

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，  
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

ウイルス性出血熱の検査法に関する研究

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究分担者 下島昌幸

研究要旨：エボラウイルスによるエボラ出血熱など、重篤で高い致死率もたらし承認された予防法や治療法がない病原体はバイオテロに用いられることが懸念される。国立感染症研究所ウイルス第一部ではエボラウイルス等の検出法を準備しているが、その精度や迅速性はバイオテロ発生時の適切な対処に影響すると考えられる。エボラウイルスの遺伝子検出法の迅速性を得るため、conventional RT-PCR で用いていた試薬を最新のものと置き換え、また陽性 RNA コントロールを準備した。これにより conventional RT-PCR の感度の上昇と時間短縮を達することができた。検出法の再評価として GHSAG-LN から提供された Ebola Proficiency Panel-II を用いた外部精度評価 EQA を行なった。11 種のサンプルからなる Ebola Proficiency Panel-II について、国立感染症研究所ウイルス第一部で準備していた conventional RT-PCR, real time RT-PCR, antigen ELISA を用いてエボラウイルスの検出を行なった。11 サンプル中 10 サンプルで正答した。EQA に参加した世界の他のラボで用いている方法や結果を検証したところ、市販キットを用いて完全正答しているラボが多いことが判明した。国立感染症研究所ウイルス第一部で準備しているエボラウイルス検出法がかなり高い水準を持っていることが判明した。市販キットは試薬が揃っており準備が容易であるが、価格が高くバイオテロで多検体を処理しなくてはならないような状況には不向きであり、詳細な塩基配列情報も得られる現行の検査法のほうが適していると判断した。これらの取り組みにより、国立感染症研究所ウイルス第一部で準備していたエボラウイルスの遺伝子検出はその精度と迅速性をより高めることができ、バイオテロ対策の一部ではあるが強固なものとする事ができた。

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

福士秀悦・国立感染症研究所・ウイルス第一部主任研究官

黒須剛・国立感染症研究所・ウイルス第一部主任研究官

谷口怜・国立感染症研究所・ウイルス第一部研究員

A. 研究目的

バイオテロに用いられうる病原体は様々考えられる。目的によって病原体に期待される特徴もいくつかあるであろうが、1) 対象に免疫がない、2) 致死率が高い、3) 人から人へ伝播しやすい、4) 有効な治療法がない等の特徴をもつ病原体はバイオテロに利用されうると

言える。国立感染症研究所ウイルス第一部では国民の健康増進のため、エボラウイルス等のウイルス性出血熱の疑い事例の発生に備え、エボラウイルスやマールブルグウイルス、ラッサウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、南米出血熱等の(感染症法で言う)一種病原体の有無を調べる検査法、またそれらに感染した後に体内に作られる抗体の有無を調べる検査法等を準備している。これらはバイオテロが発生した場合に、用いられた病原体や暴露を受けた人の特定、あるいは隔離すべき人・時期の決定など、バイオテロへの対処方針を判断していくうえでも役立つと考えられる。平成 27 年度には、エボラウイルス(およびマールブルグウイルス)の検出法として準備

していた conventional RT-PCR について、用いる試薬を最新のものにする事で検出に要する時間を短縮できるか検討した。陽性 RNA コントロールを準備し感度の評価を行なった。

平成 28 年度は Global Health Security Action Group-Laboratory Network (GHSAG-LN) より外部精度評価 EQA として提供された Ebola Proficiency Panel-II を用い、この最新試薬による conventional RT-PCR、および他に準備している検査法の real time RT-PCR、Antigen ELISA の更なる評価を行なった。またこの EQA に参加した世界の 106 のラボの結果及び検査法を解析し、今後のエボラウイルス検出の検査法について考慮した。

