

1. 臨床材料の処理及び RNA 抽出 SOP

臨床材料には、綿棒等で咽頭及び鼻腔などを拭いメディアウムに浸したものの、うがい液及び鼻腔洗浄液など PBS(－)の洗浄液、あるいは気管吸引液や喀痰など下気道から採取されたものなどがある。(付録 2 を参照)

1.1. ウイルス分離用検体の輸送と保存

分離用検体は、4℃に保存し凍結を避けて輸送する。保存期間が 1 週間を超えるようであれば凍結保存し、輸送時は凍結融解を避け、凍結の状態に輸送する。当所においても搬入後、検体処理を行うまで同様の基準で保存する。

1.2. 検体処理

臨床検体の処理は第一 P2 実験室にて行う。臨床検体のふたを開ける場合、又は臨床検体をチューブに移す場合には安全キャビネットを使用する。

1.2.1. 上気道由来検体

綿棒が液体に浸っている場合は滅菌済ガラス棒で良くしごいた後に綿棒を抜き取る。その後チューブ内容物を全て 15mL チューブに移し、3,000 rpm 15 min 遠心を行い、上清を接種試料や RNA 抽出用検体とする。綿棒がない場合は、そのまま 15mL チューブに移し、3,000 rpm 15 min 遠心を行う。

1.2.2. 下気道由来検体

気管吸引液等、比較的粘性の低い液体の場合は 2.2.1.の上気道由来検体に準じて行う。粘性の高い喀痰成分の場合は国立感染症研究所：インフルエンザウイルス遺伝子検査およびウイルス分離のための喀痰検体の前処理法（第 1 版）に従って行う。

1.3. 処理済み検体の保存

ウイルス分離用接種又は RNA 抽出に用いた残りの遠心上清は-80℃に保存する。メディアウムが使用されていない場合は 2x 保存用 PBS と等量混ぜ合わせてから保存する。

2x 保存用 PBS(－)

0.4%BSA

2x ペニシリン+ストレプトマイシン*

2x ファンギゾン溶液*

2x ゲンタマイシン溶液*

*培養培地の組成 (2.1.1) を参照

1.4. 遺伝子検出用 RNA 抽出

キットに記載のマニュアルに従って行う。詳細は各遺伝子検査作業手順書 (Flu-1~4) に記載。

抽出用試薬：Roche High Pure Viral RNA Kit (Cat No. 11 858 882 001)

Binding buffer に臨床検体を加えボルテックスによる攪拌を行うまでは第一 P2 実験室内にて行う。その後の RNA 抽出は観察室実験台にて行う。

1.5. 精度管理

RNA 抽出キットは使用毎にロットナンバーと使用期限を作業手順書に記入し、使用期限を確認する。

2. MDCK 細胞を用いた分離培養 SOP

国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版に従い MDCK 細胞を用いてウイルスを分離培養する。

2.1. MDCK 細胞の培養

2.1.1. 培養器具及び試薬

単層培養用ルービン（細胞培養用 150 cm² プラスチックフラスコに相当）

MDCK 培養用培地 500mL

	使用量	最終濃度
D-MEM（ニッスイ Code05919）	4.75g	
ウシ胎児血清（FBS）	50mL	10%
L-グルタミン溶液（200mM）	10mL	4mM
ペニシリン溶液*		100 単位/mL
ストレプトマイシン溶液*		100 μg/mL
ファンギゾン溶液（250 μg/mL） （GIBCO 15290-018）	2.5mL	1.25 μg/mL
ゲンタマイシン溶液（50mg/mL） （GIBCO 15750-060）	0.5mL	50 μg/mL
7.5%重炭酸ナトリウム溶液	10mL	0.15%

(*P+S ストック溶液：ペニシリン G カリウム 100 万単位、硫酸ストレプトマイシン 1g/50mL)

1%トリプシン

0.02% EDTA-PBS(-)

2.1.2. 継代培養

- 1) 単層培養したルービンから培地を除去する。
- 2) 0.02% EDTA-PBS(-)を 10mL 静かに加え細胞の表面を洗浄し、液を除去する。x2 回
- 3) 0.02% EDTA-PBS(-) 5mL 及び 1%トリプシン 0.5mL を加え、37°Cに保温する。
- 4) 細胞が剥がれてくることが確認できたらびんを軽くたたいて完全に剥がし、培地 5mL を加えて細胞を懸濁する。
- 5) 1,000 rpm 5min 遠心後、上清を除去し、10mL の培地で再懸濁する。
- 6) 30mL の培地を入れた新しいルービンに 5)で得られた細胞懸濁液 1mL を加え、37°Cで培養する。

