

(添付資料2)

### インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法) 第 3 回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施結果について

この度は、本 EQA にご参加いただきましてありがとうございました。

来年度からは改正感染症法の施行に伴う省令改正により、検査の精度管理の定期的実施および精度管理に関する外部調査の定期的受検など、精度管理への取り組みが大きく変わることになります。リアルタイム RT-PCR 法を用いた A 型インフルエンザウイルスの型・亜型診断検査につきましては、これまで EQA を実施した際に配布した資料や、今回配布しますリアルタイム PCR トラブルシューティングのためのフローチャートなども参考にいただき、貴所における PCR 検査全般の内部精度管理に役立てていただければ幸いです。

国立感染症研究所が示した「高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版)および「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版)」に記載の Type A(M 遺伝子)、H5 および H7 検出用のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件については、弊所の環境にて一定の検出感度・特異性を担保しています(「インフルエンザ診断マニュアル(第 2, 3 版)」に記載の H1pdm および H3 検出系も同様です)。しかし、各地衛研で使用している検出装置のメンテナンス状況や試薬類の保管状況あるいは検査手技や検査手順などの検査環境はそれぞれ異なるため、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、検査に対する信頼性を高めるためには、内部精度管理だけでなく、外部精度管理による検査の精度評価も重要になります。

リアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型診断検査は、検出装置、プライマー・プローブ、試薬、陽性コントロール、検査手技や検査手順のうち、どれか一つにでも問題があると正確な検査が行えなくなる可能性が高くなります。今回の EQA では、RNA 抽出が不要な 1 検体と RNA 抽出が必要な 5 検体を配布し、お送りいただいた検査結果(RNA 抽出が不要な 1 検体を指標にした Ct 値および総合判定)を元にして、検体からの RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR 法を用いた A 型インフルエンザウイルスの型・亜型診断検査の精度を評価しました。精度の高い検査が行えたのか、行えなかったとすればどこに問題があるのか、本 EQA ではその原因を特定できた場合は報告し(特定できない場合は原因を推定)、トラブルシューティングの実施により検査精度の維持・向上を図っていただく事を目的としています。

別添の「2. 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて(PDF ファイル)」に、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、陽性コントロール、検査手技、検査手順に着目して問題があった場合のトラブルシューティングに

(添付資料2)

ついて解説しましたので、まずはご一読下さい。また、トラブルシューティングをどのような流れで行うとよいか、インフルエンザウイルス研究センターでの考え方や実際の実施方法を別添の「3. トラブルシューティング時のフローチャート(PDF ファイル)」に参考までにまとめました。

また、各所より送付いただきました検査結果および総合判定結果を解析し、「4. 解析結果 2015\_地衛研名(Excel ファイル)」にく総合判定結果へのコメント>、<パネル検体の結果へのコメント>および<トラブルシューティングについて>を記載しましたので、貴所における検査精度管理の参考にしていただければ幸いです。なお、今回配布したパネル検体は全て、RNA 抽出および各リアルタイム RT-PCR 検査系に問題がなければ必ず検出できる RNA 濃度となっています。今回、これらが 1 つでも検出できなかった場合は、コメントおよび添付資料を参考にトラブルシューティングを行っていただく事をお勧めします。

最後に、各所におけるインフルエンザ診断検査の実施体制の確認のため、ご回答いただいた結果報告時アンケートの結果を集計し、別添の「5. EQA2015 の結果およびアンケートの集計(PDF ファイル)」にまとめました。中には感染研マニュアル記載以外の試薬を使用して検査を実施している所もありますが、先述したように、感染研マニュアル記載の反応試薬、反応条件は高感度かつ特異的に検出できるように全検出系で最適化されています。感染研マニュアル記載以外の反応試薬、反応条件で検査を行った場合に検出感度や特異性が低下する事がありましたので、他の反応試薬を使用する際は、事前に検出感度や特異性について検証し、反応条件等を最適化して検査を実施していただく事をお勧めします。また、RNA 抽出キットについても同様に、他の RNA 抽出キットを使用される場合は、必ずそのキットの検証(抽出効率の評価)を行った上で検査を実施していただく事をお勧めします(キットによってはウイルス RNA が高濃度の場合には RNA 抽出効率に問題がなくても、ウイルス RNA が低濃度の場合に、RNA 抽出効率が極端に悪くなる場合があることを確認しています)。

本 EQA はこれまで厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)「地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究」の一環で実施してきましたが、本年度は研究期間の最終年にあたり、本研究班での EQA 実施は今回が最後となります。来年度以降の EQA 実施については未定です。もし EQA を実施したとしても、今回のように各所毎に詳細なコメントは行わない予定です。今後はこれまでに配布した資料を参考にしていただき、貴所の検査精度管理にお役立て頂きますと幸いです。

本 EQA に関してご不明な点やご意見などがございましたら、下記にお問い合わせ

(添付資料2)

わせ下さいますようお願いいたします。また、トラブルシューティングを行う際に必要な比較検討用プローブ、プライマーですが、少量であればインフルエンザウイルス研究センターで使用しているものと同じものを配布する事が可能です。ご希望の際は下記にお問い合わせ下さいますようお願いいたします。

2016年2月29日

国立感染症研究所  
インフルエンザウイルス研究センター第2室  
E-mail : eqa\_influenza@nih.go.jp  
電話 : 042-561-0771 (代表)  
(042-848-7166 直通)  
担当 : 影山/高山/中内

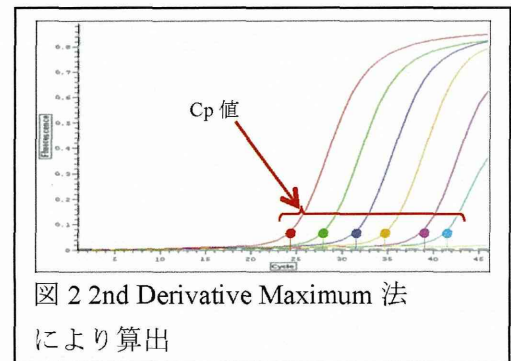
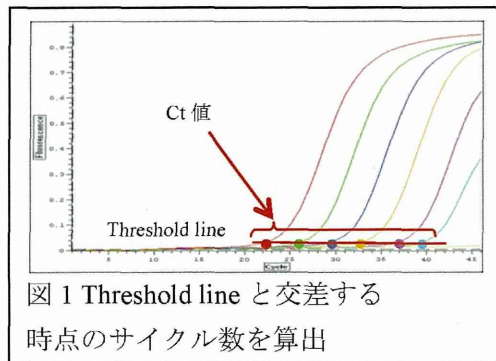
(添付資料 3)

