

(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 2 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)実施について

平成 25 年度に引き続き、本年度も「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)」について全国の地方衛生研究所を対象に外部精度管理(EQA)を実施いたします。昨年度は、配布済みの陽性コントロールを用いて、定量的な H5 および H7 亜型診断検査を行っていただき、高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)および鳥インフルエンザ(A/H7N9)診断検査の実施体制の確認と各診断検査の精度向上を目的とした EQA を実施いたしました。本年度は感染研より配布するパネル(RNA 抽出が不要な 6 検体)に対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査が EQA の評価対象となります。

また、本年度はパネル配布を伴うことから、参加確認を兼ねた事前アンケートを送付します。本 EQA に参加する場合は、事前アンケートに必要事項をご記入の上、電子メールにてご送付いただきますようお願いいたします(事前アンケートの回答締切は平成 26 年 7 月 11 日です)。

本 EQA は平成 26 年度 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」(主任研究者 小田切孝人)により行います。

(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 2 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)実施要項

1. EQA2014 の目的と解析対象について

感染研より配布するパネルに対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査が今回の外部精度管理の評価対象となります。

2. EQA2014 実施スケジュール

- ・事前アンケートの送付:平成 26 年 7 月 1 日
(本メール)
- ・事前アンケートの回答締切:平成 26 年 7 月 11 日
(eqa_influenza@nih.go.jp へご返答下さい)
- ・パネル検体発送予定:平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 7 月 30 日
(普通郵便にて発送します)
- ・パネル検体発送完了の連絡(受領書、結果記入ファイル、結果報告時アンケートの送付):発送完了時
(参加地衛研へ個別にメールします。パネル到着後に同封の受領書に必要事項をご記入の上、メール添付もしくは FAX にてご返送下さい)
- ・測定期間:パネル検体到着日～平成 26 年 9 月 12 日
- ・結果報告およびアンケート送付の締切:平成 26 年 9 月 12 日
(eqa_influenza@nih.go.jp へご送付下さい)
- ・集計報告:平成 26 年 11 月頃より順次
(参加地衛研へ個別にメールします)

3. EQA2014 への参加について

今回行う EQA2014 に参加される場合は、平成 26 年 7 月 1 日に送付する事前アンケート(入力時間は 10 分程度)に回答の上、ファイル名を「事前アンケート_地衛研名」に変更して平成 26 年 7 月 11 日までに電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2014 参加」とご記入下さい。(不参加の場合は事前アンケートへの回答および送付の必要はありません。)

件名:(地衛研名)EQA2014 参加

宛先:eqa_influenza@nih.go.jp

4. EQA2014 の内容

4-1. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

感染研より配布した RNA 抽出が不要な 6 検体(平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 7 月 30 日に発送予定)

*核酸抽出済みの乾燥品を配布しますので、200 μ L の滅菌蒸留水に溶解して使用して下さい

(添付資料 2)

い。

4-2. 外部精度管理の評価について

今回は、H5およびH7亜型の鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で、各地衛研の方法に従って、リアルタイムRT-PCR法によるA型インフルエンザウイルスの亜型診断検査を行って下さい。

外部精度管理の評価は、リアルタイムRT-PCR法による結果(Ct, Cp値)をもとに検出感度・特異性についての解析を基に行います。各所でリアルタイムRT-PCR法以外の方法(コンベンショナルRT-PCR法、LAMP法、シーケンス法など)で行ったA型インフルエンザウイルスの亜型診断検査とB型インフルエンザウイルスの診断検査の結果についての詳細解析は行えませんが、正しい診断結果が得られているかどうかの確認は行います。参考結果とはなりますがリアルタイムRT-PCR法以外の方法で診断検査を行った場合も、結果をご報告いただきますようお願いいたします。

なお、EQA2014のパネル検体にはB型インフルエンザウイルスは含まれていませんので、今回行う各所の診断検査からB型インフルエンザウイルスの診断検査を除外していただいても構いません。

4-3. 測定方法

1) パネル検体到着後、各チューブのスピンドウンを行ってから200 μ Lの滅菌蒸留水を加えます。30秒間のボルテックス、続いて10回の転倒混和を行って、サンプルを完全に溶解します。(パネル検体は滅菌蒸留水による溶解の有無にかかわらず、到着後は-80 $^{\circ}$ Cにて保管して下さい。)

2) 各地衛研の方法に従って亜型診断検査を行って下さい。先述しましたが、今回はH5およびH7亜型の鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で検査を行って下さい。

3) 検査の際は、以下の点に留意して下さい。

・少なくとも1回の検査で、6検体を同時に検査する事

・亜型同定検査を行う際には、必ず同時にType Aの検査を行い、かつそれらを必ず一枚のプレート上で検査する事

4) リアルタイムRT-PCR法にて、Ct(Cp)値の測定を行って下さい。

リアルタイムRT-PCR法以外の方法(コンベンショナルRT-PCR法等)で行った検査結果があれば、参考までにその結果もご送付下さい。

5) 陽性および陰性コントロールを含め、測定したCt(Cp)値(小数第1位まで算出)を、結果記入ファイル(Excelファイル)の「結果記入欄」シートに、検査時のレイアウト(陽性対象・陰性対象の位置とプライマー・プローブの型・亜型を入力)とともに、入力して下さい(入力法は「結果記入欄_入力例」シートを参考にして下さい)。

6) 検査を行った際の試薬調製手順(反応試薬の調製、陽性コントロールの希釈等)の詳細を検査毎に、結果記入ファイル(Excelファイル)の「試薬調製手順記入欄」シートに入力して下さい(入力法は「試薬調製手順記入欄_記入例」シートを参考にして下さい)。

7) 入力後の結果記入ファイル名を「結果入力_地衛研名」に変更して下さい(ファイルが複数ある場合は通し番号を振って下さい。(例:「結果入力_国立感染症研究所1」「結果入力_国立感染症研究所2」))

(添付資料 2)

(備考) 機器を複数台所有している場合でも、全ての機器で検査を行う必要はありません。もし複数台で検査を行う場合、あるいは再検査や複数回に分けて検査を行うなど、検査を2回以上行った場合は、「結果記入欄」シートの特記事項にその旨を明記したうえで、結果記入ファイルもしくは「結果記入欄」シートをコピーして、結果入力を行って下さい。また「試薬調製手順記入欄」シートについても同様にコピーして、検査毎に手順を入力して下さい。

