

平成26年7月14日 佐多 班会議

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) 外部精度管理(EQA)について

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

影山 努

2014, 89, 37-44 No. 475

World Health Organization
Weekly epidemiological record
Relevé épidémiologique hebdomadaire

Organisation mondiale de la Santé 24 JANUARY 2014, 89th YEAR / 24 JANVIER 2014, 89^e ANNÉE
No. 475, 2014, 89, 37-44
<http://www.who.int/wer>

Contents

37 Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013

Sommaire

37 Récapitulatif de l'évaluation externe de la qualité de la détection des virus grippaux de type A par amplification génique, 2013

Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013

Introduction

Global influenza virological surveillance has been conducted through the WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) for over 60 years. Currently 141 institutions in 111 Member States are recognized by WHO as National Influenza Centres (NICs). The laboratory network also comprises 6 WHO Collaborating Centres, 4 WHO Essential Regulatory Laboratories and ad

Récapitulatif de l'évaluation externe de la qualité de la détection des virus grippaux de type A par amplification génique, 2013

Introduction

Depuis plus de 60 ans, le Système mondial OMS de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS) assure la surveillance virologique de la grippe au niveau mondial. On compte actuellement dans 111 États Membres 141 institutions reconnues par l'OMS comme Centres nationaux de la grippe (NICs). Le réseau de laboratoires comprend aussi 6 centres collaborateurs de l'OMS, 4 Laboratoires essentiels de réglementation et des groupes spéciaux mis en

Table 1. Panel composition and results of the WHO external quality assessment programme of National Influenza Centres and other laboratories for detection of influenza A and B viruses, panel 12 (2013).

Tableau 1. Composition de la série et résultats de l'évaluation externe de la qualité de la détection des virus grippaux A et B par les centres nationaux de la grippe et autres laboratoires, 12^e série (2013).

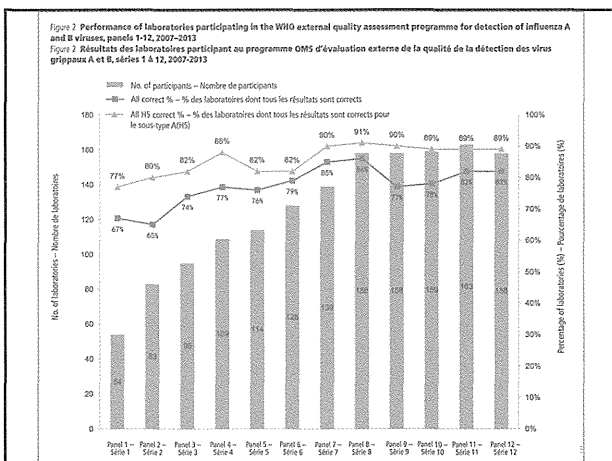
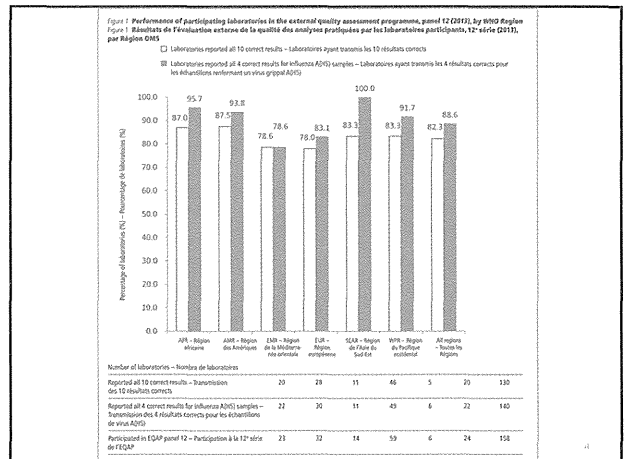
Influenza viruses - Virus grippaux	Strain/Clade* - Souche/Clade*	Sample number - Numéro de l'échantillon	Copies/µl ^b - Copies/µl ^b	No. (%) of laboratories correctly identifying sample (n=152) - Nombre (%) de laboratoires identifiant correctement l'échantillon (n=152)
A/IS05/11	2.1.1	V01-2013	7.62	145 (95.4)
A/IC/10/11	2.1.1	V04-2013	7.27	144 (95.4)
A/IS/11/11	2.1.1	V05-2013	1.13-1.1 ^c	153 (96.7)
A/IS/11/11	2.1.1	V10-2013	9.21-1.0 ^c	152 (96.2)
A/WH/10/2009 ^d	A/California/7/2009 like virus - Virus analogues à A/California/7/2009	V09-2013	6.81-1.0 ^c	154 (97.5)
A/WH/10/2009	A/Victoria/361/2011 like virus - Virus analogues à A/Victoria/361/2011	V07-2013	3.79-1.0 ^c	155 (98.1)
A/WH/10/2009	A/Hong Kong/193/2009	V06-2013	8.63	153 (96.2)
Influenza B - Grippe B	B/ribnane/50/2009 like (Victoria) (Brisbane/10/2009) like (Victoria)	V02-2013	6.94-1.0 ^c	153 (96.8)
Influenza B - Grippe B	B/Wisconsin/1/2010 like (Dinagata) (Brisbane/10/2009) like (Victoria)	V08-2013	3.68-1.0 ^c	151 (95.6)
Negative - Négatif	NA - NA	V03-2013	NA - NA	154 (97.5)