2.1.3. 細胞ストックの作成

- 1) 継代培養と同様に 1～4 の操作を行う。5) で得られた細胞ペレットに、培地 10mL の代わりに 10%FBS-DMSO 10mL を加えて懸濁する。細胞濃度は 1x10⁶ cell/mL 以上になっている。

- 2) 予め細胞名と凍結年月日を記入した 2mL セラムチューブに細胞懸濁液を 1mL ずつ分注し、厚手のタオル等に包み、以下の温度条件で徐々に凍結させる。
-20°C 2 時間、-80°C 1 晩、その後液体窒素タンクに移す。

2.1.4. 細胞の再起培養

- 1) 液体窒素タンクからセラムチューブを 1 本以上取り出し、直ちに 37°C ウォーターバス内で振とうし、速やかに融解させる。
- 2) 融解した細胞懸濁液全量を 10mL 培養液の入った 15mL チューブに移す。
- 3) 1,000 rpm 5min 遠心後、上清を除去し、新たに培地 10mL を加え、細胞名と実施日を記入した 75 cm² フラスコで培養する。

2.2. ウイルス分離培養

2.2.1. 培養器具及び試薬

細胞培養用 24 well プレート、6 well プレート
ウイルス分離培地 500mL

	使用量	終濃度
D-MEM (ニッスイ Code05919)	4.75g	
10%BSA 溶液 (fr.V) (Sigma A9418)	10mL	0.2%
L-グルタミン溶液 (200mM)	10mL	4mM
ペニシリン溶液*		100 単位/mL
ストレプトマイシン溶液*		100 μg/mL
ファンギゾン溶液 (250 μg/mL) (GIBCO 15290-018)	2.5mL	1.25 μg/mL
ゲンタマイシン溶液 (50mg/mL) (GIBCO 15750-060)	0.5mL	50 μg/mL
ビタミン溶液 x100 (MP Biomedical 1601449)	15mL	3x
10%ショ糖溶液	5mL	0.1%
7.5%重炭酸ナトリウム溶液	10mL	0.15%

アセチルトリプシン (10mg/mL) (Sigma-Aldrich: Cat No.T-6763)

PBS(-)

2.2.2. MDCK 細胞浮遊培養法

1) 2.5 μg/mL の濃度にアセチルトリプシンを添加した分離培地を用いて約 1x10⁶/mL に調整した MDCK 細胞浮遊液を、24 well プレートの各 well に 0.5mL ずつ分注する。

1 検体当たり 4 well を準備する。

※confluent となったルービン 1 本から 18 検体分 (36mL) の細胞浮遊液が得られる。

2) well 当たり 0.1mL の検体を接種し、34°C で培養する。

3) 細胞変性効果 (CPE) の有無を毎日観察し、CPE が出現したら培地を回収する。接種 7 日後までに CPE が認められない場合は回収し、その 0.1mL を新たな well に継代(blind passage)接種する。(標準検査は CPE を認めない場合 2 継代目で終了)

2.2.3. MDCK 細胞シート法

継代培養や力価測定用ウイルス液を得るために、6 well プレートを使用する方法

- 1) 単層培養したプレートから培養液を除去し、PBS(-) 2mL で洗浄する。2mL の分離培地でリンスした後、接種試料 0.2mL を接種する。
- 2) 30~60 分 34°C でウイルスを吸着させる。
- 3) 2.5 μ g/mL アセチルトリプシン添加一分離培地 2mL を加えて 34°C で培養する。
- 4) 細胞変性効果 (CPE) の有無を毎日観察し、CPE が 80%以上出現したら培地を全量回収する。