5. 結果報告時アンケートについて(入力時間は15分程度です)

各地衛研で行っている試験方法や使用キット等、陽性コントロール、試薬および器具、また今回の試験方法について、結果報告時アンケートファイル(Excelファイル)がありますので、「アンケート_入力例」シートを参考にして「アンケート記入欄」シートへご回答下さい。

アンケート記入後のファイル名は「結果報告時アンケート_地衛研名」に変更して下さい。(例:「結果報告時アンケート_国立感染症研究所」)。

6. EQA2014の結果の送付方法

全ての入力が終わりましたら各ファイルを電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2014結果」とご記入下さい。

件名:(地衛研名)EQA2014結果

宛先: eqa_influenza@nih.go.jp

ご質問等は下記にお問い合わせ下さい。

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)

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)実施について

平成 26 年度に引き続き、本年度も「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)」について全国の地方衛生研究所を対象に外部精度管理(EQA)を実施いたします。昨年度は、感染研より配布するパネル(RNA 抽出が不要な 6 検体)に対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査を行っていただき、高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)および鳥インフルエンザ(A/H7N9)診断検査の実施体制の確認と各診断検査の精度向上を目的とした EQA を実施いたしました。本年度は感染研より配布するパネル(RNA 抽出が不要な 1 検体および RNA 抽出が必要な 5 検体)に対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査が EQA の評価対象となります。

本 EQA に参加する場合は、参加登録票に必要事項をご記入の上、電子メールにてご送付いただきますようお願いいたします(参加登録の締切は平成 27 年 8 月 7 日 17:00)。

本 EQA は平成 27 年度 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」(主任研究者 小田切孝人)により行います。

(添付資料3)

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)実施要項

1. EQA2015 実施スケジュール

- ・参加登録票の送付:平成 27 年 7 月 27 日
- ・参加登録の締切:平成 27 年 8 月 7 日 17:00
- ・パネル検体発送および結果記入ファイル送付予定:平成 27 年 8 月 24 日～28 日
- ・測定期間:パネル検体到着日～平成 27 年 10 月 16 日
- ・結果報告およびアンケートの締切:平成 27 年 10 月 16 日
- ・集計報告:平成 27 年 12 月頃より順次
- ・EQA 事後アンケートの実施

2. EQA2015 への参加について

今回行う EQA2015 に参加される場合は、平成 27 年 7 月 27 日に送付する「参加登録票」(入力時間は 5 分程度)に入力の上、ファイル名を「参加登録票_地衛研名」に変更して平成 27 年 8 月 7 日 17:00 までに電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2015 参加」とご記入下さい。(不参加の場合は「参加登録票」の送付の必要はありません。)

件名:(地衛研名)EQA2015 参加

宛先:eqa_influenza@nih.go.jp

3. EQA2015 の内容

3-1. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

本年は感染研より配布した RNA 抽出が不要な 1 検体と RNA 抽出が必要な 5 検体(平成 27 年 8 月 24 日～平成 27 年 8 月 28 日に発送予定)

*本年は核酸抽出済みの乾燥品 1 検体と不活化したウイルスの乾燥品 5 検体を配布します。核酸抽出済みの乾燥品は 500 μ L の滅菌蒸留水に溶解して、そのままリアルタイム RT-PCR に使用して下さい。不活化したウイルスの乾燥品 5 検体は 500 μ L の滅菌蒸留水に溶解して、RNA 抽出を行った後、リアルタイム RT-PCR に使用して下さい。

3-2. 解析対象について

今回行う EQA2015 では、A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査が外部精度管理の評価対象となります。

3-3. 外部精度管理の評価について

今回は、H5 および H7 亜型の鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で、各地衛研の方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い(核酸抽出済み検体

(添付資料3)

の RNA 抽出は不要)、リアルタイム RT-PCR 法による A 型インフルエンザウイルスの亜型診断検査を行って下さい。

外部精度管理の評価は、総合判定シートに記入された結果に基づいて行います。トラブルシューティングが必要と考えられるケースでは、リアルタイム RT-PCR 法による Ct (Cp) 値を基に解析を行います。各所でリアルタイム RT-PCR 法以外の方法(コンベンショナル RT-PCR 法、LAMP 法、シーケンス法など)で行った場合も、正しい診断結果が得られているかどうかの確認を行いますので、結果詳細をご報告いただきますようお願いいたします。

なお、EQA2015 のパネル検体には B 型インフルエンザウイルスは含まれていませんので、今回行う各所の診断検査から B 型インフルエンザウイルスの診断検査を除外していただいても構いません。

3-4. 測定方法

- 1) パネル検体到着後、各チューブのスピンドウンを行ってから 500 μ L の滅菌蒸留水を加えます。30 秒間のボルテックス、続いて 10 回の転倒混和を行って、サンプルを完全に溶解します。(パネル検体は滅菌蒸留水による溶解の有無にかかわらず、到着後は-80 $^{\circ}$ C にて保管して下さい。)
- 2) 各地衛研の方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い、亜型診断検査を行って下さい。ただし核酸抽出済の 1 検体については RNA 抽出を行わないで下さい。先述しましたが、今回は H5 および H7 亜型の鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で検査を行って下さい。
- 3) 検査の際は、以下の点に留意して下さい。
 - ・必ずしも 6 検体を同時に検査する必要はありませんが、何回かに分けて検査を行う場合は、検査毎に必ず核酸抽出不要の検体も同時に検査して下さい。
- 4) リアルタイム RT-PCR 法にて、Ct (Cp) 値の測定を行って下さい。
もし、リアルタイム RT-PCR 法以外の方法(コンベンショナル RT-PCR 法等)で行った検査結果があれば、その結果もご送付下さい。
- 5) 測定した Ct (Cp) 値(小数第 1 位まで算出)を、結果記入ファイル(Excel ファイル)の「結果記入シート」に入力して下さい(入力法は「結果記入シート_入力例」シートを参考して下さい)。
- 6) また、各地衛研で行っている試験方法や使用キット等については、「アンケート入力シート」に入力して下さい。
- 7) 全ての検査終了後、各パネル検体の亜型判定結果を「総合判定シート」に入力してください。
- 8) 入力後の結果記入ファイル名を「結果入力_地衛研名」に変更して下さい