* The nomenclature of A/IS05/11 was based on the HA gene. For additional information, see http://www.who.int/influenza/laboratory_faq_influenza_a_virus. A/IS05/11 was based on the HA gene. For additional information, see http://www.who.int/influenza/laboratory_faq_influenza_a_virus.

^b Reported by real-time RT-PCR. A range of sample concentrations was used. ^c Mean and SD in sample used after 3 days of contamination at 22°C until 21°C.

^d With nucleotide change detected (S223L) in the HA gene and substitution associated with highly reduced transmissibility (observed by co-culture) - Avec détection de la modification nucléotidique (S223L) sur le gène HA associée à une réduction de la transmission (observée par co-culture).

NA, Not applicable - SC, Same origin.



WHOのEQA

- 各国地域のNICが対象
- 不活化ウイルス10サンプル
- ウイルスRNAの検出および型・亜型同定を行う
- 薬剤耐性株のスクリーニング
- 検査方法の指定はない(WHOマニュアル、in house、市販キット、CDCキット、etc.)
- 問題があるかどうかを把握できるが、トラブルシューティング(原因の特定は難しい)

EQAの意義について

データに関する信頼性の維持・向上のための品質保証体系で基本的には誤差要因の解析とそれを取り除くことを目的とする。

- 検査精度の客観的な評価
- トラブルシューティング
- 検査精度の向上

(検査成績のランク付けが目的ではない)

新型インフルエンザ対策行動計画の改定について

◆背景・目的

平成21年に発生した病原性の低い新型インフルエンザ(A/H1N1)への対応を通じて得られた多くの貴重な知見や教訓を踏まえるとともに、病原性の高い新型インフルエンザが発生した場合でも適切な対応が図れるよう新型インフルエンザ対策行動計画の改定が行われた。

◆検討経緯

2010年 6月10日 新型インフルエンザ(A/H1N1)対策総括会議 報告書 公表
2011年 2月28日 新型インフルエンザ専門家会議 見直し意見 公表
2011年 8月15日 新型インフルエンザ及び鳥インフルエンザ等に関する関係省庁対策会議(局長級) 改定案決定
2011年 9月20日 新型インフルエンザ対策関係会議
(新型インフルエンザ対策閣僚会議において新型インフルエンザ対策行動計画の改定を決定)

「新型インフルエンザ対策行動計画」の改訂 (平成23年9月20日)

5.サーベイランスに関するガイドライン(新設)について ウ.新型インフルエンザ発生時に強化するサーベイランス

(イ)ウイルスサーベイランス

① 目的

新型インフルエンザ発生時には、平時から行うウイルスサーベイランスに加え、患者発生サーベイランスにおける全数把握患者及び学校サーベイランス等でのウイルス検査を実施することで、インフルエンザウイルスの型・亜型、抗原性、抗インフルエンザウイルス薬への感受性等を調べることで、診断・治療等に役立てる。

② 実施方法

患者発生サーベイランスにおける全数把握患者及び学校サーベイランス等でのウイルス検査を原則として地方衛生研究所にて実施する。検査する検体数については、地域の実情に応じて可能な限りにおいて行う。

6.医療体制に関するガイドラインについて

(1)発生前から進めるべき医療体制の整備

ウ. 検査体制の整備

(ア)検査体制の整備

- 国は、新型インフルエンザに対する迅速診断キットの開発を支援する。
- 国は、都道府県等に対し、地方衛生研究所における新型インフルエンザに対するPCR検査等を実施する体制を整備するよう要請し、その技術的支援を行う。

精度管理

内部精度管理
(施設内精度管理)
Internal Quality Control (IQC)

施設内部で精度管理を行うこと

標準試料(既知濃度)を用いた繰り返し測定によって測定値が許容範囲に含まれているかどうかを確認する

外部精度評価
(施設間精度管理)
External Quality Assessment (EQA)