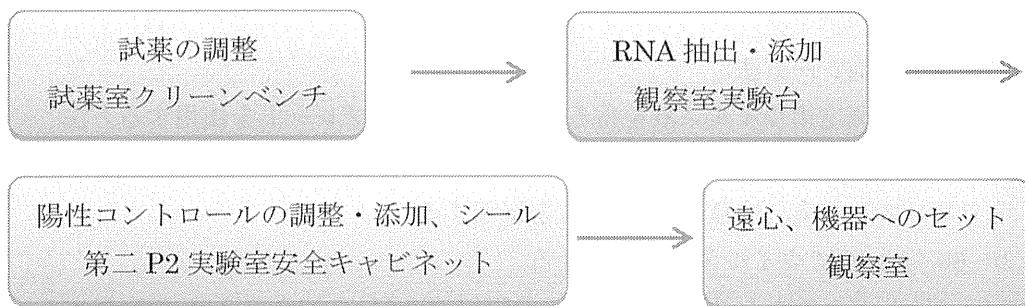
CPE が観察された場合の継代は、10 倍及び 100 倍に希釈して行う。ただし HA 価が十分に上昇しない場合は希釈せずに行う。

2.3. 精度管理

1 シーズンに 1 度は、受領後 5 継代以内に液体窒素に貯蔵した細胞を起こして、新しいものに切替える。臨床検体からのウイルス分離率が低下した場合には、最近分離したウイルス株を用いて分離効率を検討し、効率が低い時には細胞を新しく起こす。

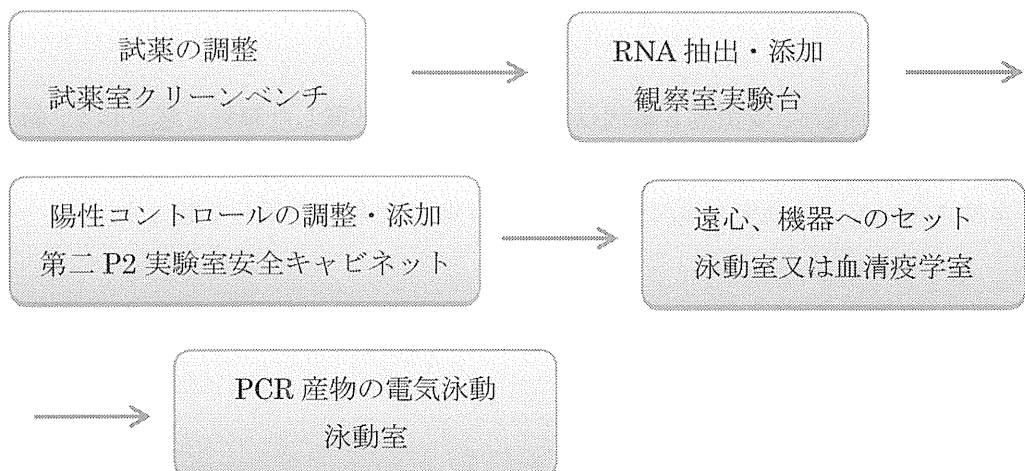
3. 遺伝子検査における標準的実験室使用方法

3.1. リアルタイム RT-PCR 法の場合



可能であれば試薬の調整、RNA 抽出、陽性コントロールの調整は別々の人が行う。
一人で検査を行う場合、試薬の調整の前に RNA 抽出を行ってもよいが、必ず手袋を替える。

3.2. コンベンショナル RT-PCR 法の場合



可能であれば試薬の調整、RNA 抽出、陽性コントロールの調整は別々の人が行う。
一人で検査を行う場合、試薬の調整の前に RNA 抽出を行ってもよいが、必ず手袋を替える。

何れの場合も、RNA 抽出以外の段階で上記動線を遡ることのないよう留意して作業する。

4. 遺伝子検査（リアルタイム RT-PCR 法）SOP

国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル第3版及び鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル第2版に従って、重症インフルエンザ患者由来検体の検査及びトリインフルエンザによる感染が疑われる患者由来検体の検査を行う。 ←※本稿では以下記載を省略

5. 型・亜型同定検査及び抗原性解析 SOP

国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版に従って、ウイルス分離を行った分離株の型・亜型をインフルエンザウイルス同定キット（毎年、国立感染症研究所より配布）を用い、赤血球凝集（HA）試験及び赤血球凝集抑制（HI）試験にて同定する。HA 及び HI 試験にて同定困難な場合はコンベンショナル RT-PCR 法にて同定を行う。