(備考) 機器を複数台所有している場合でも、全ての機器で検査を行う必要はありません。もし複数台で検査を行う場合、あるいは再検査や複数回に分けて検査を行うなど、検査を 2 回以上行った場合は、「結果記入シート」の特記事項にその旨を明記したうえで、「結果記入シート」をコピーして増やして、結果入力を行って下さい。

4. EQA2015 の結果の送付方法

全ての入力が終わりましたら各ファイルを電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2015 結果」とご記入下さい。

件名:(地衛研名)EQA2015 結果

(添付資料3)

宛先: eqa_influenza@nih.go.jp

5. EQA 事後アンケートの実施について

本 EQA の実施後に、EQA の改善等を目的とした事後アンケート調査を行いますので、ご協力をお願いいたします。

ご質問等は下記にお問い合わせ下さい。

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)

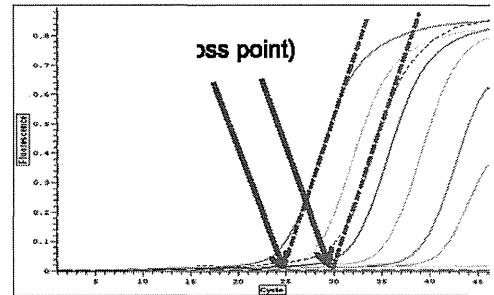
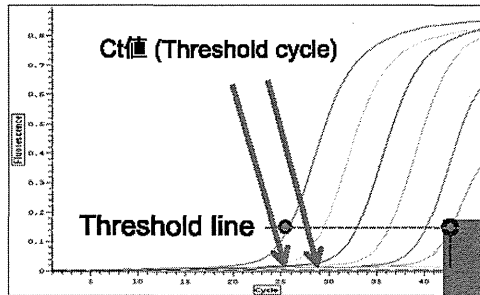
担当: 影山/高山/中内

(添付資料 4)

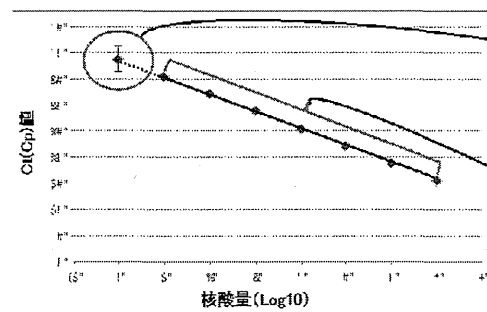
結果の解釈について

1. 定量的リアルタイム RT-PCR について

1-1. 原理



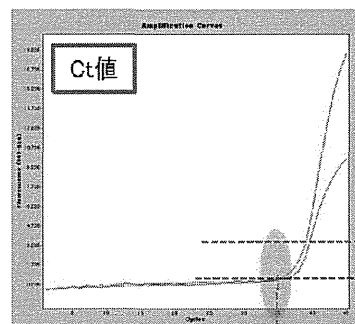
Ct 値は Threshold line とシグナルとの交点の Cycle 数 (上左図)、Cp 値は指数増幅期の回帰曲線と横軸 (ベースライン) との交点の Cycle 数 (上右図) を表します。本 EQA で行った TypeA, HA(H5, および H7) 検出系は、試薬、プライマー、プローブに問題が無い場合、増幅シグナルはシグモイドカーブを描き、核酸量(Log10) と Ct(Cp) 値の間には相関性が見られ、PCR 増幅効率が 100% の場合は理論上傾き約-3.32 の直線上にプロットされます (下図)。



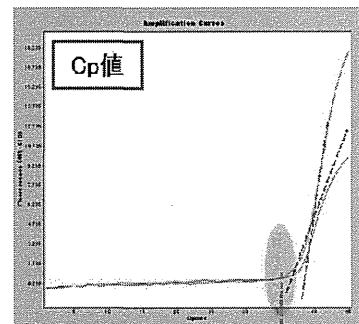
検出限界付近で Ct(Cp) 値がぶれてしまい定量的な検出が出来ない部分

Ct(Cp) 値が傾き約-3.32の直線上にプロットされ定量的な検出が可能な部分

1-2. 各検出系間の Ct 値(Cp 値)の乖離について



立ち上がりのサイクル数



立ち上がりのサイクル数

全ての検出系は、検出系の種類が異なっても、ターゲット核酸のコピー数が同じ場合、シグナルの立ち上がりのサイクル数がほぼ同じになるよう構築しています。上左図のように、Threshold line を青線のところに引くと2つの検出系間の Ct 値は乖離しません、赤線のところに引くと少し乖離が見られます。また、上右図のように、Cp 値でも乖離が見られます。これは、検出系の種類によって、シグモイドカーブの形がそれぞれ

(添付資料 4)