他施設と比較して検査技術・正確度を評価すること

個々の検査施設を対象に共通条件のもとに広域で測定結果を調査する

リアルタイムRT-PCR法を用いた インフルエンザウイルス核酸検出検査の精度管理

- 検体からのRNA抽出について(試薬・方法)
- rRT-PCRについて(試薬・装置)
- rRT-PCRの検出感度・特異性について
- 検査室で生じる問題(操作ミス・コンタミ・記載ミス、技量の違いなど)
- 検査結果の解釈の違いなど

M遺伝子:A型
NS遺伝子:B型
HA遺伝子:H1, H1pdm, H3, H5, H7
(Primer/Probe配列、反応試薬は共通)

目次

インフルエンザ診断マニュアル (第2版)

(平成24年3月)

Part 1 インフルエンザおよびインフルエンザウイルス検査法の概要	4
1. 概要	4
2. 対応しているインフルエンザウイルス	4
3. 臨床検査	5
4. 検査の進め方	5
Part 2 ウイルス分離と培養	6
1. インフルエンザウイルス分離のための臨床検体	6
2. ウイルス分離検体の検出と検出	8
3. 培養検体を用いたインフルエンザウイルスの分離	8
4. 顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの検出	13
5. 免疫検疫法(ELISA)によるインフルエンザウイルス検体の検出	17
6. ウイルス遺伝子増幅法によるインフルエンザウイルスの検出	23
7. 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検出	34
Part 3 インフルエンザウイルスの遺伝子解析	39
1. 遺伝子解析の方法	39
2. GISAID (Global Influenza Surveillance and Data) による遺伝子解析	47
Part 4 インフルエンザウイルスの検査	51
1. 検査に際しての検体の採取	51
2. ウイルス学的検査による検査の手続き	53
Part 5 最新のインフルエンザウイルスの検出	59
1. 最新鋭検査法の概要	59
A. NA遺伝子またはM遺伝子のリアルタイムPCRによる検出	59
B. Real-time RT-PCR法によるH2N3変異の検出	61
2. 最新鋭検査法の概要	65
A. M2NA遺伝子を用いた検査法	65
B. NA遺伝子を用いた検査法	66

目次

高病原性鳥インフルエンザ 診断マニュアル (第3版)

(平成24年3月)

Part 1 高病原性鳥インフルエンザの概要	3
1. 高病原性鳥インフルエンザの概要	3
2. 検査の手続き	4
3. 検体の採取と検出について	4
Part 2 ウイルス検査	12
1. インフルエンザウイルス検査のための検体の採取	12
2. ウイルス検査の検出と検出	12
3. 顕微鏡を用いたウイルス検査の概要	12
4. ウイルス遺伝子増幅法によるH5N1ウイルスの検出	12
5. ウイルス遺伝子増幅法によるH5N1ウイルスの検出	13
1. 遺伝子増幅法(PCR)による検出	13
2. Conventional RT-PCRによる検出	19
6. 検出されたウイルスの遺伝子解析	23
7. 遺伝子解析の方法	23
8. 遺伝子解析の結果の報告	24
9. 遺伝子解析の結果の報告	21
検査結果	30
検査の手続き	30

