

(添付資料 6)

## 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。核酸検出検査の精度管理を行う目的は、検査結果の正確性、安定性を担保する事です。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や試薬類は弊所とは同一ではない場合があり、さらに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も異なる可能性が高いため、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、各所の検査に対する信頼性を高めるうえで、外部精度管理(EQA)が重要になります。

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 A 型および亜型の核酸検出検査は、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 6 検体を配布して、A 型インフルエンザウイルスの亜型診断検査をリアルタイム RT-PCR により行っていただき、お送りいただいた検査結果を詳細に評価して、精度の高い検査が行えているか、行えていないとすればどこに問題があるか、その原因を特定(特定できない場合は推定)し、トラブルシューティング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. 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について(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ついて解説しましたので、まずはご一読下さい。また、各所から送付された結果を解析し、検査結果や手順で何らかの問題があった場合やその問題となった原因を特定できた場合(特定できなかった場合は推定)は、「5. 解析結果 2014\_地衛研名(Excel ファイル)」(複数回の検査を行っている場合は、1つのファイルにまとめました)の「パネル検体の結果」シート中の表および<判定結果について><その他のコメント>にコメントを記載しました。「パネル検体の結果」シートの見

(添付資料 6)

方については「3. 「パネル検体の結果」シートの見方(PDF ファイル)」に示していますのでご参照下さい。

なお、今回配布したパネル検体は、検査系に問題がなければ必ず検出できる RNA 量となっています。何らかの問題があつてこれらが正確に検出できなかった場合は、コメントおよび「2. 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について(PDF ファイル)」を参考に、ご自身で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。また、これらが検出できていたとしても、検査系に何らかの問題がある可能性が高い地衛研においてはコメントにその旨記載しましたので、同様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。

また、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「4. EQA の結果および結果報告時アンケートの集計(PDF ファイル)」にまとめました。アンケート結果から、ほとんどの地衛研で作業指示書等および検査記録書等を整備している事が明らかになりましたが、検査毎や作業員毎に手順や作業場所が異なるケースが散見されました。正確で精度の高い検査を行う上で、作業員全員が共通した手順で検査を行い同じ結果を得られるよう、今一度作業指示書等および検査記録書等を確認し、改めて精度管理を行う事をお勧めします。また、その他にも精度の高い検査を行う上で留意すべき点をコメントとして記載しましたので、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。

本 EQA に関して、トラブルシューティングの方法が分からないなどご不明な点や、ご意見、ご要望などありましたら、下記にお問い合わせ下さい。なお、検査系のトラブルシューティングに必要なプローブやプライマーは少量であれば配布可能です。ご希望の際は下記にお問い合わせ下さい。

2014 年 12 月 26 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 7)

## 定量的リアルタイム RT-PCR と精度管理について (問題時のトラブルシューティングについて)

### 1. 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)。ABI のリアルタイム PCR 装置のソフトウェアでは、通常ベースライン蛍光値の標準偏差の 10 倍の値に Threshold Line が設定され Ct 値が算出されます。一方、Roche LightCycler システムの Auto 解析では、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)値として算出(2nd Derivative Maximum 法)しているため、Threshold Line は存在しません(図 2)。

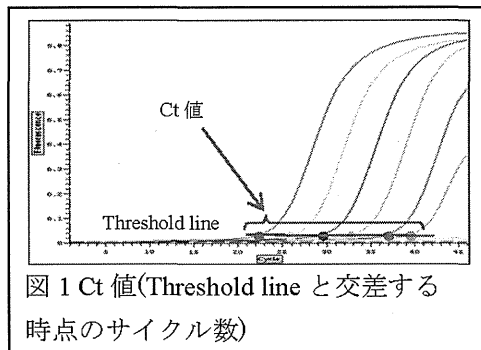


図 1 Ct 値(Threshold line と交差する時点のサイクル数)

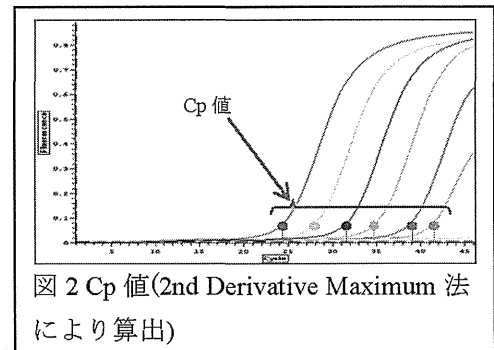


図 2 Cp 値(2nd Derivative Maximum 法により算出)

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)と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)。

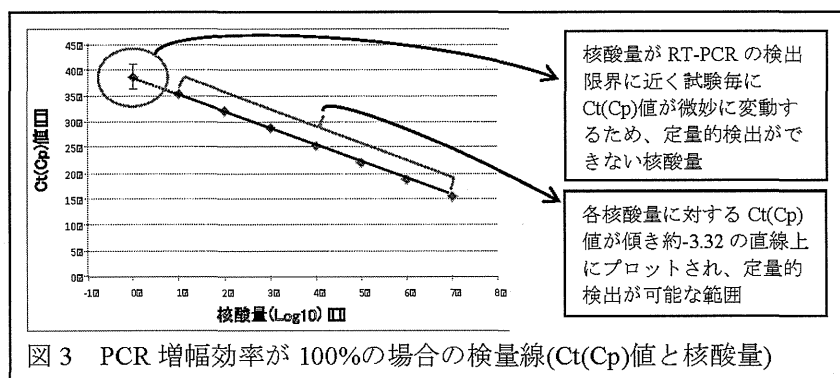


図 3 PCR 増幅効率が 100%の場合の検量線(Ct(Cp)値と核酸量)

(添付資料 7)

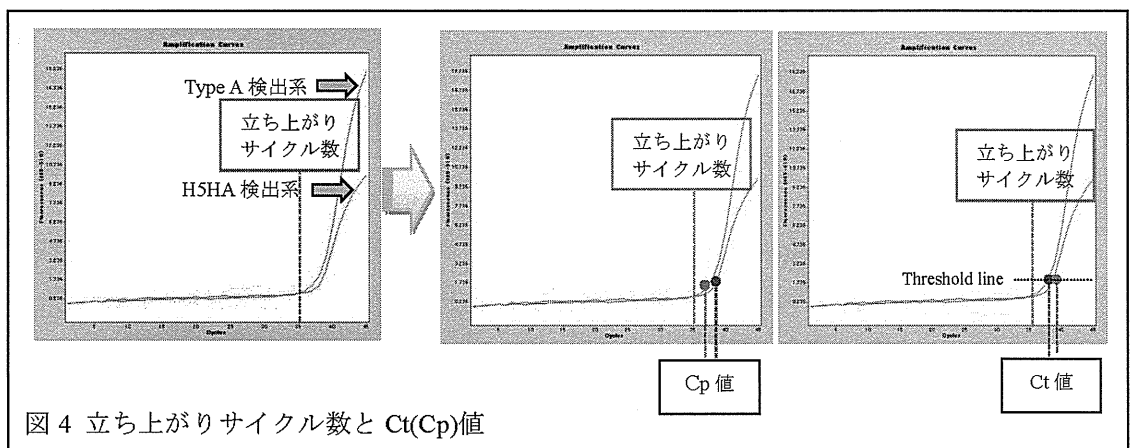
## 2. 精度管理について

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。

## 3. 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(Type A(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ので、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、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。