## 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて

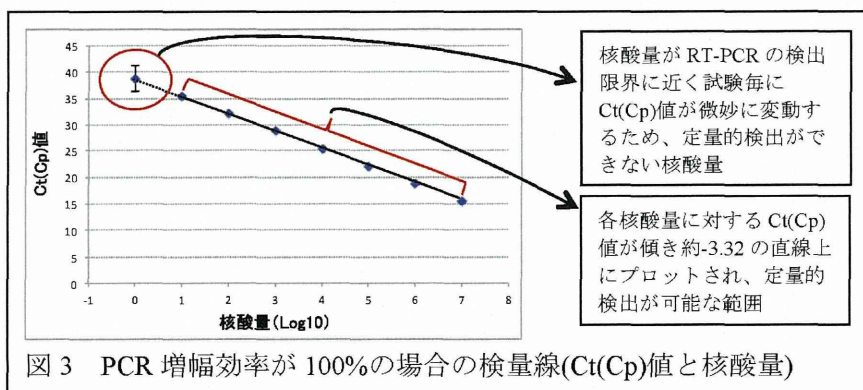
### 精度管理について

#### 1. 定量的 RT-PCR における Ct(Cp)値について

リアルタイム PCR 反応においてサンプルからの蛍光シグナルが閾値(Threshold Line)と交差する時点のサイクル数を一般的に Ct 値(Threshold Cycle)と呼びます。Threshold Line は PCR の指数関数的増幅期に設定したラインで、ベースラインの蛍光値に対して統計的に有意な増加が見られる場所に設定して、Ct 値を算出します(図 1)。また一部の機器においては他の解析方法を用いていることもあります。その 1 つに、サンプルからの蛍光シグナルの増幅曲線が急勾配の上昇に切り替わる点(増幅曲線の二次導関数の最大値、すなわち変曲点)のサイクル数を Cp(Crossing point)値等として算出(2nd Derivative Maximum 法)する解析方法があり、本方法の場合、Threshold Line は存在しません(図 2)。



リアルタイム RT-PCR 法において反応試薬、プライマー、プローブ、機器、手技に問題がない場合、増幅シグナルはシグモイドカーブを描き、核酸量(Log10)の間には相関性が見られ、PCR 増幅効率が 100%(1 サイクルで 2 倍に増幅)の場合は、理論上傾き約-3.32(10 倍増幅に理論上 3.32 サイクル必要： $2^{3.32} \approx 10$ )の直線上に Ct(Cp)値がプロットされます(図 3)。

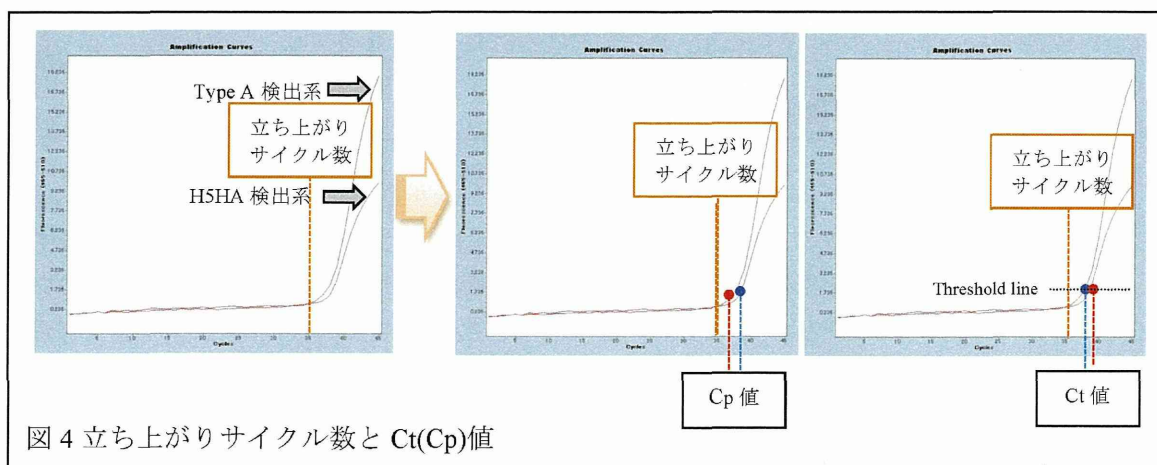


(添付資料 3)

2.インフルエンザウイルス遺伝子の検出系について

インフルエンザウイルス遺伝子検出系(TypeA(M 遺伝子)および H5, H7, H1pdm, H3 の各 HA 遺伝子)の PCR 増幅効率は 100%に近く、各標的となる遺伝子のコピー数が同じ場合、シグナルの立ち上がりサイクル数がほとんど同じになるよう設計しているため、検査が問題なく行われた場合、どの検出系もコピー数が同じであればシグナルの立ち上がりサイクル数はほぼ同じになるはずですが、しかし Ct(Cp)値は、それぞれの検出系間で若干乖離します。これはシグモイドカーブの形(曲線の変曲点)が各検出系によりそれぞれ異なるため、シグナルの立ち上がりサイクル数が同じであっても、計算により算出された Ct(Cp)値は異なるためです。図 4 は同濃度の核酸量に対する Type A と H5 検出系の波形です。Type A と H5 の立ち上がりサイクル数はほぼ同じですが、Ct(Cp)値は少し乖離しています。

従って、結果解析を行う際は Ct(Cp)値の確認だけでなく、シグナルの立ち上がりサイクル数とシグモイドカーブの形を確認する事も重要となります。



3.検出系に何らかの問題がある場合

H5 および H7 陽性コントロール(識別マーカー入り)に含まれる Type A (M 遺伝子)および各 HA 遺伝子のコピー数は、同濃度になるように調製して各所に配布しています。検査が問題なく行われた場合、陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Type A 検出系と HA(H5 もしくは H7)検出系の立ち上がりのサイクル数はほぼ同じサイクル数となるはずですが、なお、Roche LightCycler480 システムの場合では、第 2 項に記載した理由により、Cp 値は正常な場合でも Type A と HA 検出系で 0.5~1.5 程度乖離します(どちらも概ね Type A の方が Cp 値は大きくなります)。

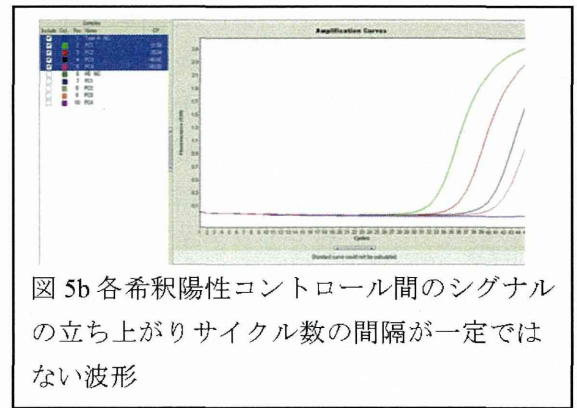
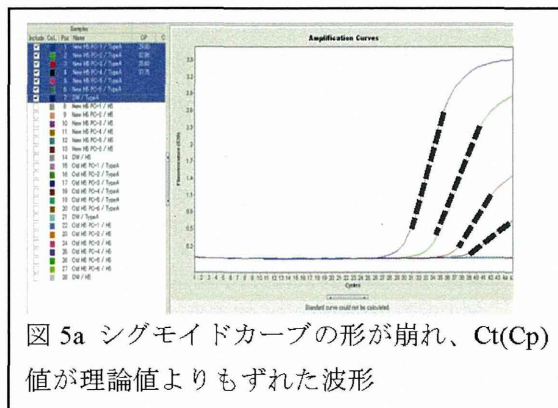
ただし、10 倍階段希釈を行った陽性コントロールに対する Ct(Cp)値の間隔は、検出系間で差はほとんど無く、検出系ごとで等間隔となり、効率よく PCR 増幅反応が進んだ場合は、概ね 3.2~3.5 の範囲内(100%の効率の場合は 3.32)となります(図 3 参照)。