検査の手続きの変更
・リアルタイムRT-PCR法によるH5N1ウイルスの検出について、検出されたウイルスの遺伝子解析を省略した。

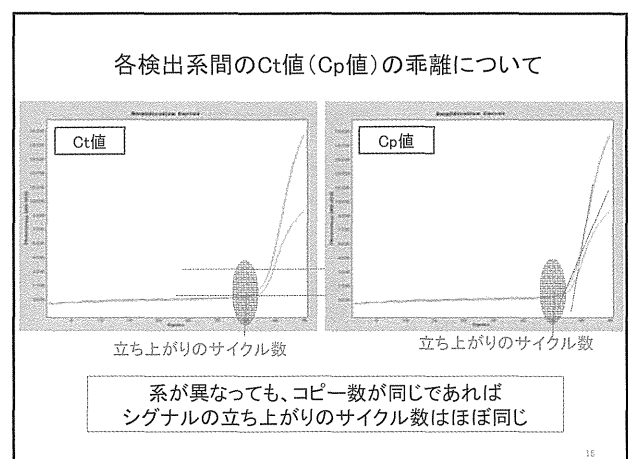
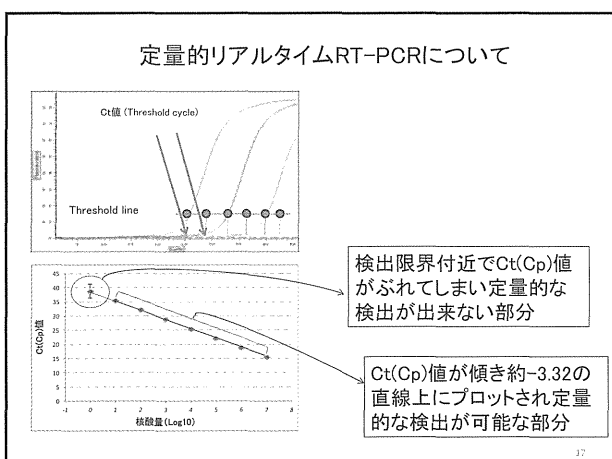
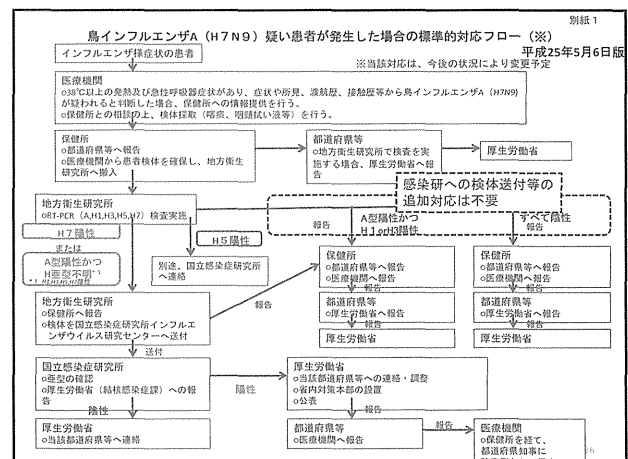
目次

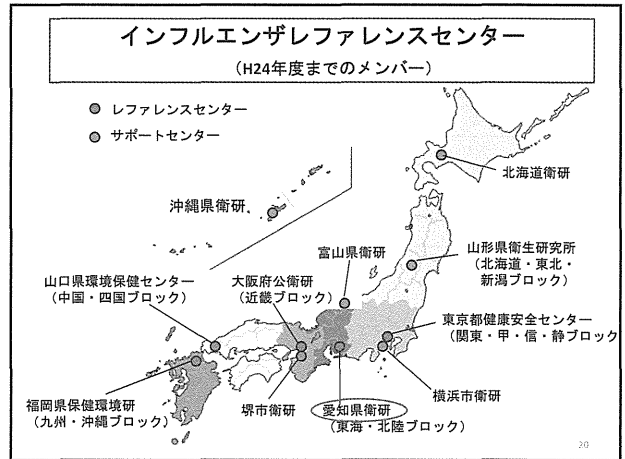
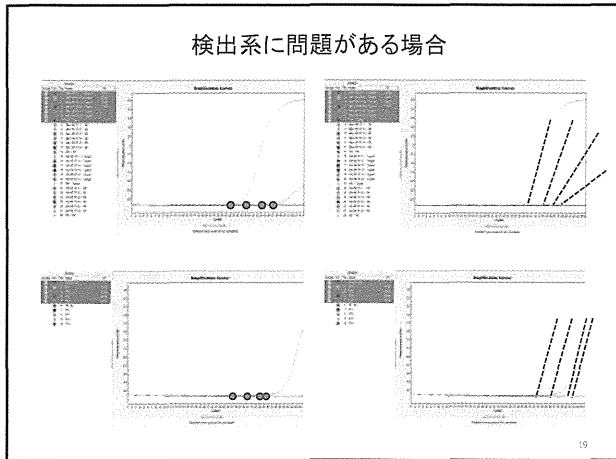
鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス 検出マニュアル (第2版)

(平成25年6月更新)

1. 臨床検体またはウイルス培養検体のRNAの抽出(※)	3
2. リアルタイム RT-PCR法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの検出	4
3. Conventional PCR法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの検出	8
4. 検出されたH7N9ウイルスの遺伝子解析(※)の概要・検出について	11
5. RT-LAMP法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの検出方法(※)	13

※1. 検出されたH7N9ウイルスの遺伝子解析(※)の概要・検出について
※2. Conventional PCR法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの検出方法(※)
※3. RT-LAMP法による鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルスの検出方法(※)





これまでのEQAについて

年月	参加地衛研	パネル
～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール

実施要項

- 実施スケジュール
・測定期間： パネル検体到着日～平成23年9月30日
- パネル検体
 - ① 亜型同定用RNA: 未知濃度のウイルスRNA 7検体
 - ② 不活化ウイルス: 濃度の異なるA/California/7/2009ワクチン株2検体
陰性検体 1検体
 - ③ 標準RNA: A/H5N1 CL2.3.2北海道株由来RNA