## B. 研究方法

エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの遺伝子を検出する conventional RT-PCR について、標的としている L および NP 遺伝子の cDNA を pGEM-T ベクターに組み込み、T7 RNA polymerase を用いてそれぞれの遺伝子の RNA を in vitro 合成し陽性 RNA コントロールとした。またこれまで用いていた 2 ステップの RT-PCR (PCR の部分は Roche 社の Expanding High Fidelity PCR System) と、1 ステップの RT-PCR (Invitrogen 社の SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq) を用い、合成した陽性 RNA コントロールの希釈列からのエボラウイルス遺伝子の検出を行なった (図 1 および図 2)。

EQA のサンプルとして、Robert Koch Institute, Bernard Nocht Institute, Philipps University が調製した、陰性コントロール(ウイルスが含まれていないもの)も含む 11 種の不活化サンプルからなる Ebola Proficiency Panel-II を用いた (図 3)。エボラウイルスおよびマールブルグウイルスの遺伝子を検出する conventional RT-PCR としては 1 ステップの SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq によるもの (標的は L 遺伝子および NP 遺伝子、NP 遺伝子では nested も含む) を用

いた。遺伝子が増幅されバンドが検出された場合には塩基配列の決定を行ないウイルス種の同定も行なった。ウイルス遺伝子のコピー数を測定するための real time RT-PCR (標的は L 遺伝子) も行なった。また遺伝子ではなくウイルス蛋白質を検出する antigen ELISA (標的は NP 蛋白質) も行なった。

## 【倫理面への配慮】

倫理面に配慮する状況なし

## C. 研究結果

エボラウイルス(およびマールブルグウイルス)を検出する conventional RT-PCR で、従来は RNA 抽出後結果が得られるまで約 5 時間半が必要であった (図 1)。用いる試薬を変更したところ、結果が得られるまでの時間を約 2 時間 15 分に短縮 (3 時間以上の短縮) することができた (図 2)。この際に遺伝子検出の感度が下がることは無く、L 遺伝子の場合は  $10^5$  レベルから  $10^1$  レベルまで、NP 遺伝子の場合は  $10^4$  レベルから  $10^1$  レベルまで感度が上昇した (図 1 および図 2)。

Ebola Proficiency Panel-II の EQA 結果のまとめを図 3 に示した。

サンプル 11 種のうち、10 種はいずれも conventional RT-PCR で L 遺伝子および (あるいは) NP 遺伝子が陽性となり、塩基配列の決定により近いウイルスの株 (ただし 1 つはエボラウイルスではなく近縁のマールブルグウイルス) を示すことができた。そのうち 5 つはウイルスゲノムのコピー数を決定でき、コピー数が多いものについては antigen ELISA でも陽性となった。この結果を提供元に提出した。

Ebola Proficiency Panel-II の提供元から届いた正答とこの EQA に参加したラボの数と国を図 5 に示した。ラボ名は明らかではないが、南北アメリカ大陸やヨーロッパ、アフリカ大陸の国々からの参加が殆どで、東アジアからの参加は日本の私たちのみであった。結果はリアルタイム PCR における Ct 値 (陽性と判断するサイクル数) あるいは陽性/陰性の形に簡素化され、ほとんどのラボが正しい

結果を得られていた(図6)。匿名化されているとは言え、結果を当てはめるとこのリストの中で私たちは「74a」と表記されているものであった(図7)。1つの間違いがあり、#1のサンプルを Zaire ebolavirus の Mayinga 株と判定していたが、実際にはこれは陰性サンプルであった。Nested PCR (PCR産物を更にPCRにかける操作)を行なう際のコンタミネーションが疑われる。これ以外はウイルス種、ウイルス量、ウイルス株も含め正しい結果が得られており、私たちが準備している遺伝子検出の検査法はおおむね良好と言える。