## 4. 検査手技や微量ピペッターなどの不備について

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)

(添付資料 7)

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性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。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事をお勧めします。また、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。

- 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、第2項で触れたように、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。後述するように、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

(添付資料 7)

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。

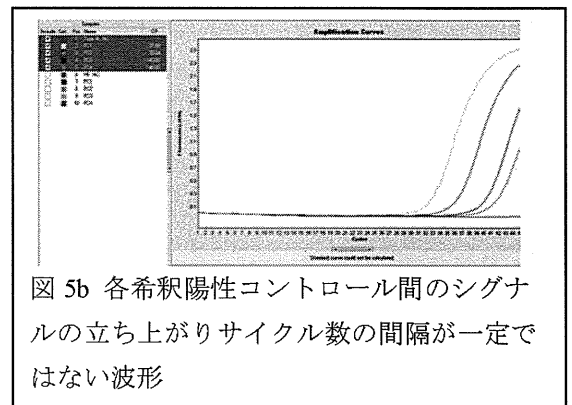
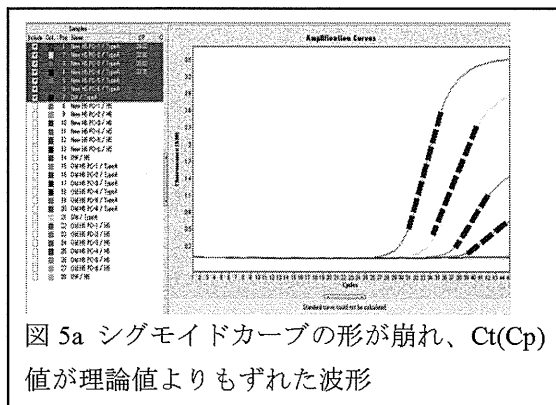
### 5. 検出系に何らかの問題がある場合

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、Roche LightCycler 480 システムの場合では、第 3 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、第 4 項で触れたように、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。

(添付資料 7)

## 6. 検出系に何らかの問題がある場合の具体例およびそのトラブルシューティングについて

先述したように検出系に何らかの問題がある場合は、その原因により現れる現象も異なるため、その現象を解析する事でトラブルシューティングを行う事が可能になる場合があります。以下(1)~(6)に 10 倍階段希釈した H5 および H7 陽性コントロールを用いて検査を行った結果を具体例として示し、原因特定の仕方とその対処方法について解説します。(今回は Roche LightCycler 2.0 システムを使用した場合を例にしていますが、ABI やその他のメーカーの機器を使用した場合も同じ事がいえます)

### (1) プライマー、プローブに何らかの問題がある場合の一例(図 6)

**現象:** 同じ H7 陽性コントロールの希釈系列を用いた検査を行ったにも関わらず、波形を見ると H7 検出系の立ち上がりのサイクル数が Type A 検出系に比べると大きく遅れている (Cp 値も H7 検出系の方が Type A 検出系に比べ大幅に大きくなっている)。

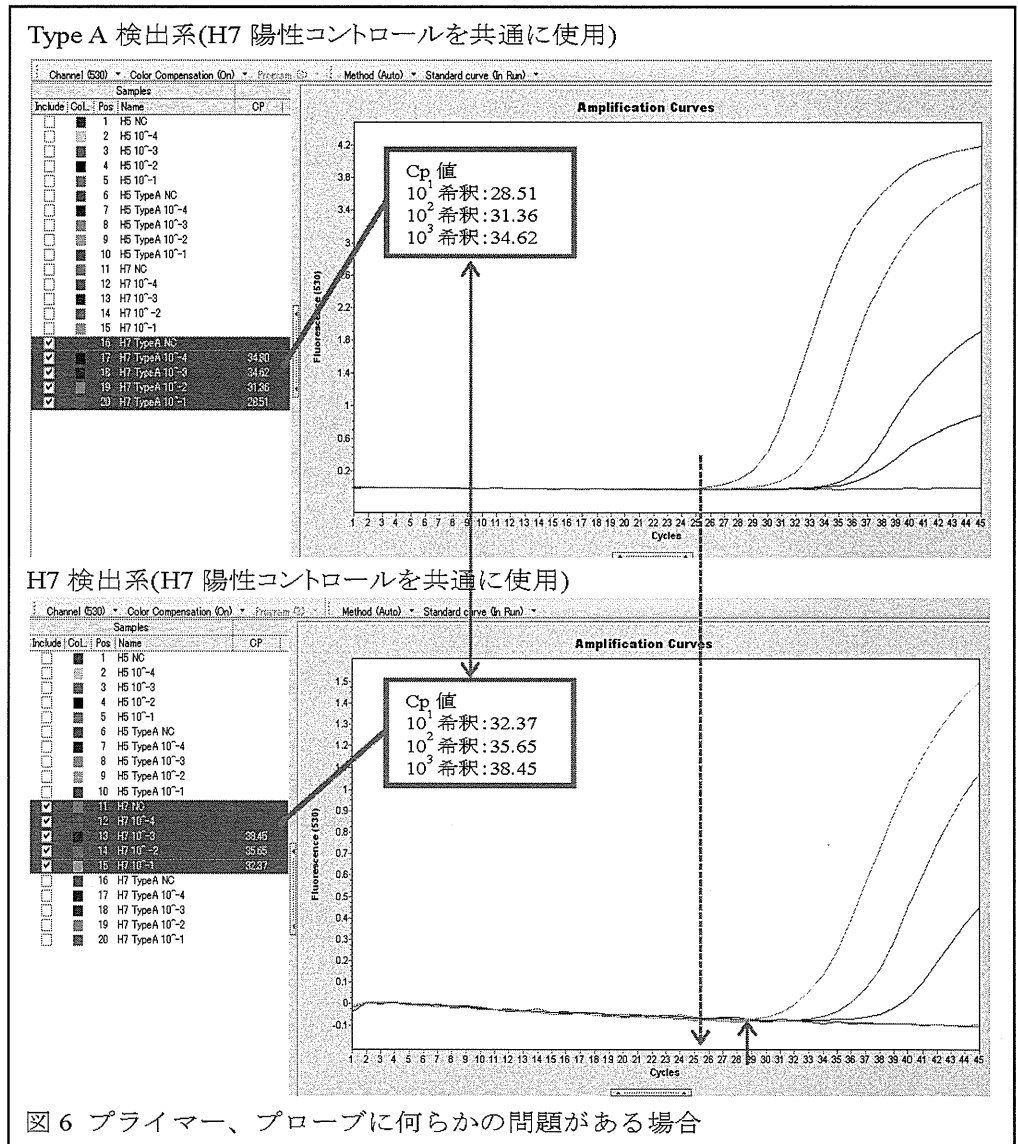
**原因:** H7 検出系に何らかの問題があったため、シグナルの立ち上がりサイクル数が Type A 検出系よりも遅れたと考えます(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)。このようなケースでは、プライマー、プローブに問題がある場合がほとんどであり、その原因として次の可能性が考えられます。