5.1. 検査手順書 Flu-3（ウイルス分離同定検査作業手順書・記録書）を使用する。

5.2. 検査に使用するサンプル

初代ウイルス分離株を用いる。1mL 以上の分離上清が得られない場合あるいは HA 価が低値の場合は継代培養をする。

5.3. 検査機器及び試薬

プレート振とう機、96 穴丸底プレート、96 穴 V 字プレート
12 連及び 8 連ピペット、分注ピペット
0.5%ニワトリ赤血球浮遊液、
0.5%ガチョウ赤血球浮遊液、
0.75%モルモット赤血球浮遊液

5.3.1. 赤血球浮遊液の調製（用時調製）

1) ニワトリ及びガチョウ血液は、採血直後に 15mL 又は 50mL チューブ内（採血日を記載）でほぼ同じ体積のアルセバー氏液と混合し、保存血とする。モルモット保存血液は購入したものを使用する。

2) 保存血液を 1.5mL サンプルチューブに取り、PBS(-)にて 2 度洗浄（5,000rpm 2min）

3) 15mL 又は 50mL チューブを用いて、PBS(-)にて赤血球を至適濃度(v/v)に調整する。

アルセバー氏液

クエン酸	0.55 g
クエン酸三ナトリウム二水和物	9.11 g
塩化ナトリウム	4.2 g
ブドウ糖	20.5 g

1 L の D.W.に溶解し、オートクレーブ滅菌する。

5.4. 試験方法

国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版に従う。HA 試験は全ての分離株に対し 3 種類の赤血球を使用する。ニワトリ及びガチョウ赤血球は丸底、モルモット赤血球は V 字プレートを使用する。4HA/25 μ l 希釈液が作成できない低 HA 価分離株の場合は継代培養を行うか、コンベンショナル RT-PCR にて型別・亜型決定を行う。HI 試験に使用する血球種は、HA 価に基づいて分離株ごとに 3 種から 1 種を選択する。

5.5. 型・亜型（系統）決定及び抗原性解析

4種類の抗血清の中で、有意な凝集抑制がみられた抗血清の型・亜型（B型の場合は系統）を分離株の型・亜型（系統）と判定する。また同時に試験を行った標準抗原のHI価と比較しその抗原性を解析する。検査記録書に結果を記入し、検査終了。

6. 遺伝子検査、型・亜型同定検査－（コンベンショナル RT-PCR 法）SOP

4.遺伝子検査（リアルタイム RT-PCR 法）により判定保留となった場合、及び5.型・亜型同定検査にて同定困難となった場合は、国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル第3版及び鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル第2版に従って、コンベンショナル RT-PCR 法を行い総合的に判断する。

6.1. 検査手順書 Flu-1～3のうち適切な書式を使用する。

6.2. 検査に使用するサンプル

遺伝子検査（リアルタイム RT-PCR 法）に用いた RNA 若しくはウイルス分離株の抽出 RNA を用いる。

6.3. 検査機器及び試薬

サーマルサイクラー：ABI; Veriti, ASTEC; PC816, Bio-Rad; MyCycler, TAKARA; Dice
コンベンショナル RT-PCR 用反応試薬：One Step RT-PCR kit (QIAGEN Cat No. 210210)

コンベンショナル RT-PCR 用プライマー及びプローブ：インフルエンザ診断マニュアル第3版、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル第3版及び鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル第2版記載のものを使用する。

プライマーを新しく希釈するときは 100 μ L 程度とし、凍結融解を極力避ける。マイナス 30℃に保存する。

RT-PCR 用陽性コントロール：国立感染症研究所より配布された識別マーカ入り H5、識別マーカ入り H7、H1N1pdm RNA 陽性コントロール及び当所で作成した H3、H1, Type B RNA 陽性コントロールを使用する。（リアルタイム法と同じもの）

6.4. 反応条件

各サーマルサイクラー：Type A, H1pdm, H5, H7 検査；プログラム AswH1
H1, H3, Type B 検査；プログラム AH1H3

6.5. 結果解析

各検査系の PCR 増幅液を 1.2～1.5%アガロースゲル電気泳動して、PCR 産物の有無とバンドサイズの確認により判定する。Type A:244bp、H1pdm09:349bp、H5:424bp、H7:284bp、H3:1143bp、H1（ソ連型）:729bp、Type B:1116 もしくは 1119bp。