異なるためです。データの解析時に必ずシグナルの立ち上がりのサイクル数とシグモイドカーブをご確認下さい。

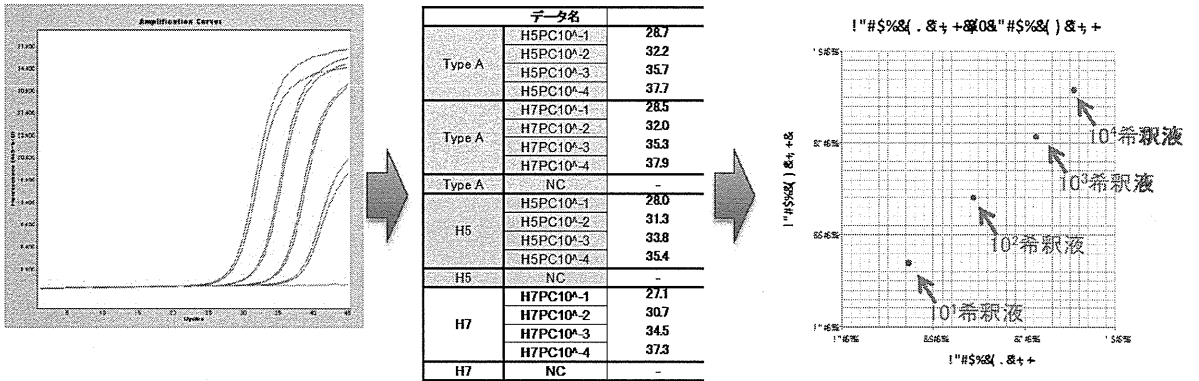
2. 結果の解析方法について

2-1. EQA で用いた陽性コントロールについて

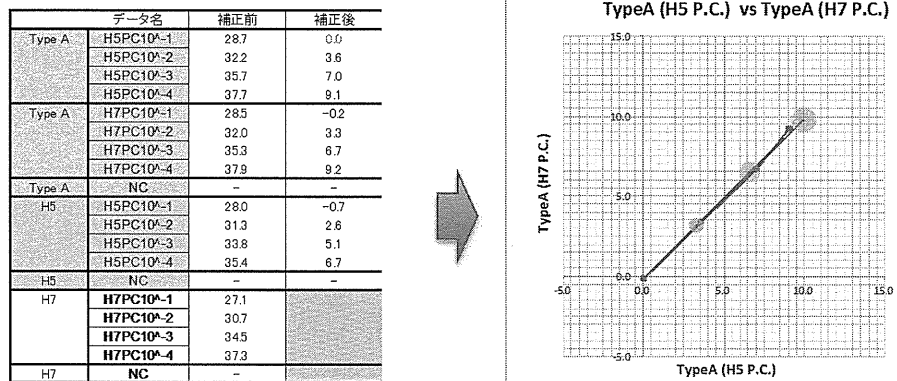
今回の EQA では、10 倍階段希釈した陽性コントロールをテンプレートとし、定量的リアルタイム RT-PCR 法を実施して、各検出系の Ct(Cp)値を比較することで精度の高い検査ができていないか解析を行いました。配布した各陽性コントロールに含まれる M 遺伝子 (TypeA 検出系のターゲット遺伝子) と HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じで、検出系に問題がない場合、各陽性コントロールの $10^1 \sim 10^3$ 希釈液までは必ず定量的に検出できる濃度となっています。すなわち、陽性コントロールを 10 倍階段希釈していくと、 $10^1 \sim 10^3$ 希釈液までは、PCR 増幅効率が 100% の場合は、理論上約 3.32 ずつ Ct(Cp)値が増加しますが、 10^4 希釈液は検出限界付近の核酸量のため、検出できない、あるいは検出できたとしても、検査ごとに Ct(Cp)値が変動する可能性があります。

2-2. TypeA 検出系の 2 種類の陽性コントロール間での比較

TypeA 検出系を評価するために、2 種類の陽性コントロール間の TypeA 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較しました。H5 陽性コントロールと H7 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各希釈液の Ct(Cp)値は、理論上どちらもほぼ同じ値となります (下図)。



今回の解析では、H5 陽性コントロールの 10^1 希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました (下図)。



(添付資料 4)

TypeA 検出系に問題がなければ、H5 陽性コントロールと H7 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、2 種類の陽性コントロールの 10^3 希釈液までの Ct(Cp)値の間に乖離はなく、H5 陽性コントロールの 10^1 希釈液の Ct(Cp)値を起点とした 45 度の対角線 (グレーの直線) 上に、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上約 3.32 の間隔でプロット (グレーの円の中心点) されます。また、理論上 PCR 増幅効率が 90%以上の場合は検査の精度に問題がないと考えられ、その Ct(Cp)値の範囲をグレーの円で示しました。 10^4 希釈液は検出限界付近の核酸量となり定量的な検出ができないため、示したグレーの円から外れる場合もあります。

2.3. TypeA 検出系の 2 種類の陽性コントロール間での比較から分かる問題点

各陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、理論上赤の破線で示した原点を起点とした対角線上にプロットされます。

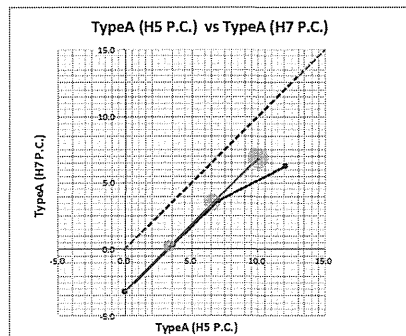


図 1 10^1 希釈液の結果が原点にプロットされない

左図の場合、すべての希釈液で、TypeA (H5 P.C.) の Ct(Cp)値が TypeA (H7 P.C.) の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より下にプロットされています。これは、H7 陽性コントロールと比べ H5 陽性コントロールに問題があるためと考えられ、H5 陽性コントロールが凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。

逆に、すべての希釈液で、TypeA (H7 P.C.) の Ct(Cp)値が TypeA (H5 P.C.) の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より上にプロットされた場合は、H7 陽性コントロールに問題があると考えられます。

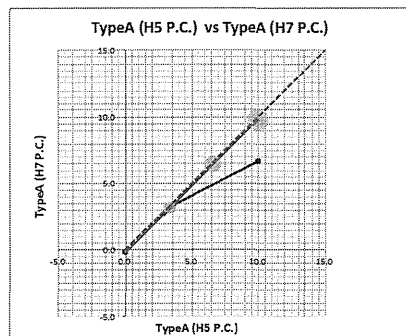


図 2 10^2 から 10^3 希釈液の結果が、グレーの直線上にプロットされない (例で示した図は 10^3 希釈液のみずれた場合です)

左図の場合、 10^2 希釈液まではグレーの直線上に 3.32 の間隔でプロットされていますが、 10^3 希釈液以降、グレーの直線上にプロットされなくなっています。これは、両方の陽性コントロールが、凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。また、TypeA 検出系において、プライマー、プローブの劣化により検出感度の低下が見られた可能性も考えられます。

(添付資料 4)