- 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濃度調整が不正確

**対処方法:** 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。具体的には、まずはプライマーのみを新旧で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。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を新旧で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)。

(添付資料 7)

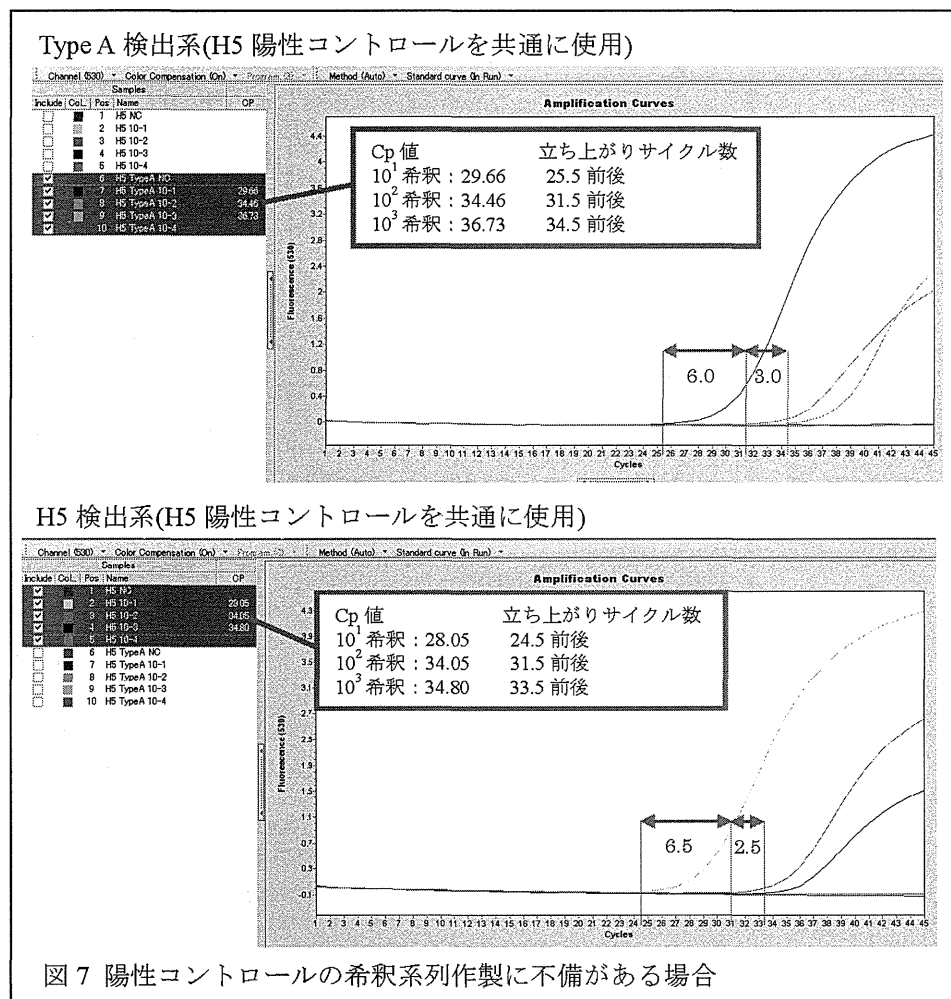




(添付資料 7)

(2) 陽性コントロールの希釈系列作製で不備がある場合の一例(図 7)

現象： H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて、Type A および H5 検出系の検査を行っていますが、どちらの系も  $10^1$  希釈液と  $10^2$  希釈液および  $10^2$  希釈液と  $10^3$  希釈液の間の立ち上がりサイクル数の間隔がそれぞれ一定ではなく、想定される範囲内(理想値は 3.32)になっていないにもかかわらず、同じ希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔はどちらの系もほとんど一致している。



原因： 10 倍階段希釈の陽性コントロールであるにも関わらず、それぞれの立ち上がりサイクル数\*の間隔が一定ではなく、さらに Type A および H5 検出系間で同じ希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔が同程度であることから(この例では、Type A および H5 検出系の  $10^1$  希釈液と  $10^2$  希釈液の立ち上がりサイクル数の間隔は約 6.0 および約 6.5、 $10^2$  希釈液と  $10^3$  希釈液の間隔は約 3.0 と約 2.5)、陽性コントロールの希釈が正確にできなかった可能性が高い

(添付資料 7)

いと考えられます。また、H5 検出系の立ち上がりサイクル数が Type A 検出系とほぼ同じ値 (この例では、Type A および H5 検出系の立ち上がりサイクル数は、 $10^1$  希釈液それぞれで約 25.5 および約 24.5、 $10^2$  希釈液でどちらも約 31.5) であるため、反応試薬調製時に何らかの問題があった、あるいはプライマー・プローブに問題があったとは考えにくく、単に陽性コントロールの希釈が正確ではなかったために、このような現象が見られたと考えられます。

\* この例の場合、特に Type A の  $10^2$  希釈液の増殖曲線の形が、 $10^1$  希釈液と比べると、X 軸の方向に寝てしまったため、Cp 値は比較的小さく算出されます。このように、増殖曲線の形が通常とは異なる場合も、その Cp 値と立ち上がりサイクル数の間に相関性がなくなってしまうため、結果解析を行う際は Cp 値のみの確認ではなく、増殖曲線の形や立ち上がりサイクル数についても確認する必要があります。