プライマー・プローブが劣化している、あるいは試薬調製または陽性コントロールの希釈系列が正確でない、など何らかの問題がある場合は、シグモイドカーブの形が大きく崩れて対数

(添付資料 3)

増幅期の傾きがそれぞれ異なる(図 5a)、各陽性コントロール希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔(Ct(Cp)値も同様)が一定ではなくなる(図 5b)(図3で概説したように検出限界付近濃度の場合には当てはまりません)、などの現象が見られるようになります。

他にも、試薬調製時の混合が不十分で反応試薬が均一ではない、陽性コントロールや反応試薬を反応槽に添加する際の分取・注入量が不正確だったなど、検査手技に不備がある場合もこれらの現象が見られる場合があります。



従って、同一希釈濃度の陽性コントロールに対して、Type A と H5 もしくは H7 検出系の間で、シグナルの立ち上がりサイクル数を比較した際に、これらが大きく乖離する場合は、乖離した方の検出系に何らかの問題(手技に不備がなければ、プライマーあるいはプローブに問題がある可能性が高い)が生じている可能性を考えます。また、シグモイドカーブの形が以前の結果と異なる場合も、同様に何らかの問題がその検査で起きている可能性があります。

#### 4. 精度管理について

リアルタイム RT-PCR 法を用いた検出系において、常に高い検査精度を維持するためには、例えば階段希釈した陽性コントロールに対する Ct(Cp)値やシグモイドカーブを確認し、毎回同じ精度で検査が行えているかどうか以前の結果と比較して確認するなどの精度管理を継続的に行う事が重要となります。検出系に何らかの問題が生じている場合、こうした精度管理により原因を明らかにできる場合がありますので、直ちにトラブルシューティングを行う事で、検査精度を維持する事が可能となります。

#### 問題があった場合の予想される原因とトラブルシューティングの方法

A. 波形が全体的に汚い。再現性が低い(検査毎に、また作業者により異なる結果が出る、波形が乱れ Ct(Cp)値がばらつく場合)

##### 原因 1 : 機器、解析方法問題がある

##### トラブルシューティングの方法

リアルタイム RT-PCR に使用する機器は定期的なメンテナンスやキャリブレーションが必要

(添付資料 3)

です。まずは機器のメンテナンス状況を確認し、必要であれば機器のメンテナンスやキャリブレーションの実施を検討して下さい。また解析方法に問題が無いか、特にベースラインが低すぎないか確認し、必要であれば解析方法を検査毎に統一し検査を行うことをお勧めします。

#### 原因 2：試薬調整方法（検査手技や微量ピペッターなどの不備）に問題がある

リアルタイム RT-PCR 法では、微量ピペッターやマイクロチューブを用いて、

- 1)反応試薬の調製(各試薬の分取・分注および混合)
- 2)陽性コントロール希釈液の作製(分取・分注および混合)
- 3)反応試薬、サンプル、陽性(陰性)コントロールの反応槽への分取・分注

の作業を行います。これらの作業を行う際に、微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いが適切でないと、最終的には、反応試薬組成、サンプルもしくは陽性(陰性)コントロールの濃度が反応槽毎に異なる事となり、また、検査毎にもこれらの濃度がばらつく事となるため、再現性のない正確性に欠けた検査になる可能性が高くなります。

微量ピペッターは、一般的により少ない量を分取・分注する方が分取・分注量の誤差が大きくなります。例えば、検査時に毎回、高濃度のプライマーやプローブを極少量だけ分取し、希釈して反応試薬を調製する場合や、共通の反応試薬をまとめて作製せずに、極少量の酵素を各反応槽に分注する場合などでは、分取・分注量に大きな誤差が生じやすくなり、全く同じサンプルであっても、検査毎に Ct(Cp)値が大きく変動するなど、再現性が取れずに正確さに欠けた検査になる可能性があります。また、プライマー/プローブミックスをあらかじめ作製していない場合には、同様に極少量のプライマーやプローブを分取することになることから、最終的に反応試薬に対するプライマー、プローブ濃度が検査毎に微妙にばらつく事となり、同じサンプルであっても検査結果が異なってしまう場合があります。

施設によっては複数のリアルタイム PCR 機器を使用し、同じサンプルであったとしても各機器で異なる Ct(Cp)値が得られる場合があります。しかし同一機器では同じ Threshold Line を設定し解析すれば、同じサンプルであれば毎回ほぼ同じ Ct(Cp)値が得られます。また異なる機器間でも、同じサンプルであれば大きく異なる結果になることはありません。

#### **トラブルシューティングの方法**

- プライマー/プローブミックスはあらかじめ作製して小分け分注にて冷凍保管(必ず自動霜取り機能のないフリーザーを使用して下さい。できれば-70度以下での保存を推奨します)し、検査時は小分け分注した分を使い切りで使用する。
- 試薬調製時は、たとえ少ないサンプル数でも、反応槽毎に調製するのではなく、共通の反応試薬をまとめて作製する事で、特に酵素などの必要量が微量な試薬の分取・分注時の誤差による検査結果のばらつきを少なくすることができます。
- リアルタイム RT-PCR などの遺伝子検査で、常に精度の高い検査を行うための、最低限留意すべき点を以下に記します。

(添付資料3)

- ✓ 各作業者が正確な量を分取・分注できるように微量ピペッターの操作や特性について習熟する
- ✓ マイクロチューブは容量がとても小さく、内容物が混ざりにくいという特徴を理解するなど、マイクロチューブの取り扱いに習熟する
- ✓ 分取・分注量が正確ではない微量ピペッターを使用した際も、同様に正確性に欠けた検査になるので、微量ピペッターの精度を保つため定期的に点検する
- ✓ 各人が検査精度の維持・向上に努めようという意識を持つ
- ✓ 作業手順が統一されておらず、同じ作業であっても各人で手順が異なり使用する微量ピペッターが異なる場合などは、標準業務(作業)手順書の作成、作業毎に専用の微量ピペッター、マイクロチップ、マイクロチューブ等を用意するなどして、作業手順および機材等の統一・共用化を図る