他、標準RNA希釈用に希釈用チューブ、希釈用蒸留水、チップ (P200用: MBP社 ARTフィルターチップ ART 200U を1箱(96本入り)) を配布
- パネル検体到着時の注意事項
輸送容器からパネル検体を取り出す際は、ドライアイスの残存および検体の凍結状態を確認し、検体が融解しないように素早く-70度以下に保存。検体到着時の状況及び保管状況は「アンケート記入シート」に入力。
- 各地衛研で行っている試験方法等についてをアンケートに回答。

各パネル検体を11カ所のコア・サポート地衛研に配布

実施方法

- ① (未知濃度のウイルスRNA 7検体)に対する亜型同定検査を各地衛研のSOPに従って実施し、各検体のCt(Cp)値の算出し、亜型同定を行う。
- ② (不活化ウイルス)より、各地衛研のSOPに従ってRNAの抽出を行い、抽出したRNAを用いて、Type A(M遺伝子)およびH1pdm09 (HA遺伝子)のCt(Cp)値の算出を行う。
- ③ (標準RNA)より10倍階段希釈液の作製を行い、各地衛研のSOPに従ってType A(M遺伝子)およびH5亜型(HA遺伝子)の検出を行い、各希釈列のCt(Cp)値の算出を行う。

参加地衛研数: 11
のべ検査回数: 27 (最小1回、最大6回)

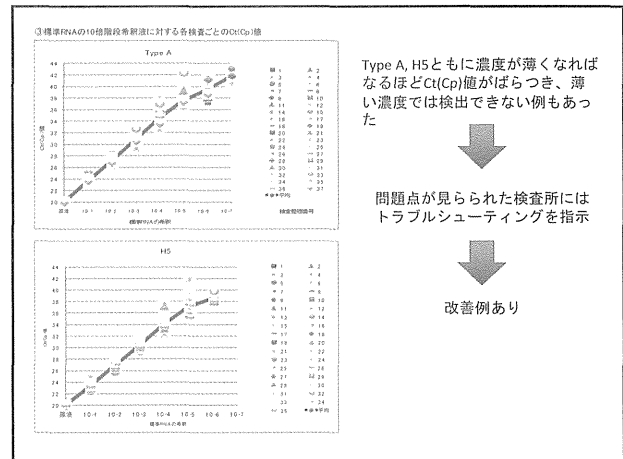
①亜型同定用RNA抽出液 間違ったり検出できない例もあった

サンプル名	RNA液希釈液	地衛研数 (検出率)
A 1.5mL チューブ (赤)	H1pdm	11/11 (100%)
B 1.5mL チューブ (青)	H1pdm (Aの10-3希釈)	11/11 (100%)
C 1.5mL チューブ (白)	H3	11/11 (100%)
D 1.5mL チューブ (黄)	H3 (Cの10-3希釈)	10/11 (91%)
E 1.5mL チューブ (緑)	DW	9/11 (82%)
F 1.5mL チューブ (橙)	H5	11/11 (100%)
G 1.5mL チューブ (黒)	H5 (Fの10-2希釈)	9/11 (82%)

	サンプル A-G 検出の正答率	判定できなかった理由	地衛研数
最初の検査で結果判定	7/7 (100%)		4
	6/7 (85.7%)	亜型を同定できなかった	2
他の方法と合わせて結果判定	6/7 (85.7%)	陰性を陽性または判定不能と判断	2
	7/7 (100%)		1
1回以上の再検査を行って結果判定	6/7 (85.7%)	亜型を同定できなかった	1
	6/7 (85.7%)	陽性を陰性と判断	1

② RNA抽出効率の差違 地衛研間でのばらつきはほとんどなかった

RNA抽出時のRNA濃縮率(倍)	サンプル使用量/抽出量(μL)	地衛研数
4	200/50	2
3.1	200/65	1
2.3	140/60	6
2	200/100	1
2	140/70	1



これまでのEQAについて

年月	参加地衛研	パネル
～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール

- ### 実施要項
- 実施スケジュール
 - 測定期間: パネル検体到着日～平成24年12月7日
 - パネル検体
 - ① RNA抽出が不要な4検体(既に核酸抽出済み)
 - ② RNA抽出が必要な6検体
 - ・H5N1感染疑いの検体が含まれるという前提で検査を行う
 - ・最初の検査は同時に10検体について必ずType A検査を入れて行う
 - パネル検体到着時の注意事項
 - ・ドライアイスが残存および検体の凍結状態を確認する
 - ・使用時まで-70度以下に保存する
 - アンケート回答・結果記入