ゲルの写真を撮り記録書に添付する。検査記録書に結果を記入して検査終了。

6.6. 精度管理

前回の検査実施から一年以上経過した場合には、検出感度を管理するために各陽性コントロールを検体に用い、増幅産物のアガロースゲル電気泳動後のバンドサイズを確認する。

また、試薬のロットを変更した場合には陽性コントロールの増幅をみて検出感度が保たれていることを確認してから使用するか、やむを得ない場合は検査時に並行試験を行って必ず確認する。

7. 薬剤耐性マーカー検査 SOP

国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版、Allele-specific RT-PCR 法及び H1N1pdm オセルタミビル耐性株検出法 2010 年 11 月 Ver.1 に従い AH1pdm09 ウイルス分離株より N1 遺伝子の H275Y 変異を検出する。←※本稿では以下記載を省略

8. 遺伝子解析 SOP

国立感染症研究所：インフルエンザ診断マニュアル第3版に従って、分離培養株から抽出した RNA から RT-PCR にて解析領域を増幅し、シーケンサーにて塩基配列を解析する。←※本稿では以下記載を省略

付録1 関係試薬・機器リスト

※) ウイルス検査全般で共用する機器

試薬保存用冷蔵庫

試薬保存用冷凍庫

検体保存用超低温槽

分離ウイルス株保存用超低温槽

陽性コントロール保存用超低温槽

安全キャビネット (SANYO, MHE-130AJ)

試薬調整用クリーンベンチ (SANYO, MCV-710ATS)

培地作成用蒸留水作成装置

製氷機

天秤

PH メーター

電動ピペッター

マイクロピペット 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000)

12連ピペット (HIGH TECH LAB, HT5122)

8連ピペット (HIGH TECH LAB, HT5126)

オートクレーブ (TOMY, BS-245)

高速冷却遠心機 (KUBOTA, 7800)

マイクロチューブミキサー (AS ONE, TM-282)

ボルテックスミキサー (Fine, MF-71)

微量高速遠心機 (Eppendorf, 5417C)

微量高速遠心機 (日立、himac CT15E)

細胞培養用 CO₂ インキュベーター (ESPEC, BNA-121D)

顕微鏡 (OLYMPUS, CK2)

リアルタイム機器 (Roche, Light Cycler 480 II)

プレート遠心機 (KUBOTA, KN-70)

卓上遠心機 (スピンドアウン用)

プレート振とう機 (TOMY, MP-040)

サーマルサイクラー (ABI, Veriti)

PCR チューブ用卓上遠心機 (スピンドアウン用)

電気泳動槽 (ADVANCE, Mupid 2 Plus)

UV 照射写真撮影装置

シークエンサー (ABI, 3130 Genetic Analyzer)

1) 臨床材料の処理及び RNA 抽出 SOP

1-1) 医療機関等に配布する検体採取容器の準備

・試薬:

輸送用培地 (Virus Transport Medium: VTM)

イーグル MEM (ニッスイ、05900) 同等品

ペニシリン G カリウム (和光純薬、MPB194536) 同等品

ストレプトマイシン硫酸塩 (和光純薬、MPB194541) 同等品
ファンギゾン溶液 (250 μg/ml) (GIBCO, 15290-018) 同等品
ゲンタマイシン溶液 (50mg/ml) (GIBCO, 15750-060) 同等品
アルブミン(Bovine fraction V) (Sigma, A9418) 同等品
L-グルタミン (Sigma, G3126-100G) 同等品
重炭酸ナトリウム (和光純薬、191-01305) 同等品

・機器及び器材：

電動ピペッター ○共用

15 ml 遠心管 (VIOLAMO, 725172-117) 同等品

綿棒 (日本綿棒、メンチップ 1P1503) 同等品

ガラス又はディスポーザブルピペット (BD, 356521, 357551, 357525) 同等品

1-2) 検体の前処理及び保存

・機器及び器材：

高速冷却遠心機 (KUBOTA, 7800) ○共用

オートクレーブ (TOMY, BS-245) ○共用

クライオチューブ (Nunc, 375418) 同等品

オートクレーブバッグ (AS ONE) 同等品

1-3) RNA 抽出

・試薬：

High Pure Viral RNA Kit (Roche, 11 858 882 001) 同等品

Ethanol 試薬特級 500 ml (和光純薬、057-00456) 同等品

・機器及び器材：

マイクロチューブミキサー (AS ONE, TM-282) ○共用

微量高速遠心機 (Eppendorf, 5417C) ○共用

マイクロピペット 10 μl, 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1000 μl (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000) ○共用