常に正確な検査が行えているか、検査毎の検査精度を確認する手段の一つに、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や検出限界が毎回の検査で変化がないかどうかを確認するという方法があります。検査手技や微量ピペッターなどの不備によっても、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や検出限界は変化します。原因が複数考えられると、検査精度管理が難しくなります。まずは検査手技の習熟と検査精度に関する意識向上に努める事が重要となります。

B. 全ての検出系が遅れる。(全体的に感度が悪い)

原因：反応試薬、RNA抽出試薬等に問題がある

Ct(Cp)値が過去の結果よりかなり大きい、全ての陽性コントロールの結果が $10^3$ 希釈液まで陽性とならない、などの場合は反応試薬の劣化が疑われます。また、全ての陽性コントロールの結果では $10^3$ 希釈液まで陽性となるにも関わらず、RNA抽出した検体のCt(Cp)値が大きい又は検出できない傾向がある、などの場合はRNA抽出試薬等に問題があると考えられます。その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 凍結保存が必要な試薬類の凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(特に冷凍保存が必要な試薬類は、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、 $-20$ 度よりも高い温度で保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) 品質保証期限を過ぎた試薬を使用している

トラブルシューティングの方法

まずは試薬類が品質保証期限内であることを確認して下さい。保証期限内であっても劣化や問題があると疑われる場合は、新しい試薬を購入して古い試薬と比較検討し、原因究明を行うことをお勧めします。

- 反応試薬に問題があると考えられる場合、1種類の検出系に対して、新しく購入した試薬の分注品と使用中の分注品の両方を並べて比較検討を行い、それで改善された場合は反応試薬の劣化を疑い、古い試薬の分注品を破棄し新たな反応試薬を使用します。



(添付資料3)

- 反応試薬を新しくしても改善が見られない場合、プライマー、プローブの劣化による検出系の問題や、陽性コントロールの劣化が疑われるので、C 項、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。
- RNA 抽出試薬に問題があると考えられる場合、1 種類の検出系に対して、新旧の試薬で抽出をしたサンプルを並べて比較検討を行い、それで改善された場合は RNA 抽出試薬の劣化を疑い、古い RNA 抽出試薬を破棄し新たな RNA 抽出試薬を使用します。

新たに保管する反応試薬類が劣化しないように対策を講じて下さい(例：凍結融解の繰り返しを避けるため試薬類を小分け分注する、自動霜取り機能がなくできるだけ開閉の回数が少ない冷凍庫で保管する、など)。反応試薬や RNA 抽出試薬に問題が生じた場合、鑄型となるウイルス遺伝子量の少ない検体などでは全く検出出来なくなる場合もあるので、全体的に Ct(Cp)値が過去の結果よりかなり大きくなった時には、直ちにトラブルシューティングを行うことをお勧めします。

C. 特定の陽性コントロールの結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない、もしくは、Ct 値が過去の結果よりかなり大きい。

原因：特定の陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある

このようなケースでは、 $10^3$  希釈液まで陽性とならない陽性コントロールの劣化が疑われ、その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 陽性コントロールのワーキングストック凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(陽性コントロールは RNA のため、マスターストック、ワーキングストック共に  $-70$  度以下で保存することをお勧めします。また濃い濃度で保存し、あらかじめ作製した希釈系列を保存することはお勧めしません。  $-20$  度で長期保管した場合や、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) 陽性コントロールのワーキングストックを作製する際の希釈作製が不正確

また、特定の陽性コントロールの特定の検出系の結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない場合は、その検出系のプライマー、プローブの劣化も疑われるため、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。

**トラブルシューティングの方法**

- 劣化が疑われる陽性コントロールをマスターストックから希釈し直します。新旧両方の陽性コントロールを並べて比較検討を行い、それで改善された場合はワーキングストックの劣化を疑い、古いものは破棄し、新たに作製したワーキングストックへ更新します。
- ワーキングストックを更新しても改善が見られない場合は、マスターストックの劣化が疑われるので、陽性コントロールの更新を検討して下さい。H5 および H7 陽性コントロールの再分与については、感染研までご連絡下さい。

なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、使用期限が有効かつ適正な条件で保管管理された

(添付資料3)

ものを使用して下さい。また、新たに保管する陽性コントロールのワーキングストック、マスターストックが劣化しないように、対策を講じて下さい(例：-70度以下で保管する、凍結融解を繰り返さないように小分け分注を行い使い切りにする、など)。

D. 特定の検出系が全体的に乖離する。(遅れる)

原因 1：特定の検出系のプライマー、プローブに問題がある

このようなケースではシグナルの立ち上がりサイクル数が遅れた検出系(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)に何らかの問題がある場合がほとんどであり、その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) プライマー、プローブのワーキングストックの凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(4度で長期保管した場合や、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、-20度よりも高い温度で保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) プライマー・プローブミックスのワーキングストックを作製する際の希釈作製が不正確

**トラブルシューティングの方法**

マスターストックのプライマー、プローブもしくは新たに合成したプライマー、プローブを用いて新旧のプライマー、プローブの性能を比較するなどして原因究明を行い、問題が認められた場合はそのプライマー/プローブを変更します。基本方針として TypeA 検出系を基準検出系として各亜型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA 検出系に問題がある場合は、最初に TypeA 検出系のトラブルシューティングを行って下さい。問題のない TypeA 検出系を基準に各亜型の検出系のトラブルシューティングを実施して下さい。

- まずはプライマーのみ新しいものを用意し、新旧のプライマーを使用した検出系を並べて比較検討を行い、それで改善された場合はプライマーの劣化を疑い新たなプライマーへ変更します。
- プライマーを変更しても少しの改善しか見られなかったあるいは全く改善されなかった場合は、今度はプローブのみ新しいものを用意し、新旧のプローブを使用した検出系を並べて比較検討を行います。それで改善された場合はプローブの劣化を疑い新たなプローブに変更します。
- プライマー、プローブの両方の劣化が疑われる場合は、両方とも新しいものに変更して比較検討を行い、それで改善された場合は両方を変更します。

なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、使用期限が有効かつ適正な条件で保管管理されたものを使用して下さい。また、新たに保管するプライマー、プローブが劣化しないように、対策を講じて下さい(例：-70度以下で保管する、凍結融解を繰り返さないように小分け分注を行い使い切りにする、自動霜取り機能がなくできるだけ開閉の回数が少ない冷凍庫で保管する、など)。劣化が進むと鋳型となるウイルス遺伝子量の少ない検体などでは全く検出出来なくなる場合もあるので、Ct(Ct)値に乖離が見られるようになった時には直ちにトラブルシューティングを

(添付資料3)

行うことをお勧めします。

#### 原因 2：ウイルスが変異した

まれにウイルスが変異し、TypeA 検出系と HA 検出系の Ct(Cp)値が乖離する場合があります。これは乖離した検出系のターゲット核酸に変異が入っているためであると考えられます。ウイルスの変異が疑われる場合には、検出系の更新を検討する必要がありますので、感染研にご一報いただくと幸いです。