図4の表から、Ebola Proficiency Panelにおける遺伝子検出に用いた方法(市販のcommercialキットを用いているかそれ以外か)とそれぞれにおける全正答/誤答のラボ数を数えた(図8)。55のラボがcommercialキット、51のラボがin-houseの手法により今回のEQAに取り組んでいた。すべて正答した率はcommercialキットで78%、in-houseで69%と前者の方が高かった。私たちのin-houseの結果がおおむね良好とはいえ1つの誤答があったことを考慮すると、commercialキットによる検査法の運用ということも体制として考えられる。Commercialキットがどのメーカーによるものかも明らかにされていないが、例えば西アフリカにおけるエボラ出血熱の大流行時にWHOより診断での緊急使用許可が得られたRealStar Filovirus Screen RT-PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics)あるいはRealStar Filovirus Type RT-PCR kit 1.0(同社)が考えられる。本キットは24検体分で約27万円と高価格で、リアルタイムによる遺伝子検出で短時間によるウイルス種も判定可能であるが、塩基情報は得られない。検出の感度も疑問視されている。バイオテロにエボラウイルスが利用された場合、多くの検体を処理する必要が大きいことからあまり高価格であると検査に支障をきたす。また塩基情報が得られればウイルスの由来を推測しテロ対策に役立てられる。これらを考慮するとバイオテロ対策としては、市販キットは不向きと考えられ、検査法の切り替

え等は必要なく、既に準備している検査法をより一層注意深く実施すれば良いと判断した。

#### D. 考察

国立感染症研究所ウイルス第一部で準備しているエボラウイルスの検出法 (conventional RT-PCR, real time RT-PCR, antigen ELISA)の精度、迅速性はより高められ、バイオテロ発生時の検査法として用いることは適切であると考えた。

#### E. 結論

国立感染症研究所ウイルス第一部で準備しているエボラウイルスの検出法を改善しその有用性を確認した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Taniguchi S, Fukuma A, Tani H, Fukushi S, Saijo M, Shimojima M. A neutralization assay with a severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strain that makes plaques in inoculated cells. *J Virol Methods*. 2017 Jan 9. pii: S0166-0934(16)30587-0.
- 2) Yoo JR, Heo ST, Park D, Kim H, Fukuma A, Fukushi S, Shimojima M, Lee KH. Family Cluster Analysis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection in Korea. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Dec 7;95(6):1351-1357.
- 3) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Yang M, Sugamata M, Morikawa S, Saijo M. Serologic assays for the detection and strain identification of Pteropine orthoreovirus. *Emerg Microbes Infect*. 2016 May 11;5:e44. doi: 10.1038/emi.2016.35.
- 4) Kurihara S, Satoh A, Yu F, Hayasaka D, Shimojima M, Tashiro M, Saijo T,