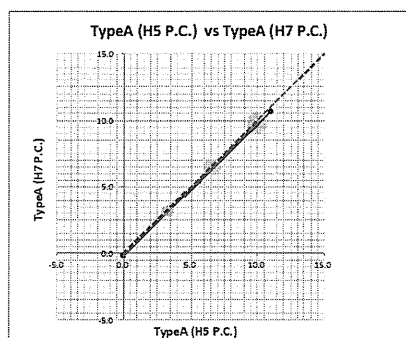
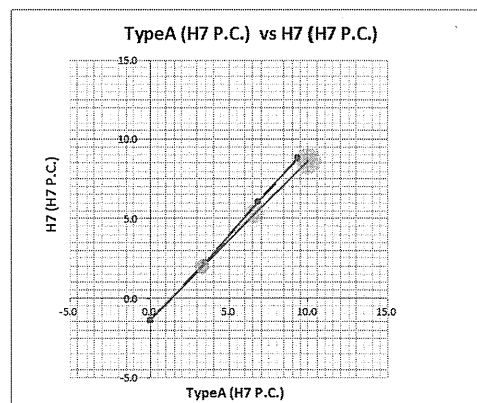
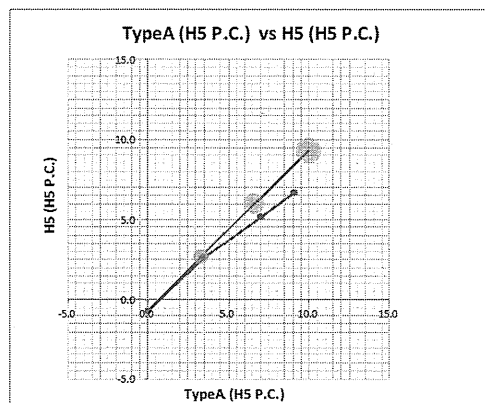


図3 10² から 10³ 希釈液の結果が、グレーの円から大きく外れている左図の場合、各希釈液の Ct(Cp)値はグレーの直線上にプロットされていますが、3.32 より大きな間隔でプロットされています。これは、反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により TypeA 検出系において定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

2-4. 各陽性コントロールにおける TypeA 検出系と各 HA 検出系の比較

TypeA と H5 検出系を評価するために、H5 陽性コントロールの TypeA 検出系と H5 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較しました。今回の解析では、TypeA 検出系の 10¹ 希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました（下図左）。H5 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子と HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各希釈液の Ct(Cp)値は、理論上どちらもほぼ同じ値となります。

TypeA と H7 検出系の評価についても、上記と同様に H7 陽性コントロールの TypeA 検出系と H7 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較するため、TypeA 検出系の 10¹ 希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました（下図右）。



TypeA および HA 検出系に問題がなければ、各陽性コントロールに含まれる M および HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各陽性コントロールの 10³ 希釈液までの Ct(Cp)値の間に乖離はなく、H5 もしくは H7 陽性コントロールの 10¹ 希釈液の Ct(Cp)値を起点とした 45 度の対角線（グレーの直線）上に、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上約 3.32 の間隔でプロット（グレーの円の中心点）されます。また、理論上 PCR 増幅効率が 90%以上の場合は検査の精度に問題がないと考えられ、その Ct(Cp)値の範囲をグレーの円で示しました。10⁴ 希釈液は検出限界付近の核酸量となり定量的な検出ができないため、示したグレーの円から外れる場合があります。

(添付資料 4)

2-5. 各陽性コントロールにおける TypeA 検出系と各 HA 検出系の比較から分かる問題点

各陽性コントロールに含まれる M および HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、理論上赤の破線で示した原点を起点とした対角線上にプロットされます。

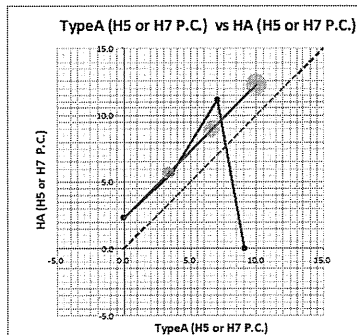


図4 10¹希釈液の結果が原点にプロットされない

左図の場合、すべての希釈液で、HA 検出系の Ct(Cp)値が TypeA 検出系の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より上にプロットされています。これは、HA 検出系に問題があるためと考えられ、HA 検出系において、プライマー、プローブが凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、ストック作製時に濃度調整が正しくなかったなどの可能性があります。

逆に、TypeA 検出系の Ct(Cp)値が HA 検出系の Ct(Cp)値よりも大きくなり、赤の破線より下にプロットされた場合は、TypeA 検出系に同様の原因あると考えられます。

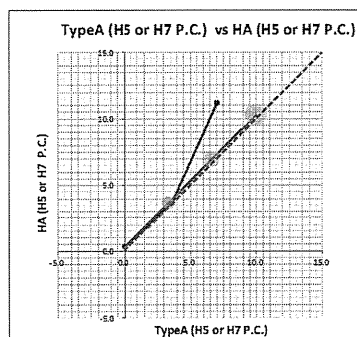


図5 10³希釈液の結果が、グレーの直線上にプロットされない

左図の場合、10²希釈液まではグレーの直線上に 3.32 の間隔でプロットされていますが、10³希釈液以降、グレーの直線上にプロットされなくなっています。これは、陽性コントロールが、凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。また、一方の検出系において、プライマー、プローブの劣化により検出感度の低下が見られた可能性も考えられます。

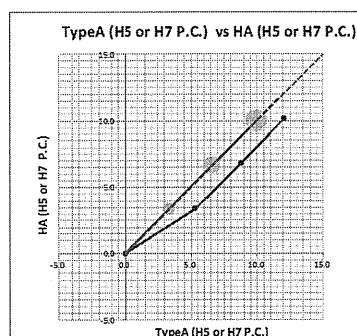


図6 10¹から 10³希釈液の結果が、グレーの直線と平行にプロットされない

左図の場合、TypeA 検出系において、Ct(Cp)値の間隔が 3.32 より大きくなっています。反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により、TypeA 検出系において正確な測定ができなくなってしまった可能性があります。逆に、HA 検出系において、Ct(Cp)値の間隔が 3.32 より大きくなっている場合は、HA 検出系において同様の理由から定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

(添付資料 4)