対処方法：このような場合の多くは、第 4 項で解説したように、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に不備があった可能性が高いため、まずは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に習熟する必要があります。なお、陽性コントロールの正確な希釈を行うには、少なくとも  $10\mu\text{L}$  以上の陽性コントロール液を分取・分注して、希釈液の作製を行う事をお勧めします。例えば、 $2\mu\text{L}+18\mu\text{L}$  の希釈よりも  $50\mu\text{L}+450\mu\text{L}$  の希釈の方が、同じ希釈倍率でもより誤差の少ない分取・分注を行う事ができます。希釈を行う際はできるだけ大きなスケールで行う事をお勧めします。また、陽性コントロールの希釈手順や使用している陽性コントロールの濃度等が間違っていないかどうか、検査マニュアル等もご確認下さい。

(3) 陽性コントロールもしくは反応試薬を反応槽に添加する際に不備がある場合の一例(図 8)

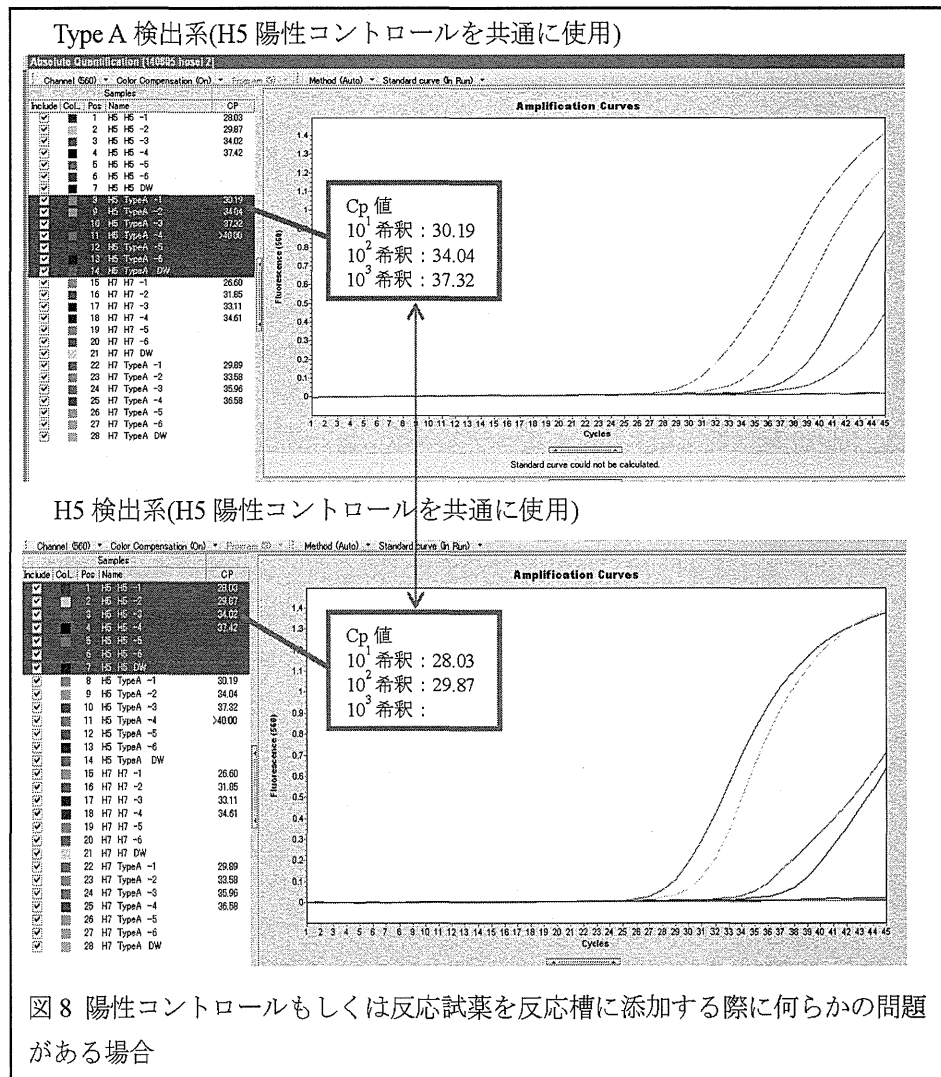
現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて検査を行ったにも関わらず、希釈した陽性コントロールの間の Type A 検出系の Cp 値の間隔は想定される範囲内であり、ほぼ等間隔であるにもかかわらず、H5 検出系の Cp 値は等間隔になっておらず、波形も少し乱れている。また、 $10^1$  希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数および Cp 値の間に若干乖離 (Type A が H5 検出系より遅れる) が見られる。

原因：Type A 検出系の結果から、陽性コントロールの  $10^1$ 、 $10^2$  希釈液の Cp 値の間隔がほぼ理想値であるため、陽性コントロールの希釈については特に問題はないと考えられます。しかし、 $10^1$  希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数もしくは Cp 値の間に若干の乖離があり、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題があった可能性が考えられます。また、H5 検出系においては、 $10^2$  希釈以下で Cp 値やシングモイドカーブが乱れているため、陽性コントロールを反応槽に添加する際に正確な量の分注ができなかった、あるいは H5 検出系反応試薬調製時の混合が十分でなかったなどの可能性も考えられます。

対処方法：この場合も、一部で微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取り扱いに不備があったと考えられますので、まずは、微量ピペッターの操作およびマイクロチュー

(添付資料 7)

ブの取り扱いに習熟する必要があります。また、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題がある場合は、第 6.(1)項で解説したような対応が必要になります。



(添付資料 7)

(4) 原因は特定できないがそれぞれの検査系に何らかの問題が生じている場合の例(図 9)

現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いた検査を行ったにも関わらず、同希釈の陽性コントロールに対し、Type A 検出系、H5 検出系の立ち上がりサイクル数が揃っておらず、それぞれの波形も乱れている。