- Takazono T, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yanagihara K, Mukae H, Saijo M, Morita K, Kohno S, Izumikawa K. The world first two cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome: An epidemiological study in Nagasaki, Japan. *J Infect Chemother.* 2016 Jul;22(7):461-5. doi: 10.1016/j.jiac.2016.04.001.
- 5) Kitao A, Ieki R, Takatsu H, Tachibana Y, Nagae M, Hino T, Nakaji H, Shimojima M, Saijo M, Okayama M, Kenzaka T. Severe fever with thrombocytopenia syndrome presenting as hemophagocytic syndrome: two case reports. *Springerplus.* 2016 Mar 22;5:361. doi: 10.1186/s40064-016-2010-2.
  - 6) Suda Y, Fukushi S, Tani H, Murakami S, Saijo M, Horimoto T, Shimojima M. Analysis of the entry mechanism of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, using a vesicular stomatitis virus pseudotyping system. *Arch Virol.* 2016 Jun;161(6):1447-54. doi: 10.1007/s00705-016-2803-1.
  - 7) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Reverse Genetics for Fusogenic Bat-Borne Orthoreovirus Associated with Acute Respiratory Tract Infections in Humans: Role of Outer Capsid Protein C in Viral Replication and Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2016 Feb 22;12(2):e1005455. doi: 10.1371/journal.ppat.1005455.
  - 8) Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Aiko Fukuma, Satoshi Taniguchi, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo. Characterization of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein-mediated entry. *Journal of Virology.* (2016). 90: 5292-5301. doi: 10.1128/JVI.00110-16.
  - 9) Fukuma A, Fukushi S, Yoshikawa T, Tani H, Taniguchi S, Kurosu T, Egawa K, Suda Y, Singh H, Nomachi T, Gokuden M, Ando K, Kida K, Kan M, Kato N, Yoshikawa A, Kitamoto H, Sato Y, Suzuki T, Hasegawa H, Morikawa S, Shimojima M, Saijo M. Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Antigen Detection Using Monoclonal Antibodies to the Nucleocapsid Protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Apr 5;10(4):e0004595.
  - 10) Singh H, Morita T, Suzuki Y, Shimojima M, Le Van A, Sugamata M, Yang M. High sensitivity, high surface area Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Biomed Mater Eng.* 2015;26(3-4):115-27. doi: 10.3233/BME-151561.
  - 11) Kaneyuki S, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Taniguchi S, Fukuma A, Shimojima M, Kurosu T, Morikawa S, Saijo M. Ulcerative lesions with hemorrhage in a patient with severe fever with thrombocytopenia syndrome observed via upper gastrointestinal endoscopy. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Jan 8.
  - 12) Tani H, Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Suzuki T, Nagata N, Hasegawa H, Kawai Y, Uda A, Morikawa S, Shimojima M, Watanabe H, Saijo M. Efficacy of T-705 (Favipiravir) in the Treatment of Infections with Lethal Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus. *mSphere.* 2016 Jan 6;1(1). pii: e00061-15.
  - 13) Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. Singh H, Shimojima M, Ngoc TC, Quoc Huy NV, Chuong TX, Le Van A, Saijo M, Yang M, Sugamata M. *J Med Virol.* 2015 Dec;87(12):2145-8. doi: 10.1002/jmv.24274. Epub 2015 Jun 2.
  - 14) Harpal Singh, Kazuhiro Morioka, Masayuki Shimojima, Le Van An, Hizuru Nakajima, Akihide Hemmi, Katsumi Uchiyama, Shih Keng Loong, Sazaly AbuBakar, Ming

- Yang, Masami Sugamata. A Handy Field Portable ELISA-system for Rapid Onsite Diagnosis of Infectious Diseases. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.417
- 15) Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma and Masayuki Saijo. Combination effects of ribavirin and interferons on severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection. *Virology Journal* (2015) 12:181. DOI 10.1186/s12985-015-0412-3
  - 16) Harpal Singh, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kobayashi, Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Ming Yang, Masami Sugamata, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo. Rapid whole genome sequencing of Miyazaki-Bali/2007 Pteropine Orthoreovirus by modified rolling circular amplification with adaptor ligation - next generation sequencing. *Scientific Reports*. 2015 Nov 12;5:16517. doi: 10.1038/srep16517.
  - 17) Singh H, Shimojima M, Ngoc TC, Quoc Huy NV, Chuong TX, Le Van A, Saijo M, Yang M, Sugamata M. Serological evidence of human infection with Pteropine orthoreovirus in Central Vietnam. *J Med Virol*. 2015 Dec;87(12):2145-8. doi: 10.1002/jmv.24274. Epub 2015 Jun 2.
  - 18) Fukuma A, Tani H, Taniguchi S, Shimojima M, Saijo M, Fukushi S. Inability of rat DPP4 to allow MERS-CoV infection revealed by using a VSV pseudotype bearing truncated MERS-CoV spike protein. *Arch Virol*. 2015 Sep;160(9):2293-300. doi: 10.1007/s00705-015-2506-z. Epub 2015 Jul 4.
  - 19) Shinohara N, Matsumoto C, Chatani M, Uchida S, Yoshikawa T, Shimojima M, Satake M, Tadokoro K. Efficacy of the Mirasol pathogen reduction technology system against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV). *Vox Sang*. 2015 Jun 1. doi: 10.1111/vox.12305. [Epub ahead of print]
  - 20) Singh H, Shimojima M, Fukushi S, Le Van A, Sugamata M, Yang M. Increased sensitivity of 3D-Well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for infectious disease detection using 3D-printing fabrication technology. *Biomed Mater Eng*. 2015 Aug 17;26 Suppl 1:S45-53. doi: 10.3233/BME-151288.
  - 21) Singh H, Shimojima M, Shiratori T, An le V, Sugamata M, Yang M. Application of 3D Printing Technology in Increasing the Diagnostic Performance of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Infectious Diseases. *Sensors (Basel)*. 2015 Jul 8;15(7):16503-15. doi: 10.3390/s150716503.
- ## 2. 学会発表
- 1) Kuroasu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 23, 2016, Sapporo (W1-6-10)
  - 2) Kawachi K, Tani H, Shimojima M, Fukushi S, Kurosu T, Kamitani W, Saijo M. Determination of the amino acid residue important for fusion of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (W2-2-12)
  - 3) Shinomiya H, Kimura T, Fukuma A, Shimojima M, Yamashita Y, Mizota F, Yamashita M, Otsuka Y, Kan M, Saijo M. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus antibodies in SFTS endemic areas of Ehime prefecture, Japan. The 64th Annual Meeting of the

- Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (W2-2-15)
- 4) Egawa K, Shimojima M, Taniguchi S, Nagata N, Tani H, Yoshikawa T, Kurosu T, Fukushi S, Saijo M. Pathogenicity of human-origin Pteropine orthoreovirus (PRV) and bat-origin PRV in BALB/c mice. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-3-07)
  - 5) Kawagishi T, Kanai Y, Tani H, Shimojima M, Saijo M, Matsuura Y, Kobayashi T. Nelson Bay Orthoreovirus S1 gene segment determines strain-specific differences in viral infectivity and pathogenesis. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-3-09)
  - 6) Shiota T, Li T, Yoshizaki S, Nishimura Y, Shimizu H, Shimojima M, Saijo M, Wakita T, Ishii K. Molecular characterization of the hepatitis E virus receptor candidate. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-5-07)
  - 7) Fukushi S, Fukuma A, Tani H, Kurosu T, Taniguchi S, Egawa K, Shimojima M, Shirato K, Mastuyama S, Sentsui H, Saijo M. Vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detecting MERS-CoV neutralizing antibody responses. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 25, 2016, Sapporo (W3-6-09)
  - 8) Watanabe S, Edenborough K, Tachedjian M, Todd S, Klein R, Shimojima M, Marsh G. Establishment of an efficient reverse genetics system for Nipah virus Bangladesh strain. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-087)
  - 9) Shimojima M, Suda Y, Dowall S, Horimoto T, Saijo M, Hewson R. Development of a novel diagnostic assay using VSV for detection of neutralizing activity to CCHFV. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-100)
  - 10) Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Fukushi S, Kurosu T, Koyama Y, Uda A, Morikawa S, Komeno T, Nakajima N, Furuta Y, Shimojima M, Saijo M. Therapeutic effects of favipiravir (T-705) against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in a mouse lethal model. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Oct 24, 2016, Sapporo (P2-106)
  - 11) 渡辺俊平, 下島昌幸, Glenn A. Marsh ニパウイルス, バングラディッシュ株の組換えウイルス作出系の確立 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年9月7日, 藤沢
  - 12) 江川和孝, 下島昌幸, 谷口怜, 永田典代, 谷英樹, 黒須剛, 吉河智城, 福士秀悦, 西條政幸 BALB/c マウスにおけるヒト由来およびコウモリ由来プテロパインオルソレオウイルスの病原性解析 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年9月6日, 藤沢
  - 13) Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shuetsu Fukushi, Tomoki Yoshikawa, Satoshi Taniguchi, Aiko Fukuma, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo: Analyses of cell entry and fusion mechanisms of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. XVIth International Conference on Negative Strand Viruses. Italy, 14-19 June 2015.
  - 14) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo: Development of nucleocapsid protein monoclonal antibody based antigen-capture ELISA for detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus.

XVIth International Conference on  
Negative Strand Viruses. Italy,  
14-19 June 2015.