15 ml 遠心管 (BD, 352196) 同等品

1.5 ml サンプルチューブ (ワトソン、131-515-C) 同等品

滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S) 同等品

2) MDCK 細胞を用いた分離培養 SOP

2-1) 検体接種用 MDCK 細胞の準備

・試薬：

MDCK 細胞培養培地

D-MEM (ニッスイ、05919) 同等品

ウシ胎児血清 (FBS)

ペニシリン G カリウム (和光純薬、MPB194536) 同等品

ストレプトマイシン硫酸塩 (和光純薬、MPB194541) 同等品

ファンギゾン溶液 (250 μ g/ml) (GIBCO, 15290-018) 同等品
ゲンタマイシン溶液 (50mg/ml) (GIBCO, 15750-060) 同等品
L-グルタミン (Sigma, G3126-100G) 同等品
重炭酸ナトリウム (和光純薬、191-01305) 同等品

トリプシン-EDTA

Trypsin (GIBCO, 27250-018) 同等品
EDTA (関東化学、14097-00) 同等品
NaCl (片山化学、28-2270) 同等品
KCl (和光純薬、163-0345) 同等品
Na₂HPO₄ (関東化学、37243-00) 同等品
KH₂PO₄ (関東化学、32379-00) 同等品

・機器及び器材：

細胞培養用 CO₂ インキュベーター (ESPEC, BNA-121D) ○共用
顕微鏡 (OLYMPUS, CK2) ○共用
オートクレーブ (TOMY, BS-245) ○共用
電動ピペッター ○共用
15 ml 遠心管 (BD, 352196) 同等品
50 ml 遠心管 (BD, 352070) 同等品
ガラス又はディスプレイザブルピペット (BD, 356521, 357551, 357525) 同等品
ガラスフラスコ又はプラスチックフラスコ (Orange Scientific, 5510300) 同等品
オートクレーブバッグ (AS ONE) 同等品

2-2) ウイルス分離培養

・試薬：

ウイルス分離培地

D-MEM (ニッスイ、05919) 同等品
アルブミン(Bovine fraction V) (Sigma, A9418) 同等品
ビタミン溶液 x100 (MP Biomedical, 1601449) 同等品
ショ糖 (関東化学、37000-00) 同等品
ペニシリン G カリウム (和光純薬、MPB194536) 同等品
ストレプトマイシン硫酸塩 (和光純薬、MPB194541) 同等品
ファンギゾン溶液 (250 μ g/ml) (GIBCO, 15290-018) 同等品
ゲンタマイシン溶液 (50mg/ml) (GIBCO, 15750-060) 同等品
L-グルタミン (Sigma, G3126-100G) 同等品
重炭酸ナトリウム (和光純薬、191-01305) 同等品

トリプシン-EDTA

Trypsin (GIBCO, 27250-018) 同等品
EDTA (関東化学、14097-00) 同等品
NaCl (片山化学、28-2270) 同等品
KCl (和光純薬、163-0345) 同等品
Na₂HPO₄ (関東化学、37243-00) 同等品
KH₂PO₄ (関東化学、32379-00) 同等品

アセチルトリプシン (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich: Cat No.T-6763) 同等品

・機器及び器材：

細胞培養用 CO₂ インキュベーター (ESPEC, BNA-121D) ○共用

顕微鏡 (OLYMPUS, CK2) ○共用

オートクレーブ (TOMY, BS-245) ○共用

電動ピペッター○共用

マイクロピペット 100 µl, 1000 µl (ギルソン、MS-P100, MS-P1000) ○共用

15 ml 遠心管 (BD, 352196) 同等品

50 ml 遠心管 (BD, 352070) 同等品

ガラス又はディスプレイザブルピペット (BD, 356521, 357551, 357525) 同等品

24well plate (BD, 353047) 同等品

2.0 ml スクリューキャップチューブ (ワトソン、1392-150-Y) 同等品

オートクレーブバッグ (AS ONE) 同等品

滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、126-100S, 124-1000S) 同等品

4) 遺伝子検査 (リアルタイム RT-PCR 法) SOP

・試薬：

QuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN, 204443) 同等品

RNase Inhibitor 2000U (20Unit/µl) (ABI, N808-0119) 同等品

Primers & Probes

・機器及び器材：

リアルタイム機器 (Roche, Light Cycler 480 II) ○共用

プレート遠心機 (KUBOTA, KN-70) ○共用

卓上遠心機 (スピンドウン用) ○共用

ボルテックスミキサー (Fine, MF-71) ○共用

マイクロピペット 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000) ○共用

Light Cycler Multiwell Plate 96 (Roche, 04 729 692 001)