E. 特定の検出系で、 $10^1 \sim 10^3$  希釈陽性コントロールの結果が等間隔に立ち上がっていない。

原因：試薬類の調整方法、陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある。

A 項を参照し陽性コントロールの希釈方法や試薬調製方法に問題が無いか、C 項を参照し陽性コントロールに問題がないか、D 項を参照し検出系のプライマー、プローブに問題がないか、等を確認し適切なトラブルシューティングを行って下さい。

F. TypeA 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られる

原因 1：陽性コントロールがコンタミしている

このようなケースでは検査の操作の何れかの段階で陽性コントロールが反応試薬もしくは検体にコンタミしてしまった可能性が考えられます。たとえば検体処理用安全キャビネット内で陽性コントロール作製を行い、検体添加用安全キャビネット内で陽性コントロールの添加を行うなど、陽性コントロールを扱う操作を、検体を扱うエリアと同じエリアで行うと、陽性コントロールの検体へのコンタミネーションの危険性は増大します。

#### トラブルシューティングの方法

- 各エリアを次亜塩素酸で拭きあげて下さい。またその時に汚染が拡大しないよう留意し、エリア毎に使い捨て紙タオルを用いるなど個別に清掃して下さい。
- 汚染したと考えられる微量ピペッターを交換もしくは清掃（製品に添付の取扱説明書をご参照のうえ、可能な範囲内で内部の部品を含め次亜塩素酸で清掃後、蒸留水で十分すすぎ、清浄な環境下で乾燥させる）して下さい。オートクレーブは使用しないで下さい（オートクレーブを使用しても核酸を取り除く事はできません。核酸が蒸気とともに拡散し、他のものも汚染する可能性があります）。
- 上記の対策を講じてもコンタミネーションが続く場合、RNA 抽出試薬を新しいものにする、反応試薬を新しいものにする、プライマー、プローブをマスターストックから作り直す、の順で試薬類を新しいものにかえ、古い試薬類は廃棄して下さい。
- 全ての作業をキャビネット内で行う必要性は無いため、エリアが限られる場合は陽性コントロールの調製・添加は、実験台の上で行うなどし、また、エリアを分けられない場合は、次回以降の検査へ影響しないよう、1 回ごとの検査後にクリーンアップするなどして下さい。一人で検査を行う場合は、反応試薬調製後、プレートへ分注した後、検体から RNA 精製を行

(添付資料3)

い、反応液への検体添加を行い、最後に陽性コントロール調製および添加を行った方が、陽性コントロールによるコンタミネーションの危険性は低減します。一度コンタミネーションが起きてしまうと、エリアの清浄化や微量ピペッターの交換や清掃、試薬類の総入れかえなど、多大な労力と経済的な負担がかかるため、日頃から十分注意して検査を行って下さい。

原因2：検体によるクロスコンタミネーションが起きている。

原因1の陽性コントロールのコンタミネーション以外にも、RNA抽出時あるいは抽出したRNAを反応試薬に添加する際に、検体間でクロスコンタミネーションが起きてしまった可能性も考えられます。

他の検体では複数のHA検出系でシグナルの立ち上がりが見られない場合などは、検体間のクロスコンタミネーションの可能性が低いと考えられます。その場合は、対象検体のみを再度RNA抽出から行い、再検査(他の検体と同時に検査しない)を行って、同じ結果が得られるかどうか確認する事をお勧めします。

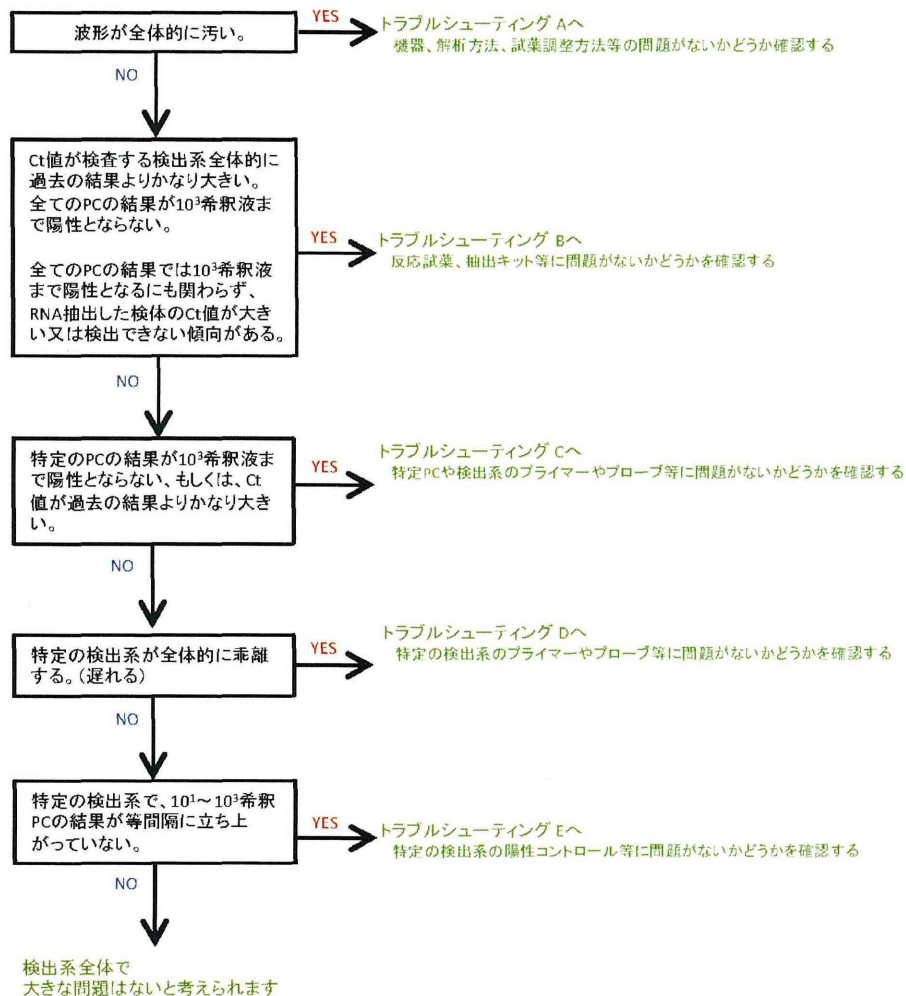
原因3：重複感染例の患者からの検体である

複数の型・亜型のインフルエンザウイルスが同時に感染している重複感染例の患者からの検体である場合、TypeA検出系と複数のHA検出系でシグナルの立ち上がりが見られることがあります。先述したコンタミネーションによる誤った結果ではないことを見極めた上で、重複感染の可能性について考慮するようにして下さい。

(添付資料4)

\* 問題点は、何度も同じように発生していますか？まずは、過去の検査結果等を見直し、問題点が再見されていることをご確認ください。再見されている場合は、本フローチャートにしたがって、適切なトラブルシューティングを行ってください。