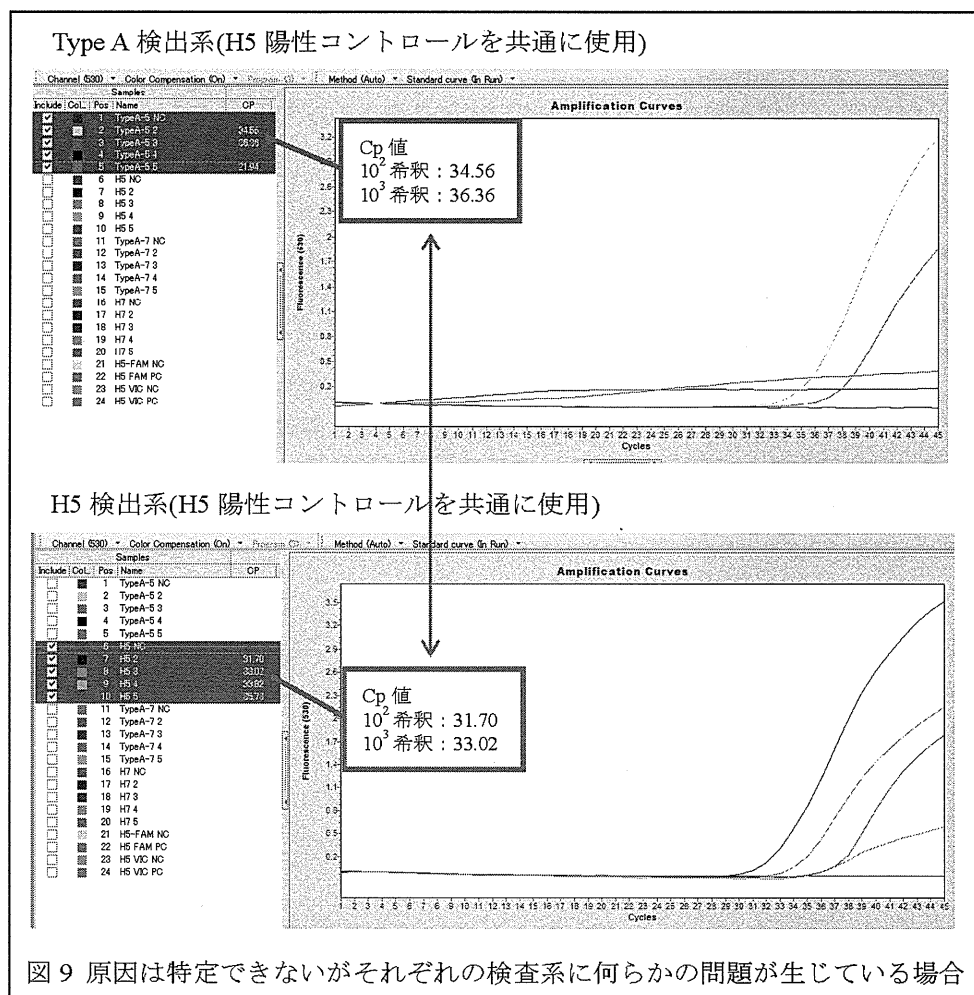


図 9 原因は特定できないがそれぞれの検査系に何らかの問題が生じている場合

原因：反応試薬調製時に微量ピペッターの操作もしくはマイクロチューブの取り扱い等に不備があったのか、プライマー、プローブに何らかの問題があったのか、そのどちらか一方あるいはその両方が関連していると考えられるのか、この例だけでははっきりとした原因の特定が難しい。

対処方法：まずは、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に習熟し、手技に問題がない状態で第 6.(1)項の要領でプライマー・プローブのチェックを行います。

(添付資料 7)

(5) 作業者により結果がばらつく

同一の陽性コントロールと試薬を使用しているにも関わらず、検査結果が各人で異なる場合は、各人の手技の違いや手順の違いが大きく影響している可能性が考えられます。他にも、各作業で使用するマイクロチップ、マイクロチューブ、微量ピペッターが統一されていない場合や、作業手順が統一されておらず同じ検査であっても各人で検査手順が異なる場合、同じ作業でも各人が使用する微量ピペッターが異なる場合など、検査手順や使用する機材の相違が原因となっている可能性も考えられます。

特に、作業者毎に異なる微量ピペッターを使用している施設では、たとえ各人が同じ作業を正確に行ったとしても、各ピペッターの精度が異なっていれば、分取・分注量もピペッター毎に異なるため、作業者毎に結果がばらつく可能性があります。

各人が微量ピペッターの操作やマイクロチューブの取り扱いに習熟する事が前提になりますが、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して共用するなど、機材等の使用に関しては統一・共用化を図る、作業者により検査手順が異なっているところがないか関係者全員で再確認を行う、標準業務(作業)手順書を作成して検査手順の統一を図る、等の対応が必要と考えられます。

### EQA の結果および結果報告時アンケートの集計

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72地衛研からの結果報告時アンケートにお寄せいただいた回答を集計し、いくつかの項目について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、ほぼ全ての地衛研が全ての検体に対して、亜型同定を正確に行う事ができていました。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。

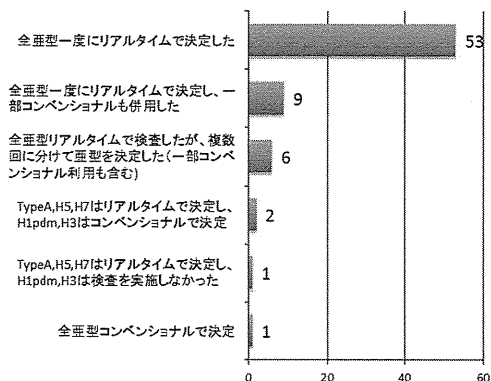
また、複数の作業員でEQAを実施した地衛研の中には、検査項目や作業内容等が作業員によって異なるケースも散見されました。作業員全員が同じ結果を得られるよう、また再現性良く正確で精度の高い検査を行うためにも、今一度、標準業務(作業)手順書や作業指示書等および検査記録書等を確認し、作業員間で統一した手順で検査を行う事をお勧めします。

| パネル検体 | 亜型        | 濃度<br>(copies/μL) | 正答数*         | 同定数**        |
|-------|-----------|-------------------|--------------|--------------|
| A     | H5N1      | 200               | 72/72 (100%) | 72/72 (100%) |
| B     | Negative  |                   | 72/72 (100%) | 72/72 (100%) |
| C     | H7N9      | 20                | 72/72 (100%) | 72/72 (100%) |
| D     | H1N1pdm09 | 20                | 72/72 (100%) | 71/71 (100%) |
| E     | H5N1      | 20                | 71/72 (99%)  | 71/72 (99%)  |
| F     | H3N2      | 20                | 71/72 (99%)  | 70/71 (99%)  |