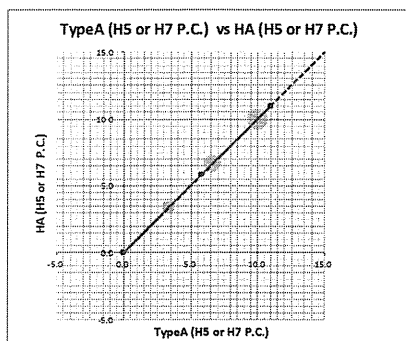
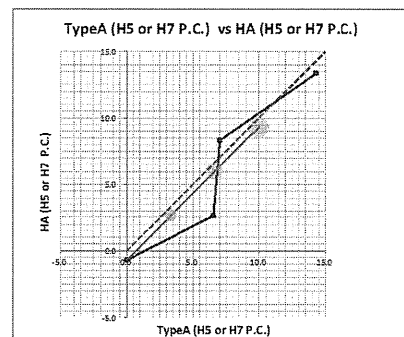
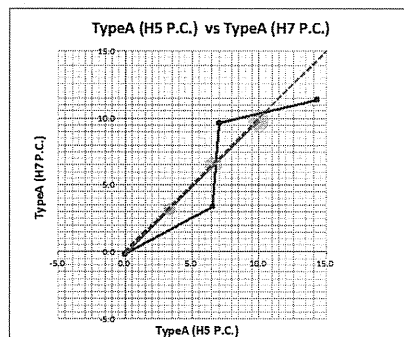


図7 10^2 から 10^3 希釈液の結果が、グレーの円から大きく外れている
左図の場合、両検出系において各希釈液の Ct(Cp)値はグレーの直線上
にプロットされていますが、3.32 より大きな間隔でプロットされてい
ます。これは、両方の検出系において、反応試薬中のプライマー、プロ
ーブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣
化により定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

2-6. 陽性コントロールの希釈系列が正確に作製できていない

図8 (下図左)、9 (下図右) の場合、各希釈液の Ct(Cp)値の差が等間隔ではなく、対角線から大きくはずれてプロットされています。正確に希釈系列が作製できていない可能性があり、この場合は、今回の EQA では正確な評価が難しくなります。また、一方の陽性コントロールの 10 倍階段希釈が正確でない場合は、前述の図5のようにプロットされ、両方の陽性コントロールの 10 倍階段希釈が正確でない場合は、前述の図3のようにプロットされることもあります。



今回の EQA の評価は、今回送付した「解析結果 2013_地衛研名(Excel ファイル)」の「解析結果」シート中の解析図とアンケート結果から総合的に行いました。「解説」シート中の<解析結果へのコメント>および<その他コメント欄>をご参照下さい。

この「結果の解釈について(PDF ファイル)」と「アンケート、結果記入ファイルからの集計(PDF ファイル)」も参考に、問題があった場合にはトラブルシューティングを行って頂きますようお願い致します。

(添付資料5)

アンケートおよび結果記入ファイルからの集計

今回の EQA に参加された 74 地衛研からのアンケートおよび結果記入ファイルの項目を集計し、いくつかの結果を下記にまとめました。

1. 陽性コントロールの保管について

1-1. TypeA/H7(マーカー入)の保管について

図1 TypeA/H7(マーカー入)の保管温度

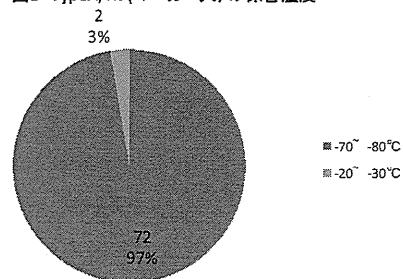
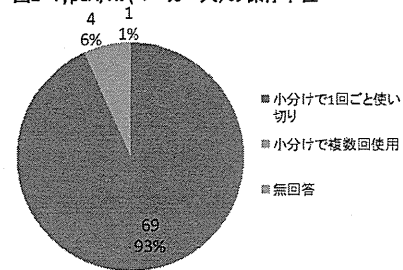


図2 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



1-2. TypeA/H5(マーカー入)の保管について

図3 TypeA/H5(マーカー入)の保管温度

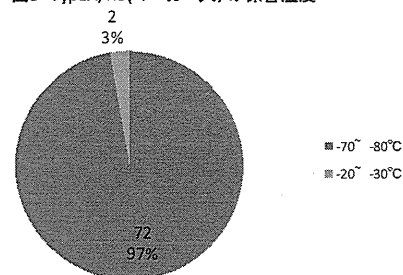
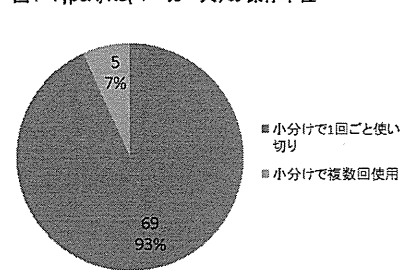


図4 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



<コメント>

-20~-30°Cで保管をされている場合は、冷凍庫に自動霜取り機能のないもの（メディカルフリーザー等）を使用されているか、ご確認ください。

また、小分けで複数回使用されている場合、凍結融解により劣化につながる可能性があります。

(添付資料5)

2. プライマー、プローブについて

2.1. TypeA(M遺伝子)検出系について

図5 Type A (M遺伝子)検出系 記載マニュアル

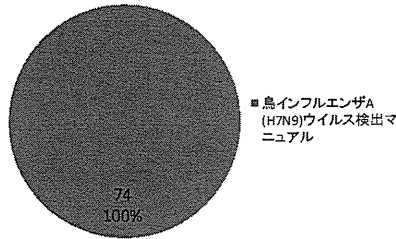


図6 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブレミックスの有無

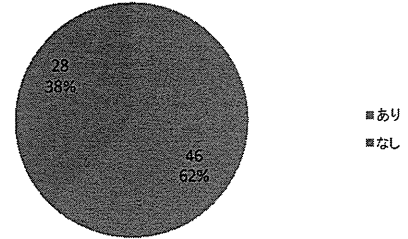


図7 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブ保存温度

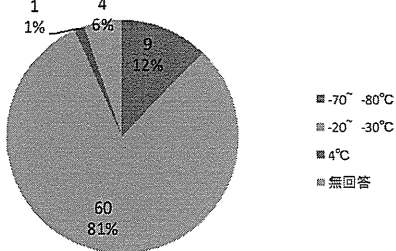
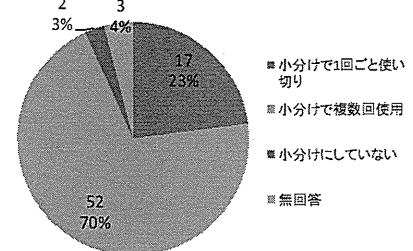