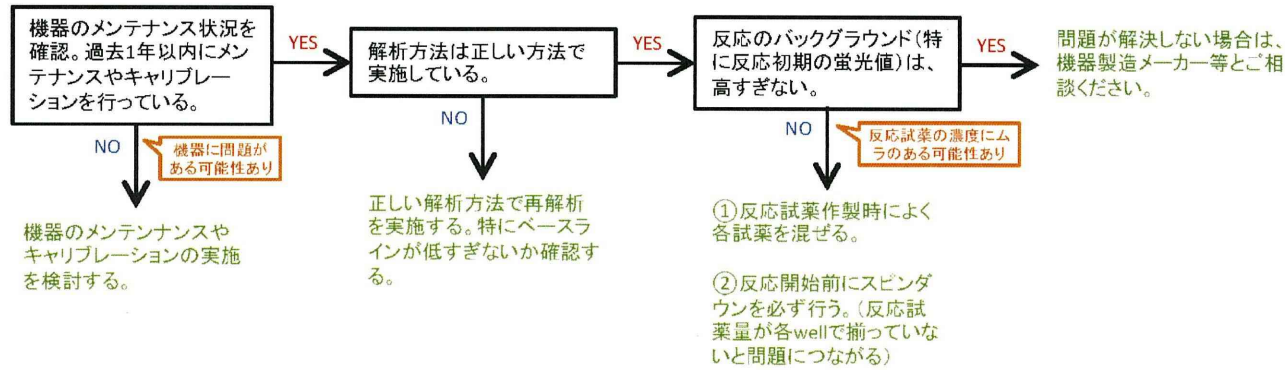
\* 問題が再見されない場合(再現性が低い場合や検査毎・作業者毎に異なる結果が出る場合)は、試薬調製方法やコンタミネーションが発生している可能性も考えられます。別添の「2.精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」を参照のうえ、適切なトラブルシューティングを行ってください。



\*本フローチャートでは、陽性コントロールを「PC」と記載します。

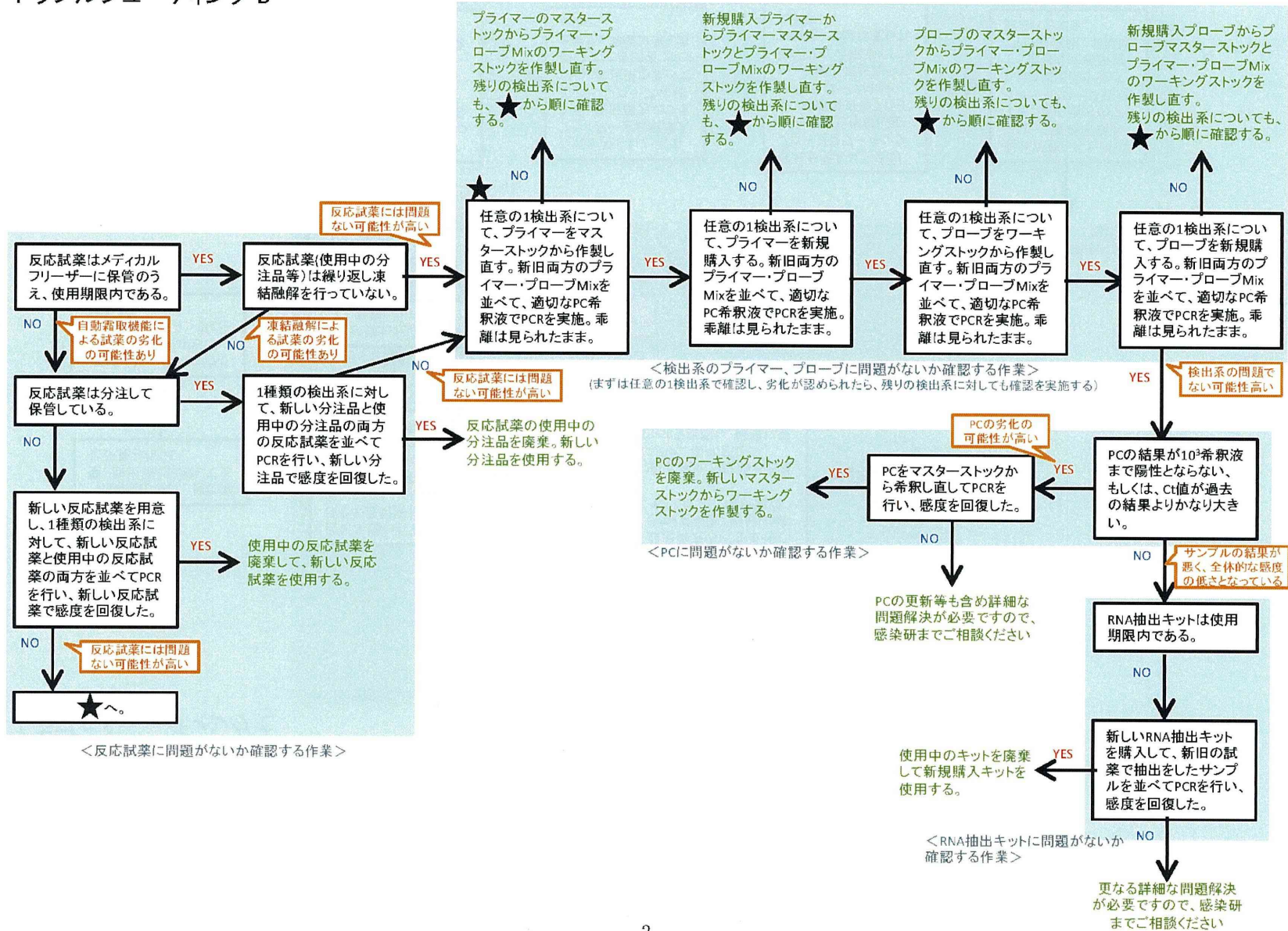
(添付資料4)