\*正答数については、各パネル検体に対して、各所で実施した検査の範囲内で導き出される結果を正答として算出した。

\*\*同定数については、各パネル検体に対して、亜型まで導き出されている結果を算出した。

図1 今回のEQAでの検査方法



\*全亜型とは、H5,H7,H1pdm,H3 亜型を指します。

\*\*リアルタイムはリアルタイム RT-PCR 法、コンベンショナルはコンベンショナル RT-PCR 法を指します。

#### 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2 Type A (M遺伝子)検出系 記載マニュアル

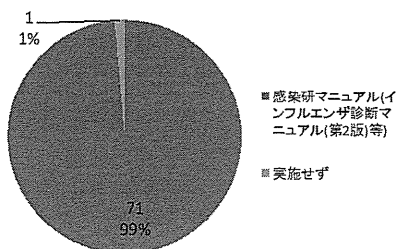
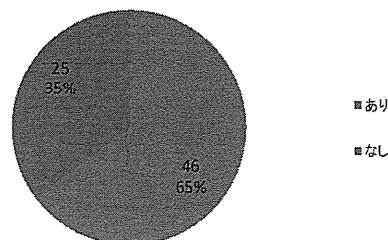


図3 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブレミックスの有無



(添付資料 8)

図4 Type A (M遺伝子)検出系  
プライマー、プローブ保存温度

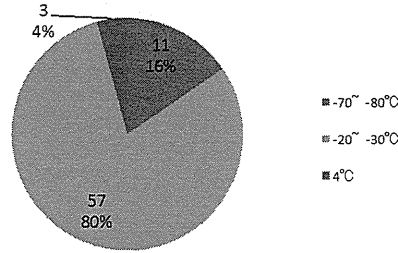
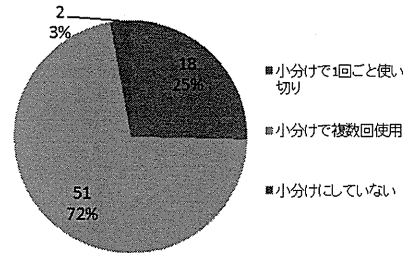


図5 Type A (M遺伝子)検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-2. H5 検出系について

図6 H5検出系 記載マニュアル

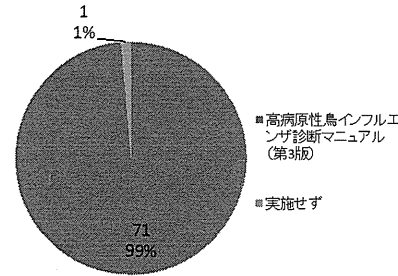


図7 H5検出系  
プライマー、プローブレミックスの有無

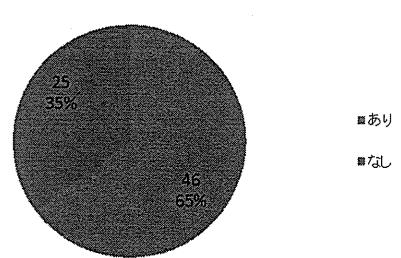


図8 H5検出系  
プライマー、プローブ保存温度

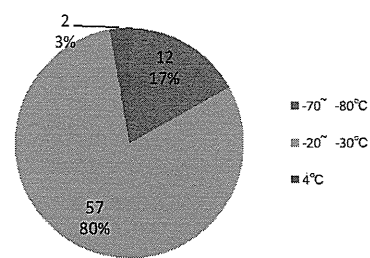
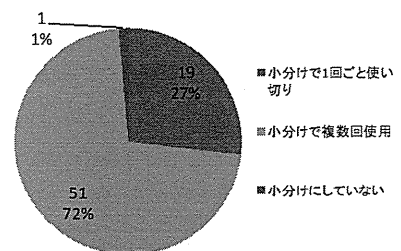


図9 H5検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-3. H7 検出系について

図10 H7検出系 記載マニュアル

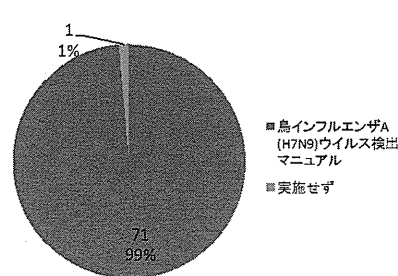
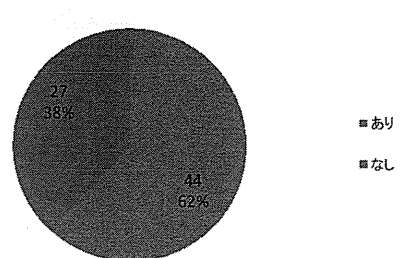


図11 H7検出系  
プライマー、プローブレミックスの有無



(添付資料 8)

図12 H7検出系  
プライマー、プローブ保存温度

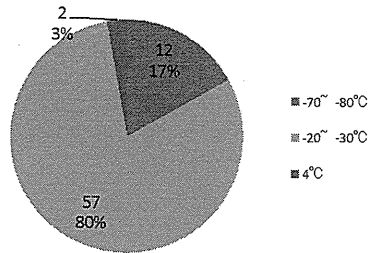
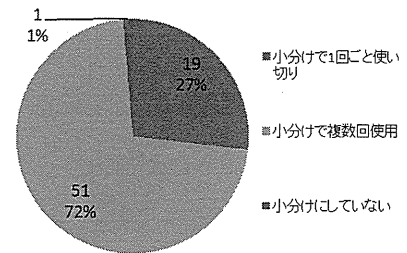


図13 H7検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-4. H1pdm 検出系について

図14 H1pdm検出系 記載マニュアル

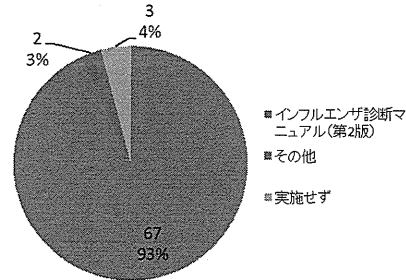


図15 H1pdm検出系  
プライマー、プローブレミックスの有無

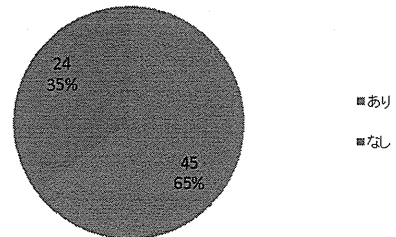


図16 H1pdm検出系  
プライマー、プローブ保存温度

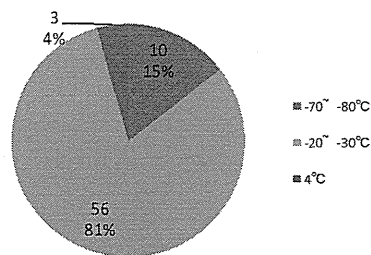
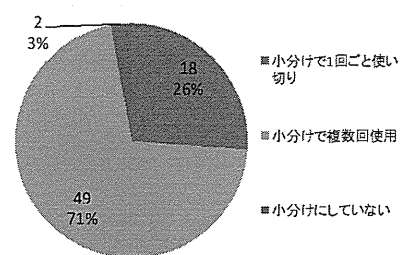