- なし
- 2. 実用新案登録  
なし
- 3. その他  
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得

## コンベンショナルRT-PCR (Two stepの従来法)を用いた エボラウイルス遺伝子検出の検討

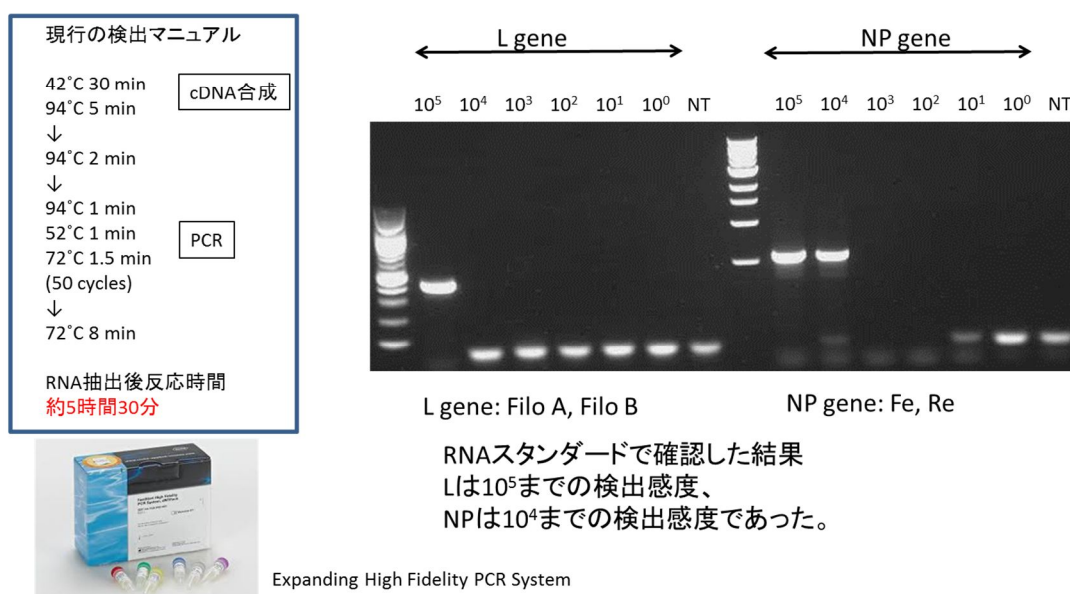


図1. 従来のエボラウイルス遺伝子検出の conventional RT-PCR

## コンベンショナルRT-PCR (One step)法を用いた エボラウイルス遺伝子検出の検討

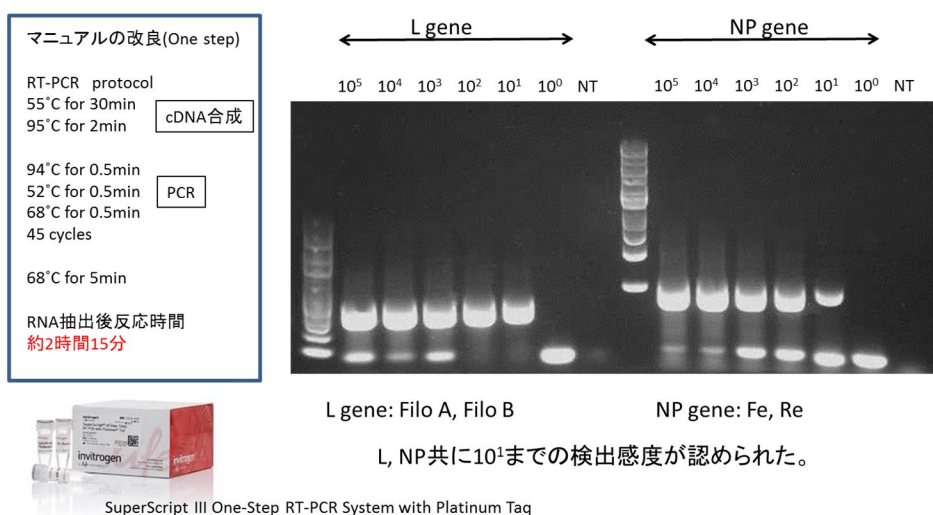


図2. 改良版のエボラウイルス遺伝子検出の conventional RT-PCR





## Proficiency panel - II for Ebola virus PCR diagnostics

To whom it may concern:

2015-05-12

Dear colleagues,

The first Ebola panel we produced at the Robert Koch Institute (RKI) in the autumn 2014 has long been exhausted due to high demand. We are pleased that we can now send the new proficiency panel which has also been developed in close collaboration with the Bernhard-Nocht Institute for Tropical Medicine (BNI) in Hamburg and the Philipps University of Marburg. Without their support preparation of this proficiency panel would not have been possible. This new "Ebola Panel – II" is similar, but **NOT identical** to the previous Ebola panel.

Again we have prepared panels of 11 freeze dried samples for PCR evaluation with different Ebola virus strains including negative controls. The samples should be analysed for the presence of Ebola virus genome, preferably also genome copy numbers should be determined.

**All material was thoroughly analysed for absence of infectivity after inactivation by heat and gamma irradiation. According to the inactivation procedures used, we are sure to provide you with safe and non-biohazard material. Nevertheless, all material should be handled with care like all human specimens.**

Samples have been diluted in stabilisation buffer prior to aliquoting & freeze drying. **Therefore each sample must be resolved by carefully adding 100µl bi.dest. water before use and the entire sample should be used for analysis.**

For analysis you should handle resolved samples just like you would handle a regular serum sample. In case your kit requires a higher volume please fill up with buffer. But please consider this dilution step for reporting the result.

If you still have questions do not hesitate to contact me or the German contact of the GHSAG Laboratory Network Livia Schünadel (Schuenadel@rki.de).

Best regards,

Andreas



図 3. エボラウイルス検出の検査法で用いたサンプルの Ebola Proficiency Panel-II

Sample No.	Results of Ebola virus PCR diagnostic	Copy numbers (Log <sub>10</sub> )/mL	Comments	Sequence	Ag-ELISA
1	EBOV		Conv. PCR NP (+)	Mayinga	
2	EBOV	3.9	Conv. PCR Filo A/B (+) NP (+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	
3	EBOV	4.6	Conv. PCR Filo A/B (+) NP (+), Real-time PCR (+)	Gabon 2003	80
4	EBOV		Conv. PCR NP (+)	Gabon 2003	
5	EBOV		Conv. PCR Filo A/B (+)	Gabon 2003	
6	EBOV	4	Conv. PCR Filo A/B (+) NP (+), Real-time PCR (+)	Gabon 2003	10
7	EBOV	4.3	Conv. PCR Filo A/B (+) NP (+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	10
8	EBOV	4.7	Conv. PCR Filo A/B (+) NP (+), Real-time PCR (+)	GIN/2014/Makona-C15	80
9	EBOV		Conv. PCR Filo A/B (+)	Gabon 2003	
10	MARV		Conv. PCR Filo A/B (+)	MARV, Lake Vivtoria	
11	Negative				

図 4. Ebola Proficiency Panel-II の結果



# Ebola Proficiency Panel-II (GHSAG-LN) 提供元からの返信

- Panel構成
  - Zaire ebolavirus 2 strainsの希釈列
  - Marburgvirus 1つ
  - Negative 2つ

EBOV Panel composition

	Sample N°										
Panel-1	#3	#6	#9	#4	#5	#8	#7	#2	#10	#1	#11
Panel-2	#3	#6	#9	#5	#4	#8	#7	#2	#10	#1	#11
Virus	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire	Ebola-Zaire / Guéckédou	Ebola-Zaire / Guéckédou	Ebola-Zaire / Guéckédou	Marburg	neg.	neg.
Dilution	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>		