サンプル名	型・亜型	濃度 (copies/μl)	各施設の H5検査SOP による同定数 (同定率)	再検査・追加検査 同定数/実施数 (最終同定率)	
A B C D	RNA抽出液 (そのまま反応に使用)	H5N1	1.0 × 10 ⁶	11/11 (100%)	
		H5N1	1.0 × 10 ³	11/11 (100%)	
		H5N1	1.0 × 10 ²	11/11 (100%)	
		H5N1	10	9/11 (82%)	1/1 (91%) *
E	不活化ウイルス及び RNA抽出液 (RNA抽出後使用)	H1N1pdm	1.0 × 10 ⁵	11/11 (100%)	
		TypeB	1.0 × 10 ²	下記参照	
F G	不活化ウイルス及び RNA抽出液 (RNA抽出後使用)	H3N2	4.3 × 10 ³	11/11 (100%)	
		Opti-MEM	—	11/11 (100%)	
H I J	RNA抽出液 (RNA抽出後使用)	TypeB	1.0 × 10 ⁵	下記参照	
		H1N1pdm	50	10/11 (91%)	1/1 (100%) **
		H3N2	43	10/11 (91%)	1/1 (100%) ***

* 1台目の機械ではTypeA(+), H5(-)で判定保留。2台目の機械で同定
** TypeA(+), H1pdm(-)で判定保留。2回目の検査で同定
*** TypeA(+), H3(-)で判定保留。real-time PCR法以外の方法により同定

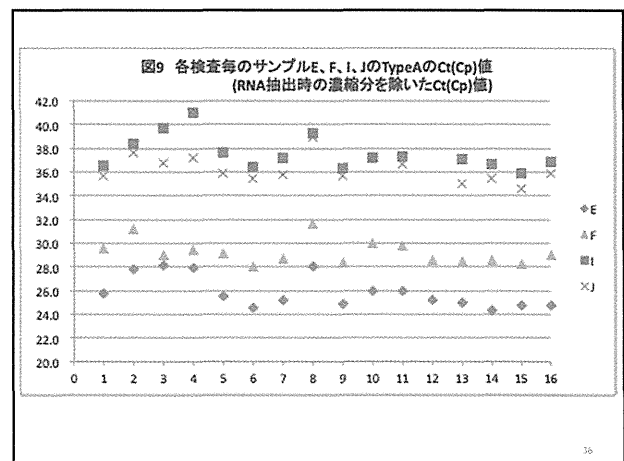
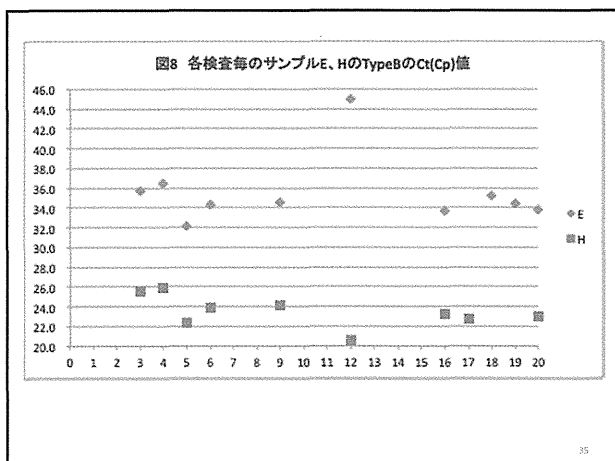
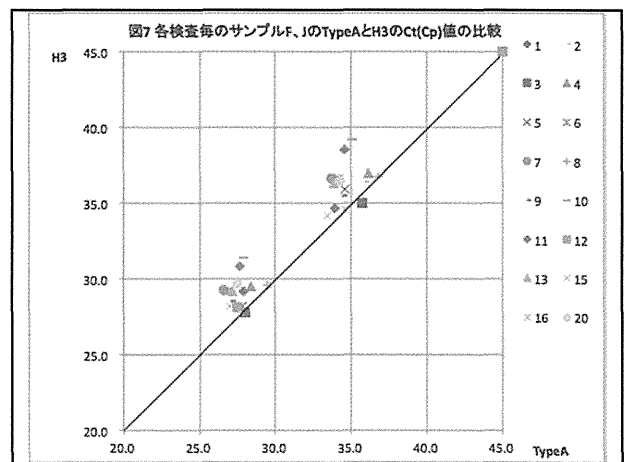
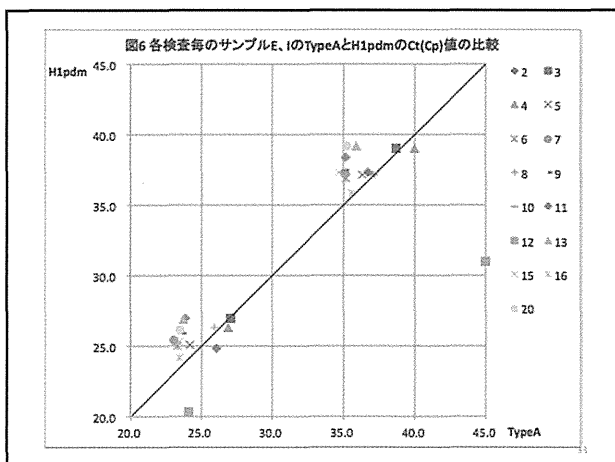
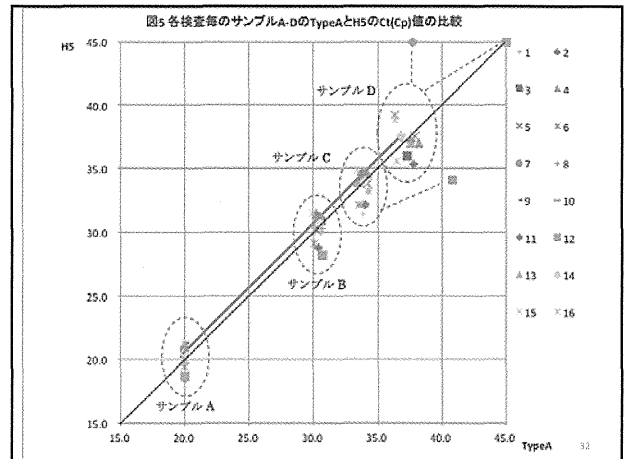
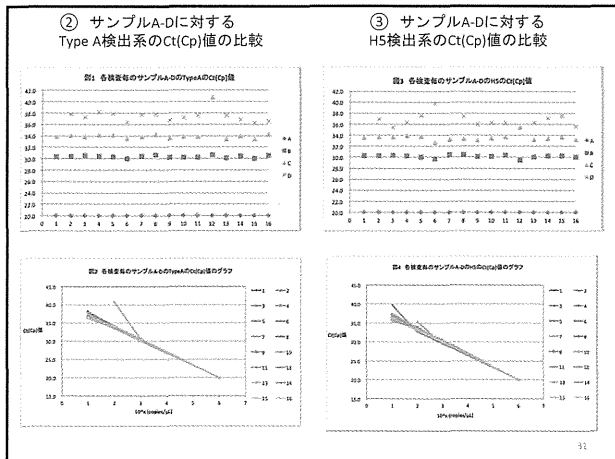
サンプルの取り違いによる判定違いや、コンタミネーションによる偽陽性はなかった。

