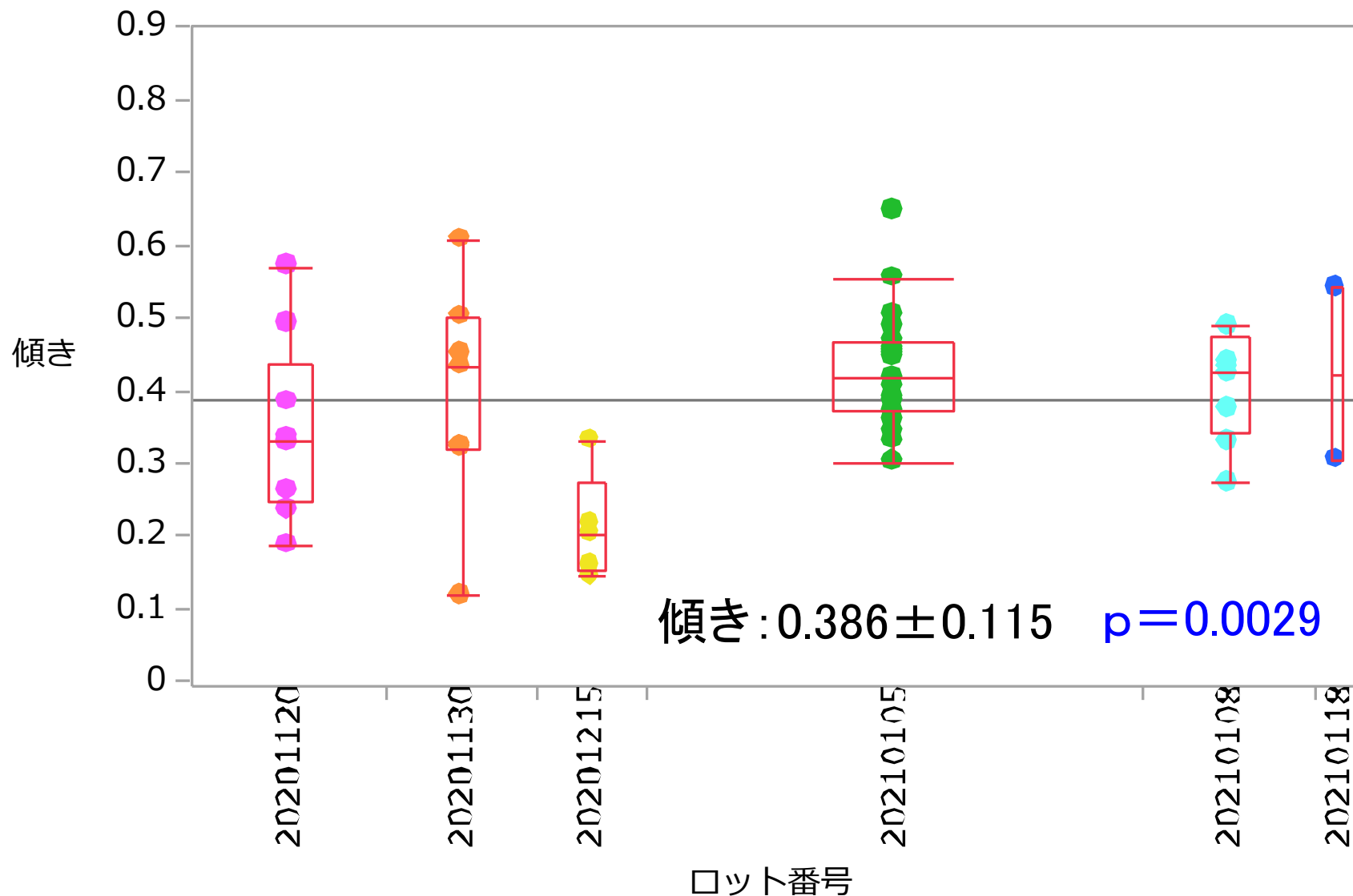
評価指標②-2 検量線のY切片とその再現性 (本運用期間)



評価指標②-3 検量線の傾きとその再現性 (全期間)



評価指標②-3 検量線の傾きとその再現性 (本運用期間)



皆野病院のPCR検査報告書

<input type="checkbox"/>	検査名称	正常値範囲	単位	結果値
<input type="checkbox"/>	新型ｺﾛﾅPCR			
<input type="checkbox"/>	新型ｺﾛﾅPCR 判定			陽性
<input type="checkbox"/>	新型ｺﾛﾅPCR 定量	0	copy/ml	29047 H
<input type="checkbox"/>	感染力(鼻咽頭)			低

③感染力(鼻咽頭拭い液の場合)

低: ウイルス量 < 100万コピー/ml

中: ウイルス量 100万コピー/ml ~ < 1000万コピー/ml

高: ウイルス量 \geq 1000万コピー/ml

④感染力(唾液検体の場合)

低: ウイルス量 < 1万コピー/ml

中: ウイルス量 1万コピー/ml ~ < 10万コピー/ml

高: ウイルス量 \geq 10万コピー/ml



鼻咽頭拭い液のウイルス定量(コピー数/ml)の結果一覧 100コピー/ml未満を除く

当院のCOVID-19
院内PCR検査総数と陽性率
(2021-01-01~2021-01-31)

総件数: 149件

陽性件数: 19件

陽性率: 12.7%

	コピー数/ml
1	451
2	512
3	3,608
4	4,636
5	6,952
6	8,219
7	27,394
8	29,047
9	29,437
10	79,187
11	136,773
12	233,660
13	565,029
14	657,676
15	1,664,602
16	21,191,027
17	37,176,286
18	43,740,123
19	188,033,400



まとめ

1. 核酸増幅反応と融解曲線分析の組み合わせにより、正確な新型コロナウイルス感染の陰性・陽性判定法を確立した。
2. 検査精度の向上を図り、新型コロナウイルス定量法を確立した。
3. PCR検査を担当する臨床検査技師のトレーニングプログラムと評価システムを確立した。