図8 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブ保存単位



2.2. H7 検出系について

図9 H7検出系 記載マニュアル

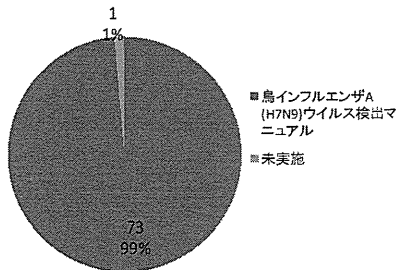


図10 H7検出系 プライマー、プローブレミックスの有無

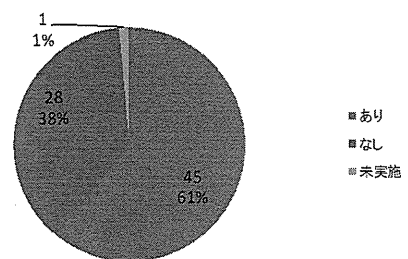


図11 H7検出系 プライマー、プローブ保存温度

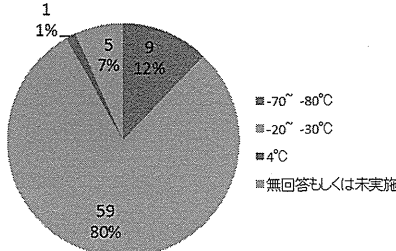
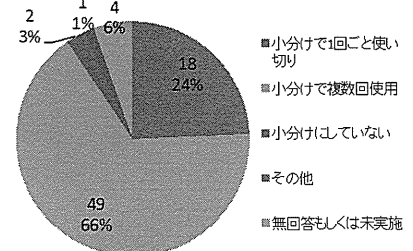


図12 H7検出系 プライマー、プローブ保存単位



(添付資料5)

2-3. H5 検出系について

図13 H5検出系 記載マニュアル

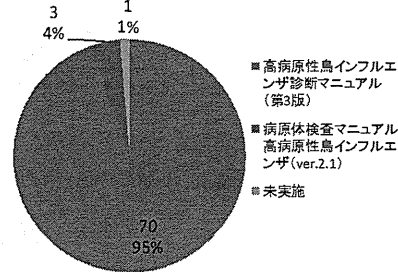


図14 H5検出系 プライマー、プローブプレミックスの有無

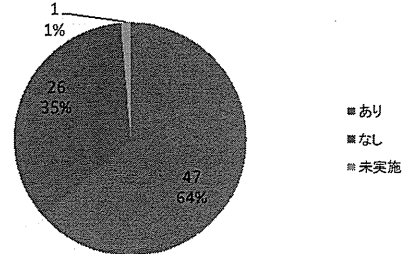


図15 H5検出系 プライマー、プローブ保存温度

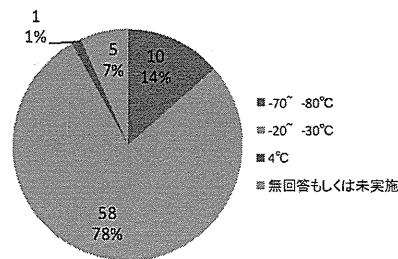
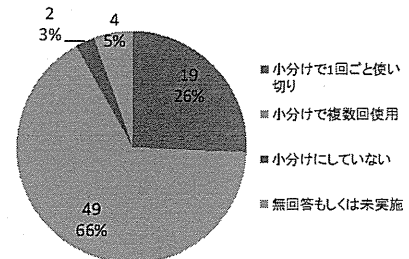


図16 H5検出系 プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、凍結融解により劣化につながる可能性があります。

また、H5 検出系において、病原体検査マニュアル高病原性鳥インフルエンザ(ver.2.1)記載の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。この検出系は、2010年10月以降に日本国内の野鳥や家禽で流行した clade2.3.2.1 に対して、H5 検出系が TypeA 検出系の Ct 値と比べ、大きく乖離するため、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)記載の検出系をご使用ください。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図17 使用キット名

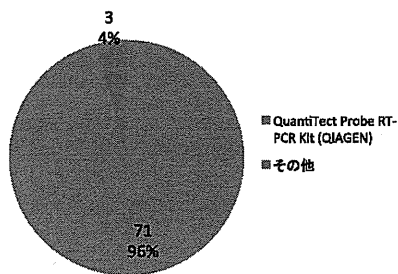
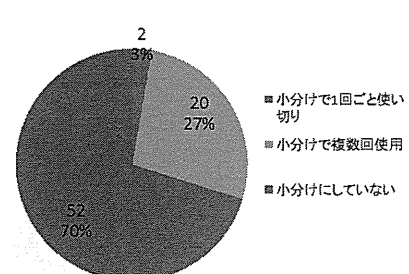


図18 試薬の保存単位

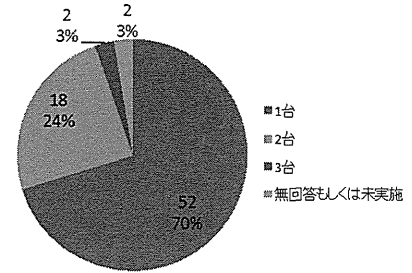


反応試薬については、QuantiTect Probe RT-PCR Kit 以外を使用している地衛研が数カ所見られました。配布したマニュアルに記載されている反応条件、反応組成は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit に最適化されたものです。反応条件、反応組成を最適化していないと、検出感度の低下につながる

(添付資料 5)

可能性もあるのでご注意ください。
 また、反応時間がより短い試薬をマニュアル内で使用してほしいというご意見をいくつかの地衛研よりいただきました。今後、検討させていただきます。
 試薬の保存については、小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、コンタミネーションが起きないようにご注意ください。また、凍結融解による劣化により検出感度の低下につながる可能性もありますのでご注意ください。

図20 通常のインフルエンザ検査用機器の台数



4. リアルタイム PCR 機について

図19 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ77機種)