今回のEQAにおけるTypeBに対する検査実施内訳

TypeBに対する検査の実施について	地衛研数
全ての検体に対して実施	6
一部の検体に対して実施	1
今回は実施せず	4

TypeBの同定率

	サンプルE	サンプルH
同定率	5/6 (83%)	7/7 (100%)



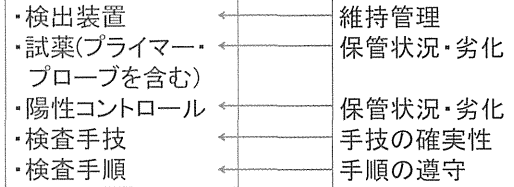
これまでのEQAについて

年月	参加地衛研	パネル
～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール

47

H25年度は全国規模EQAの試行という位置づけ
→ なるべくシンプルに

配布済み陽性コントロールのみを利用した精度管理



35

その背景として

診断マニュアルのH5およびH7亜型検査プライマー・プローブ配列、試薬、反応条件は、一定の検出感度・特異性については担保

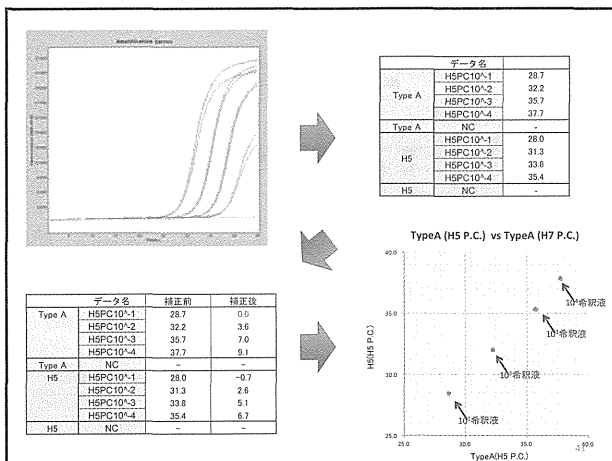
診断系に問題があった際は、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、手技等のどこに問題があるのか、原因追究が比較的容易に行えるのではないかと