1.5 ml サンプルチューブ (ワトソン、131-515-C) 同等品

2.0 ml スクリューキャップチューブ (ワトソン、1392-150-Y) 同等品

滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S) 同等品

5) 型・亜型同定検査及び抗原性解析 SOP

5-1) HA、HI 試験

・試薬：

PBS

NaCl (片山化学、28-2270) 同等品

KCl (和光純薬、163-0345) 同等品

Na₂HPO₄ (関東化学、37243-00) 同等品

KH₂PO₄ (関東化学、32379-00) 同等品

アルセバー氏液

クエン酸 (片山化学 05-4930) 同等品

クエン酸三ナトリウム二水和物 (Sigma-Aldrich 25275) 同等品

NaCl (片山化学、28-2270) 同等品

ブドウ糖 (関東化学) 同等品

ニワトリ保存血 (自家製)

ガチョウ保存血 (自家製)

モルモット保存血 (日本バイオテスト研究所、016-0302) 同等品

HI 用抗血清 (国立感染症研究所配布)

HI 用対照抗原 (国立感染症研究所配布)

・機器及び器材：

微量高速遠心機 (日立、himac CT15E) ○共用

微量高速遠心機 (Eppendorf, 5417C) ○共用

プレート振とう機 (TOMY, MP-040) ○共用

オートクレーブ (TOMY, BS-245) ○共用

マイクロピペット 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000) ○共用

12 連ピペット (HIGH TECH LAB, HT5122) ○共用

8 連ピペット (HIGH TECH LAB, HT5126) ○共用

96 well plate (U 又は V) (Nunc, 268152, 249570) 同等品

滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S) 同等品

血球用チップ (Molecular BioProducts, 2069G)

50 ml 遠心管 (BD, 352070) 同等品

1.5 ml サンプルチューブ (ワトソン、131-515-C) 同等品

オートクレーブバッグ (AS ONE) 同等品

6) 遺伝子検査、型・亜型同定検査ー (コンベンショナル RT-PCR 法) SOP

・試薬：

One Step RT-PCR kit (QIAGEN, 210210) 同等品

RNase Inhibitor 2000U (20Unit/µl) (ABI, N808-0119) 同等品

Primers

電気泳動用 Agarose (Amresco, 0710-500G) 同等品

分子量マーカー(φ X174 Hinc II digest) (TaKaRa, 3406A)

TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer

Tris (Invitrogen, 15504-020) 同等品

酢酸 (和光純薬、0170-00256) 同等品

エチジウムブロマイド (Ethidium Bromide) (和光純薬、315-90051) 同等品

・機器及び器材：

サーマルサイクラー (ABI, Veriti) ○共用

卓上遠心機 (スピンドアウン用) ○共用

ボルテックスミキサー (Fine, MF-71) ○共用
PCR チューブ用卓上遠心機 (スピンドウン用) ○共用
電気泳動層 (ADVANCE, Mupid 2 Plus) ○共用
UV 照射写真撮影装置 ○共用
1.5 ml サンプルチューブ (ワトソン、131-515-C) 同等品
0.2 ml PCR チューブ (Thermo, AB-0337) 同等品
マイクロピペット 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000)
滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S) 同等品
UV 照射写真撮影装置用インク及び印画紙 (Canon, 0702B001[AG])

7) 薬剤耐性マーカー検査 SOP

・試薬:

QuantiTect Virus + ROX Vial kit (QIAGEN, 211033)
Primers & Probes

・機器及び器材:

リアルタイム機器 (Roche, Light Cycler 480 II) ○共用
プレート遠心機 (KUBOTA, KN-70) ○共用
卓上遠心機 (スピンドウン用) ○共用
ボルテックスミキサー (Fine, MF-71) ○共用
マイクロピペット 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000) ○共用
Light Cycler Multiwell Plate 96 (Roche, 04 729 692 001)
1.5 ml サンプルチューブ (ワトソン、131-515-C) 同等品
2.0 ml スクリューキャップチューブ (ワトソン、1392-150-Y) 同等品
滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S) 同等品