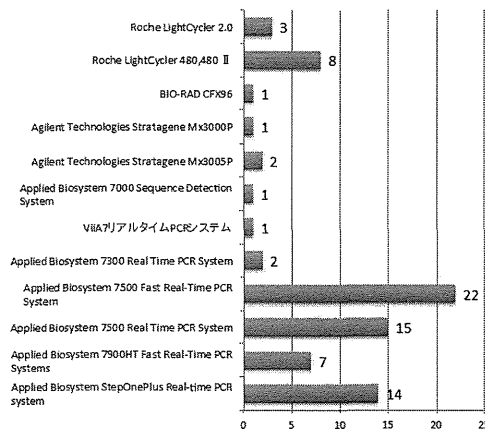


図21 通常検査のバックアップ用機器の台数

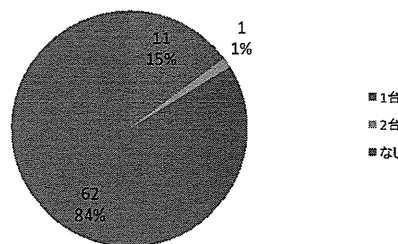
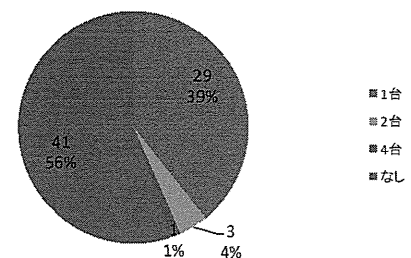


図22 パンデミック時用 (通常は他の検査用) 機器の台数



<コメント>

使用期間の長い装置については、蛍光フィルター劣化、光学系のずれ、プレートの汚れなどにより正しく測定できない場合がありますので、定期的にメンテナンスを行うことをおすすめいたします。

(添付資料 5)

5. 試薬調製方法について (結果記入ファイルから)

図23 試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時の温度

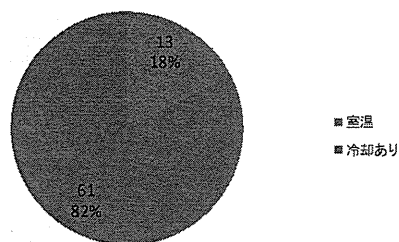


図24 試薬調製と陽性コントロール作製の順 (一人で検査を行った54地衛研)

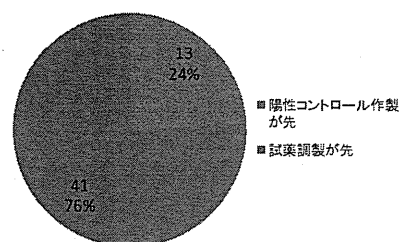
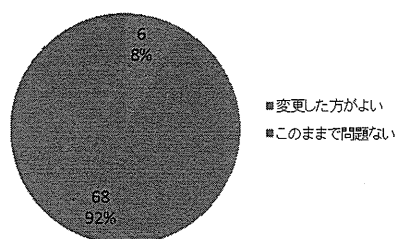


図25 試薬調製過程でのゾーニング



<コメント>

試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時に室温で行っていた地衛研が数カ所ありましたが、氷上での作業をおすすめいたします。

また、一人でEQAを行っていた54地衛研のうち、13地衛研については、陽性コントロール作製後に試薬調製を行っていました。通常の検査でも、同様の順で作業を行っている場合には、反応試薬調製後、陽性コントロール調製を行った方が、陽性コントロールの反応試薬へのコンタミネーションの可能性が低くなります。

試薬調製過程でのゾーニングについては、コンタミネーションの危険性を低減させるうえで、レイアウトの変更をした方がいいと思われる地衛研が数カ所見られました。もし、レイアウトの変更ができない場合には、1回ごとの検査後にクリーンアップを徹底するなどご留意ください。

(添付資料5)

6. 陽性コントロールの希釈方法について (地衛研数で集計)

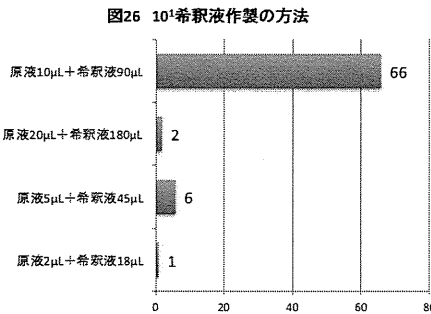
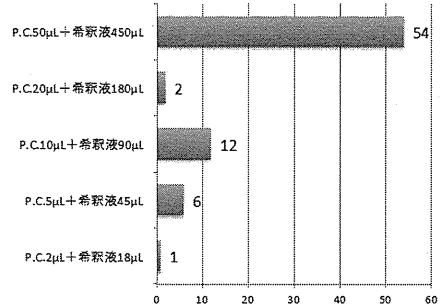
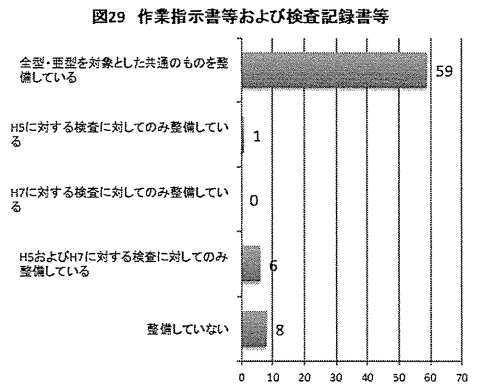
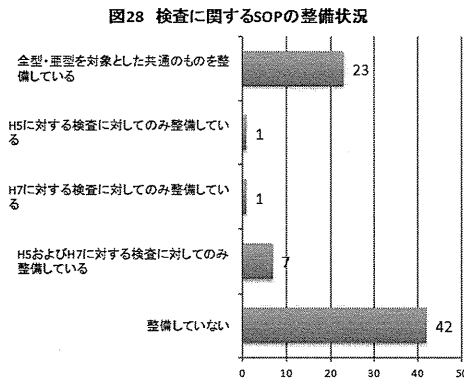


図27 10²希釈液以降の作製方法



陽性コントロールの希釈を特に 10² 希釈液以降で、50 μ L + 希釈液 450 μ L よりも少ない容量で行っている場合、ピペッター由来の誤差が影響しやすく、正確に希釈系列の作製ができなくなる可能性が高くなります。

7. 各所で作成した検査に関する標準業務(作業)手順書(SOP)等や H5, H7 亜型等同定検査の作業指示書等および検査記録書等の整備状況について (地衛研数で集計)



<コメント>

作業手順書および検査記録書等は、ほとんどの地衛研で整備されているが、SOPを整備している地衛研は比較的少ない。