## トラブルシューティング A

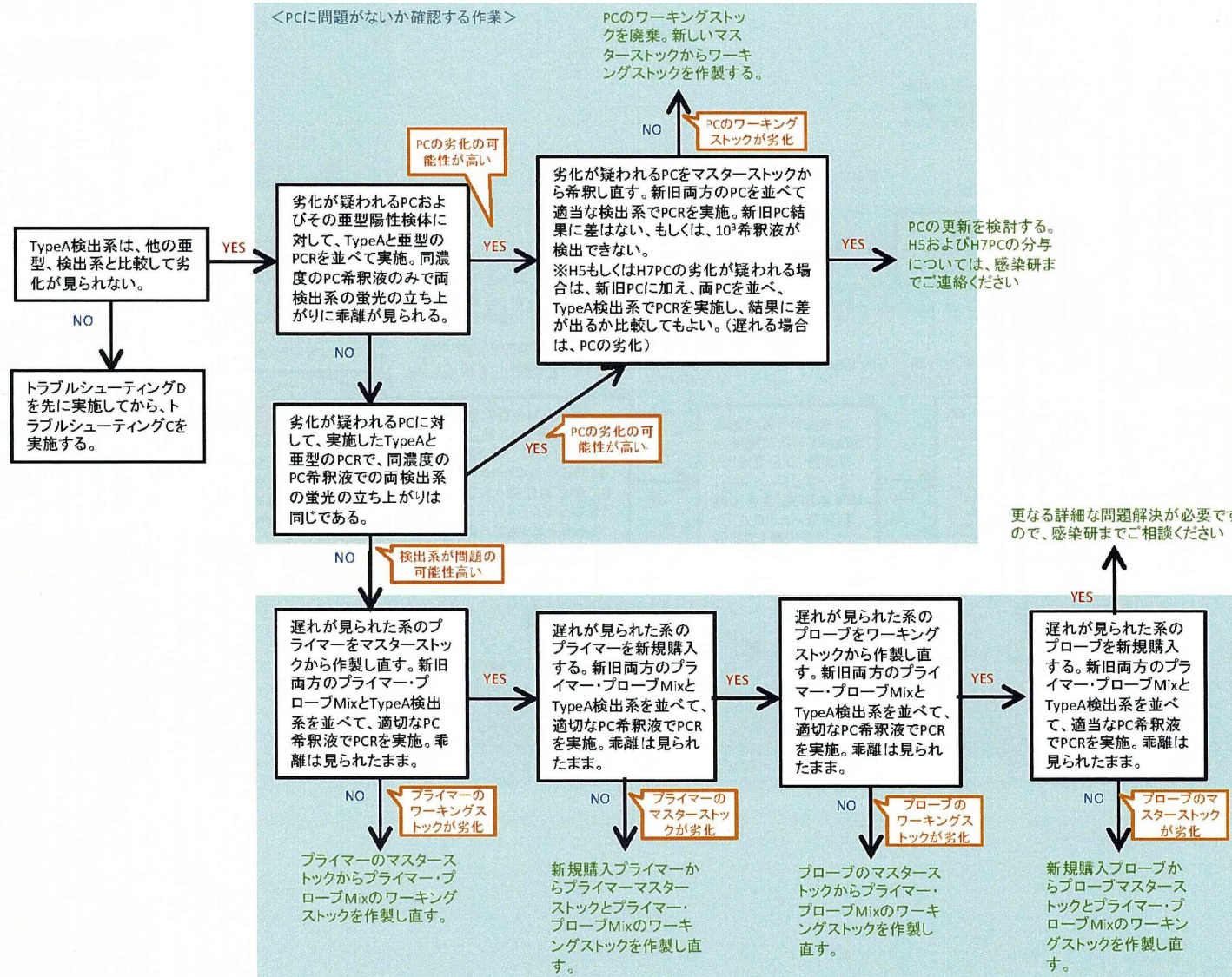


(添付資料4)

### トラブルシューティング B



(添付資料4)  
トラブルシューティング C

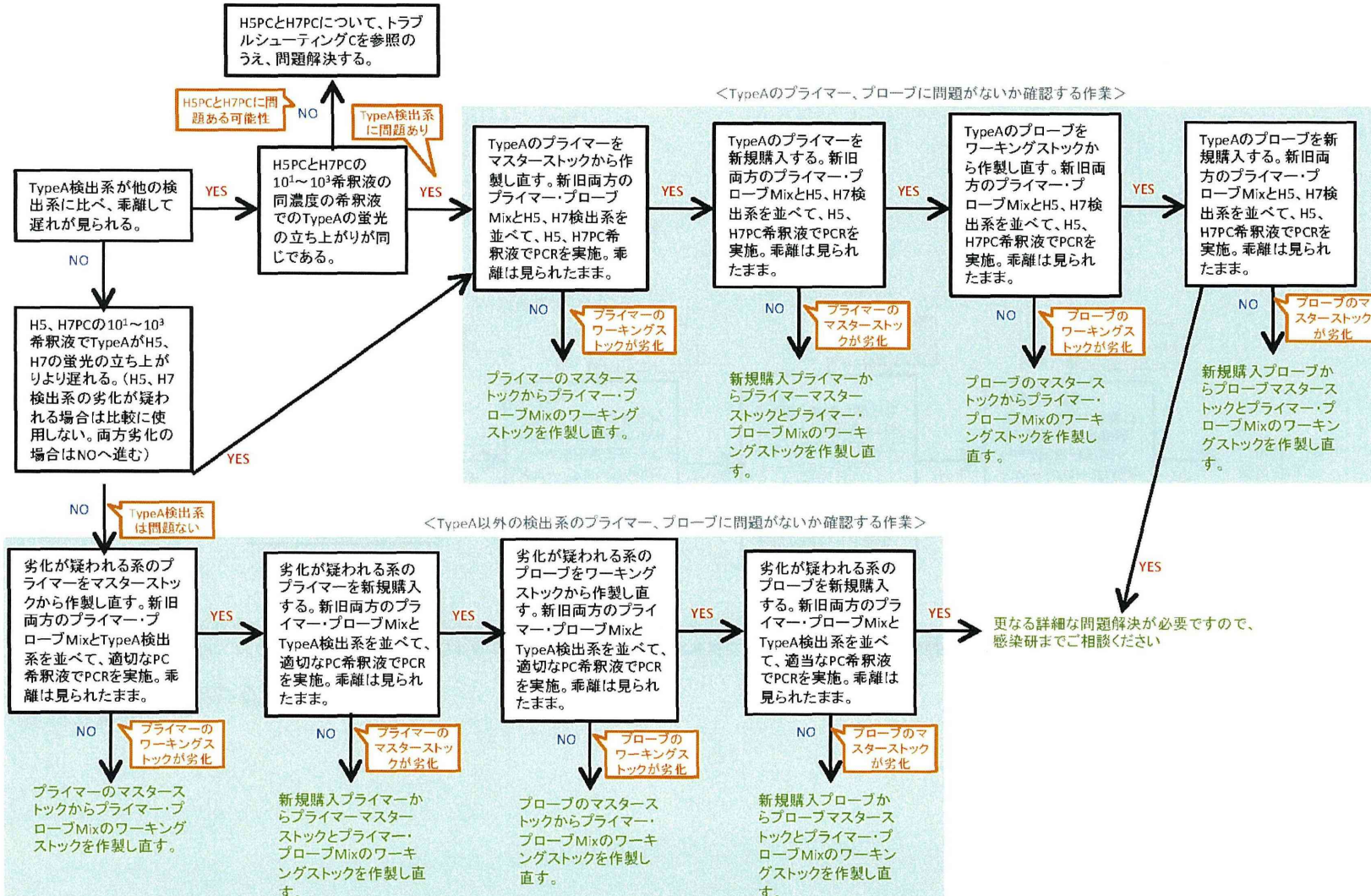


<検出系のプライマー、プローブに問題がないか確認する作業>



(添付資料4)  
**トラブルシューティング D**

\* TypeAを基準検出系として各亜型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA検出系に問題がある場合は、最初にTypeA検出系のトラブルシューティングを行ってください。  
 TypeA以外の系に問題が見られる場合は、問題のないTypeA検出系を基準にトラブルシューティングを実施してください。