Sensitivity
Reproducibility/Specificity
Specificity
Contamination

- 参加したラボ数106

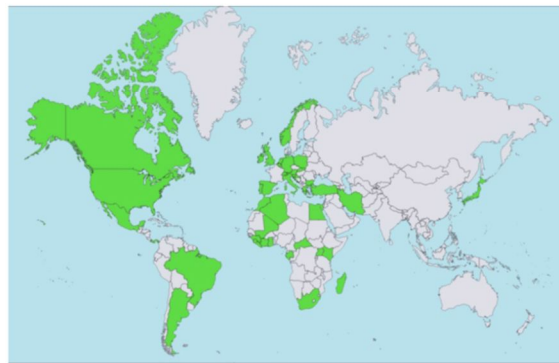


図5. Ebola Proficiency Panel-IIの正答と参加ラボ

# Ebola Proficiency Panel-II (GHSAG-LN) 提供元からの返信

- 106のラボ名は匿名化
- 結果はCt値またはpos/neg
- 表の色
  - 緑は正答(濃淡はPanel I/IIの違い)
  - 赤: 高ウイルス量のサンプルをnegと誤答あるいはnegのサンプルをposと誤答
  - オレンジ: 中ウイルス量のサンプルをnegと誤答

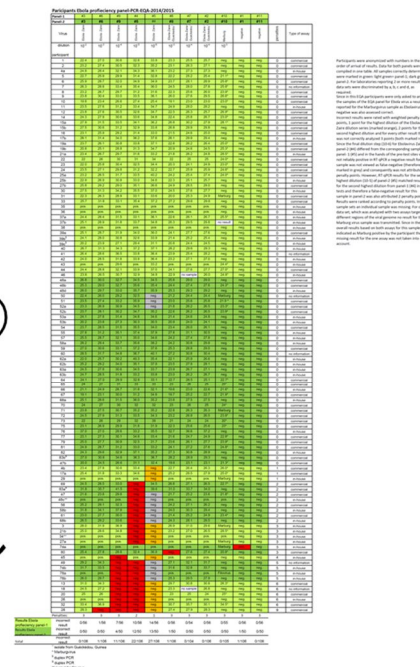


図6. 参加ラボの結果

# Ebola Proficiency Panel-II (GHSAG-LN)

## 提供元からの返信

Participants Ebola proficiency panel-PCR-EQA-2014/2015

Panel-1	#3	#6	#9	#4	#5	#8	#7	#2	#10	#1	#11		
Panel-2	#3	#6	#9	#5	#4	#8	#7	#2	#10	#1	#11		
Virus	Ebola Zaire	Ebola Zaire	Ebola Zaire	Ebola Zaire	Ebola Zaire	Ebola Zaire / Gueckedou	Ebola Zaire / Gueckedou	Ebola Zaire / Gueckedou	Marburg	negative	negative	penalties	Type of assay
dilution	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>				
participant													
21b	25.0	28.6	34.8	neg	neg	23.2	27.0	26.5	28.5*	neg.	neg.	3	in-house
34**	pos.	pos.	pos.	neg	neg	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	3	in-house
27a	pos.	pos.	pos.	neg	neg	pos.	pos.	pos.	Marburg	neg.	neg.	3	in-house
74a	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	Marburg	pos.	neg.	3	in-house
80	25.4	27.8	28.8	32.4	36.9	neg	27.6	27.4	20.8*	neg.	neg.	3	commercial
45	pos.	pos.	neg	pos.	neg	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	neg.	4	in-house
49	29.2	34.3	neg	neg	neg.	27.1	32.1	31.7	neg.	neg.	neg.	5	no information



- #1のサンプルを我々はposと判定している → そのような結果を出したラボは1つのみ → 74aが我々と判明
- (表にはないが) 配列も決定しており、#1以外の結果は良好

図7. 国立感染症研究所ウイルス第一部による結果の判定

ラボ数	Commercial	Commercial以外 (In-houseかNo information)	計
すべて正答	43	35	78
誤答あり	12	16	28
計	55	51	106

図8. 106のラボで用いられた遺伝子検出の方法と正答/誤答について