図17 H1pdm検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-5. H3 検出系について

図18 H3検出系 記載マニュアル

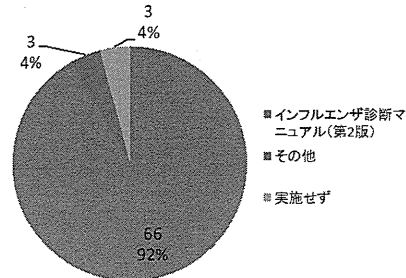
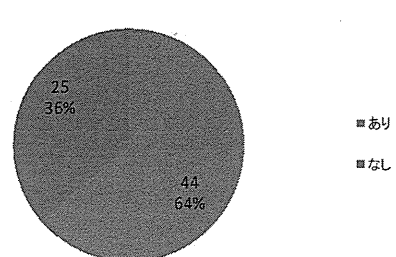


図19 H3検出系  
プライマー、プローブレミックスの有無





(添付資料 8)

図20 H3検出系  
プライマー、プローブ保存温度

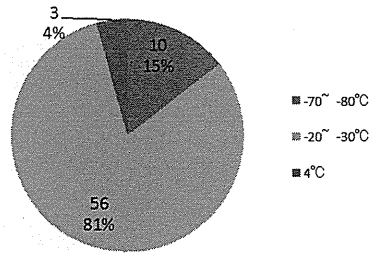
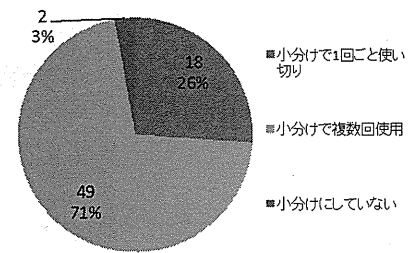


図21 H3検出系  
プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

プライマー、プローブを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ので、小分けにして1回ごとに使い切りをする事をお勧めします。

また、プライマー、プローブプレミックスをあらかじめ作製していない場合には、極少量のプライマーやプローブを微量ピペッターで分取する事になりますので、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ばらつき、同じサンプルであっても検査結果が同じにならない可能性があります。プライマー、プローブのプレミックスをあらかじめ作製し、小分け分注をして自動霜取り機能のない冷凍庫(メディカルフリーザー等)で冷凍保管する事をお勧めします(できれば-70°C以下での保存を推奨します)。

また、H1pdm および H3 検出系において、インフルエンザ診断マニュアル(第2,3版)記載の検出系より以前の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。最近の流行株を検出できるようにするためにも、最新のバージョンの検出系を使用する事をお勧めします。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図22 使用キット名

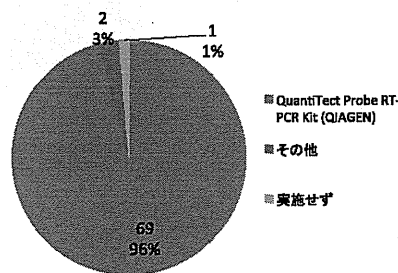
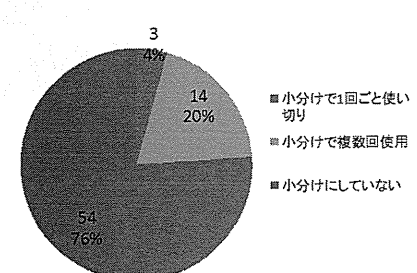


図23 試薬の保存単位



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 に最適化しています。他の試薬を同じ条件で使用した場合、検出感度や特異性が低下する可能性がありますので、反応条件、反応組成の最適化を行っていただく事をお勧めします。

試薬の保存と使用についてですが、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、凍結融解の影響で試薬の劣化による検出感度の低下やコンタミネーションが起きる可能性が高くなりますのでご留意下さい。

4. 陽性コントロールの保管について

4-1. TypeA/H5(マーカ入)の保管について

(添付資料 8)

図24 TypeA/H5(マーカー入)の保管温度

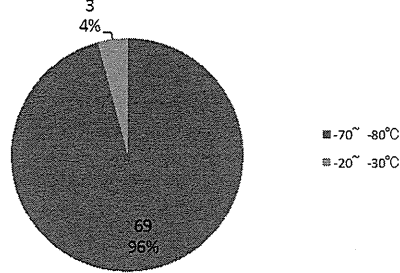
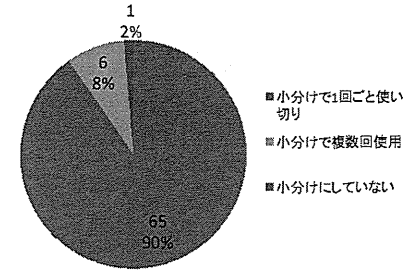


図25 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



4-2. TypeA/H7(マーカー入)の保管について

図26 TypeA/H7(マーカー入)の保管温度

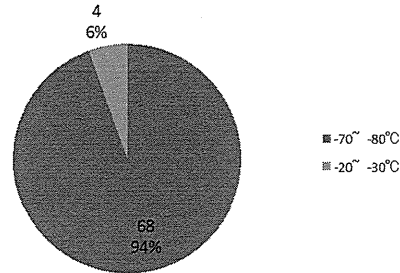
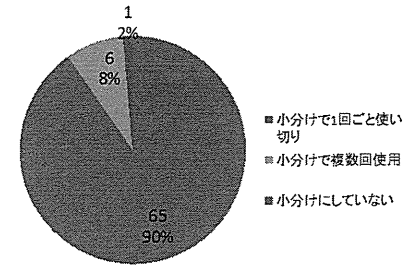


図27 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



4-3. TypeA/H1pdm の保管について

図28 TypeA/H1pdmの保管温度

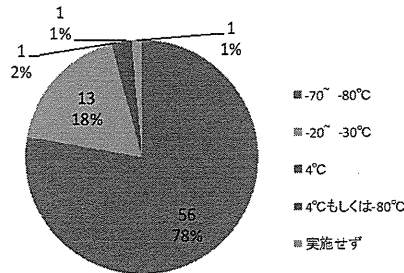
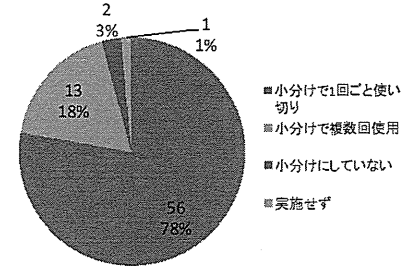