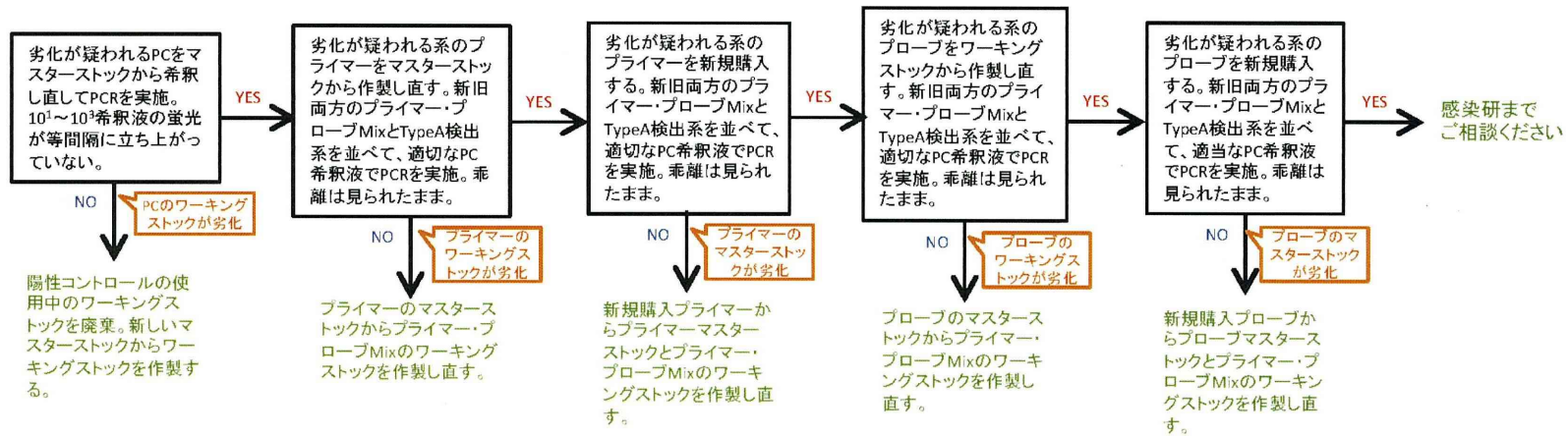


75

(添付資料4)

## トラブルシューティング E

\*トラブルシューティング前に、PCの希釈の手順がきちんと行われていることを確認する。各希釈液は、15秒ボルテックス+10回転倒混和を行い、よく攪拌する。また、希釈液作製時は10倍濃い溶液を50 $\mu$ L以上持ち込んで希釈(50 $\mu$ L+450 $\mu$ Lなど)を行うと、より誤差の少ない分取・分注を行うことができる。



(添付資料5)

## EQA2015の結果およびアンケートの集計

今回のEQAの結果を下記にまとめました。また、EQAに参加された73地衛研からの結果記入ファイルに記載いただいたアンケート内容を集計し、下記にまとめました。なお、一部の項目についてはコメントを記載しましたので、今後の検査実施体制の整備や検査精度の向上のための参考資料としてご活用いただければ幸いです。

### 1. 今回のEQAの結果まとめ (地衛研数で集計)

今回のEQAでは、RNA抽出が必要な検体A(H1pdm)、B(H7)とRNA抽出が不要な検体F(H5)およびF(陰性検体)については、全ての地衛研で正確に診断が行われていました。一方、RNA抽出が必要な検体C(H3)およびD(H5)については、一部の地衛研で正確に診断できていませんでした。特に検体中のRNA濃度が低い検体C(H3)については、効率の良いRNA抽出が行えずに検出できなかった、あるいはH3検出系の検出感度が低下して検出できなかった、などが考えられます。

なお、亜型同定方法に関しては、リアルタイムRT-PCR法のみで全亜型を決定した地衛研が最も多く、いくつかの地衛研ではコンベンショナルRT-PCR法を併用(使用)して亜型同定を行っていました。

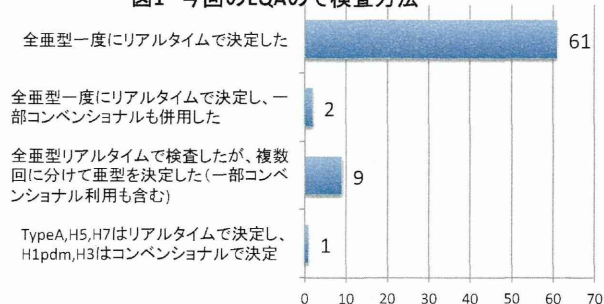
表1 今回のEQAの正答率

パネル検体	亜型	濃度* (copies/ $\mu$ L)	RNA抽出	正答数**
A	H1N1pdm09	80	必要	73/73 (100%)
B	H7N7	80		73/73 (100%)
C	H3N2	8		69/73 (95%)
D	H5N2	200		72/73 (99%)
E	Negative			73/73 (100%)
F	H5N1	80	不要	73/73 (100%)

\*各検体の濃度は、500 $\mu$ Lの水で溶解後のおよその濃度です。

\*\*正答数については、各パネル検体に対して、各所で記入された「総合判定結果」シートの結果を集計した

図1 今回のEQAでの検査方法



### 2. 各検出系の反応組成、反応条件について

#### 2-1. TypeA(M 遺伝子)検出系について

表2 TypeA検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
感染研マニュアル(インフルエンザ診断マニュアル(第3版)等)	71
感染研マニュアルから一部変更	2

(添付資料5)

2-2. H1pdm 検出系について

表3 H1pdm検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	70
感染研マニュアルから一部変更	2
実施せず	1

2-3. H3 検出系について

表4 H3検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	69
感染研マニュアルから一部変更	3
実施せず	1

2-4. H5 検出系について

表5 H5検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	71
感染研マニュアルから一部変更	2

2-5. H7 検出系について

表6 H7検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出マニュアル	71
感染研マニュアルから一部変更	2

2-6. その他の記載内容について

表7 その他検出系 記載マニュアル

検出系	記載マニュアル	地衛研数
H1N1連型	インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	10
N1	高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	2
TypeB	インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	1

<コメント>

いくつかの地衛研で感染研マニュアル記載以外の試薬を使用して検査を実施している所がありました。感染研マニュアル記載の反応試薬、反応条件は高感度かつ特異的に検出できるように全検出系で最適化されています。感染研マニュアルに記載以外の反応試薬、反応条件で検査を行うと検出感度や特異性が低下する場合がありますので、反応試薬や反応条件を変更する際は、事前に検出感度や特異性について検証を行い、反応条件等を最適化した上で検査を実施するようにして下さい。