8) 遺伝子解析 SOP

・試薬:

Wizard SV Gel & PCR Clean-up System (Promega, A9282) 同等品
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, 4337454)
Ethanol 試薬特級 500 ml (和光純薬、057-00456) 同等品
泳動用 buffer (ABI, 402824)
POP-7 ポリマー (ABI, 4363785)

・機器及び器材:

サーマルサイクラー (ABI, Veriti) ○共用
シーケンサー (ABI, 3130 Genetic Analyzer) ○共用
微量高速遠心機 (Eppendorf, 5417C) ○共用
卓上遠心機 (スピンドウン用) ○共用

ボルテックスミキサー (Fine, MF-71) ○共用
PCR チューブ用卓上遠心機 (スピンドウン用) ○共用
マイクロピペット 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000) ○共用
1.5 ml サンプルチューブ (ワトソン、131-515-C) 同等品
0.2 ml PCR チューブ (Thermo, AB-0337) 同等品
シークエンス反応精製キット (日本ジェネティクス、FG-9411)
シークエンス用キャピラリーカラム (ABI, 4333464)
MicroAmp Optical 96-well Plate (ABI, N801-0560)
滅菌済みフィルターチップ (ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S) 同等品

付録2 「インフルエンザ H1pdm2009」 ウイルス学的検体採取について

2009年5月2日更新 (2013年4月1日最終更新)

2009年5月2日国立感染症研究所感染症情報センターのウェブページに、医療機関、保健所、地方衛生研究所向けに「新型インフルエンザ(swine-origin influenza A/H1N1)」ヒト感染例に対する検査診断(医療機関から地方衛生研究所への流れ) Ver.1 が掲載されました。

上記をふまえ愛知県の医療機関における検体採取の流れをお示しします。

1) 必要な物品

- ① ウイルス検査用滅菌綿棒(室温保存)
- ② 1~2mL に小分けしたウイルス輸送培地(Virus transfer medium : V T M**) (冷凍保存: -20°Cで1年保存可能)
- ③ 個人予防具 (PPE)

2) 検体採取の概要*

① PPE を装着した上で

- 1) ①の滅菌綿棒を用いて鼻腔ぬぐい液又は咽頭ぬぐい液を2本 (ウイルスサーベイランスの場合は1本) 採取

↓

- 1) ②のウイルス輸送培地に十分攪拌したのち、棒部分を折り曲げ、綿球部分が輸送培地に浸っている状態ですぐに冷蔵保存 (PCR予定の場合、室温保存や凍結はしない!)

鼻腔吸引液を用いる場合は、鼻腔を吸引した後に、

- 1) ②のウイルス輸送培地を吸引し、チューブ内の検体を吸引し、すぐに冷蔵保存 (PCR予定の場合、室温保存や凍結はしない!)

② 各検体に、ラベルを貼付 (検査依頼票と照合可となるようにする)。

③ 採取後すぐに冷蔵保管しておいた検体は、冷蔵で保健所経由で地方衛生研究所に搬送する。

可能であれば、急性期(発症後1週間以内)と回復期(発症後3~4週)の血清を、小分けして冷凍(-20°C以下)保管(短期間なら4°Cも可能)しておく。

※ウイルス輸送培地(V T M)**

市販の細胞培養培地(MEM 培地、199 培地など)またはPBSにBSA(ウシ血清アルブミンの略:最終濃度 0.5%)、ペニシリン(最終濃度 100-500U/mL)、ストレプトマイシン(同 100-500 μg/mL)、ゲンタマイシン(同 100 μg/mL)およびアンフォテリシンB(同 2 μg/mL)を添加した液体。医療機関に既にあったウイルス分離用の培地を代用することは可能ですが、細菌培養用の培地、生理食塩水、迅速診断キットに添付されている検体採取用の液は、絶対に用いないよう注意してください。

検体採取についてご不明の点は、最寄りの保健所におたずねください。

*定点医療機関をお願いするウイルスサーベイランス用検体は、1回あたり1本採取、また凍結保存の場合もありますので、ご不明の点は保健所に確認をお願いします。

※ 愛知県衛生研究所ウェブページ http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/67f/new_inf.html に掲載