図29 TypeA/H1pdmの保存単位



4-4. TypeA/H3 の保管について

図30 TypeA/H3の保管温度

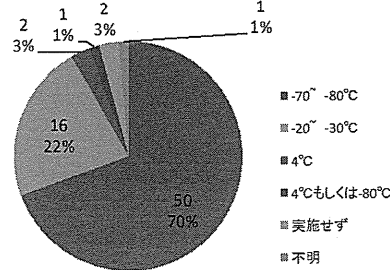
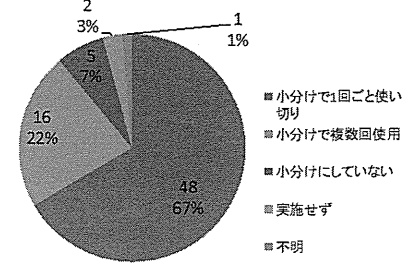


図31 TypeA/H3の保存単位



<コメント>

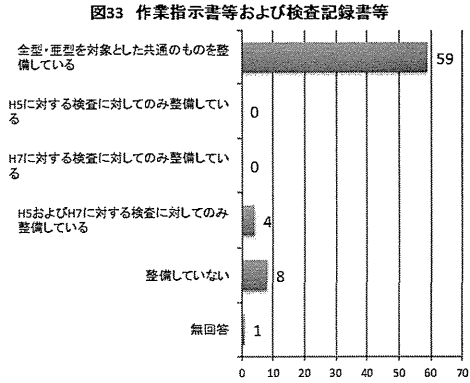
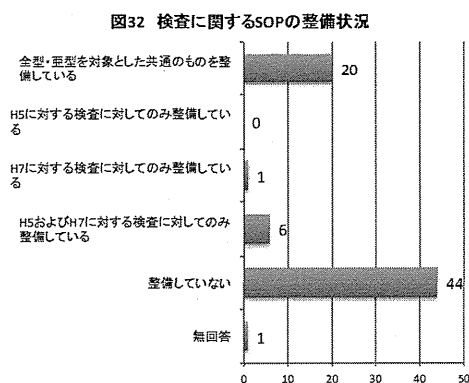
TypeA/H5、TypeA/H7(マーカー入)陽性コントロールは、必ず-70°C以下での保管をお願いいたします

(添付資料 8)

す。また、小分けで複数回使用されている場合、凍結融解による劣化につながる可能性がありますのでご留意下さい。

TypeA/H1pdm、TypeA/H3 陽性コントロール RNA については、保存温度が-20～-30℃や4℃である場合、また、小分けで複数回使用されている場合が多い傾向にありました。一般的に RNA は-70 度以下での保管が推奨されています。TypeA/H1pdm、TypeA/H3 陽性コントロール RNA につきましても、TypeA/H5、TypeA/H7 陽性コントロールと同様の方法で保管する事をお勧めします。

5. 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>

作業指示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一方で、SOP を整備している地衛研は比較的少ない傾向にありました。

6. リアルタイムPCR機について

図34 通常のインフルエンザウイルスの検査で使用しているリアルタイムPCR機の機種 (のべ76機種)

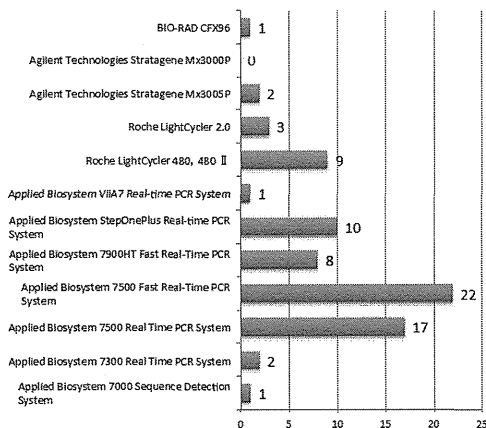
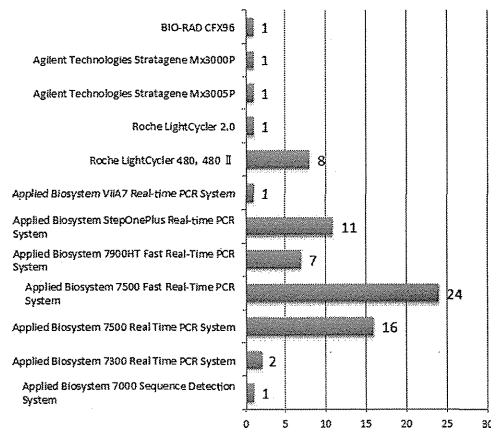


図35 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ74機種)



(添付資料 8)

図36 通常のインフルエンザ検査用機器の台数

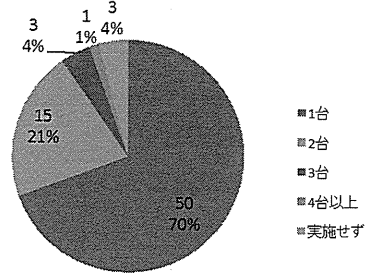


図37 通常検査のバックアップ用機器の台数

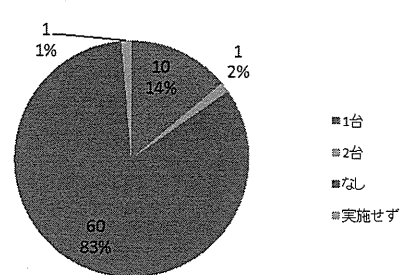
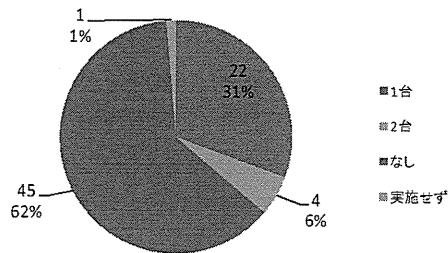


図38 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<コメント>

使用期間の長い装置については、蛍光フィルターの劣化、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事をお勧めします。

ほとんどの地衛研で、今回のEQAを通常のインフルエンザ検査用機器で実施していました。通常検査のバックアップ用機器やパンデミック時用機器についても、通常のインフルエンザ検査用機器と同等の結果が得られることを定期的に確認する事をお勧めします。