39

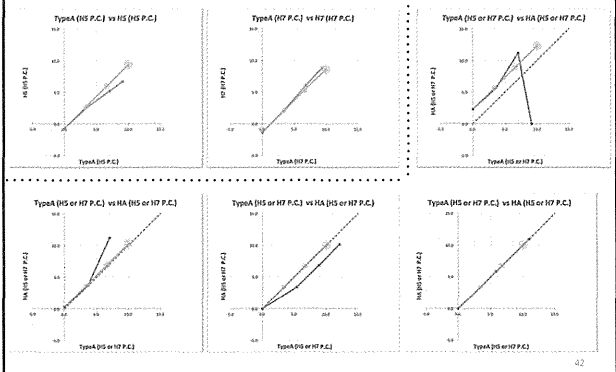
実施要項

- 実施スケジュール
実施要項配布: 平成25年9月11日
測定期間: ～平成25年10月31日
- パネル検体
① TypeA/H7 (マーカー入) 陽性コントロールRNA (平成25年7月に配布)
② TypeA/H5 (マーカー入) 陽性コントロールRNA: (平成24年9月に配布)
③ 各所で使用している陰性対象(滅菌蒸留水等)
- 測定方法
・ 10^{-1} ～ 10^{-4} までの10段階希釈液を製作する
・TypeAとH5, TypeAとH7のリアルタイムRT-PCR法、各サンプルのCt (Op)測定
- 結果記入・アンケートへの回答
・試薬調製手順
・キットなど詳細および陽性コントロールの希釈に使用した試薬および器具

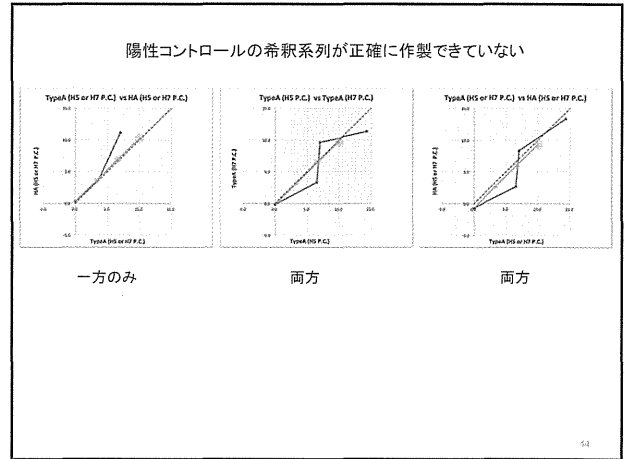
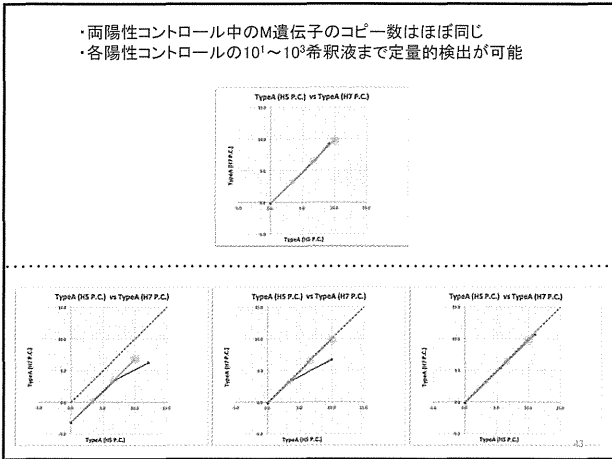
40



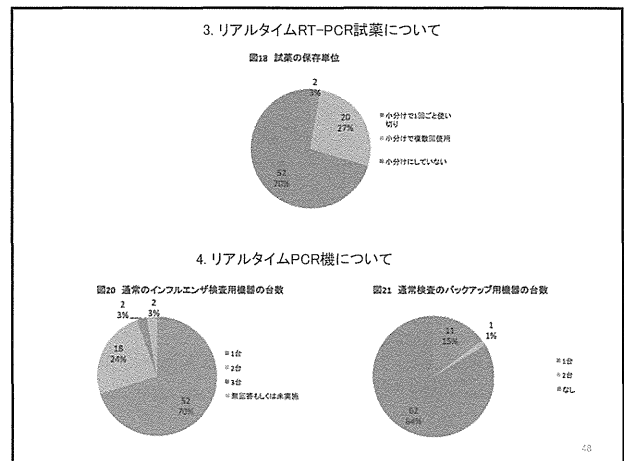
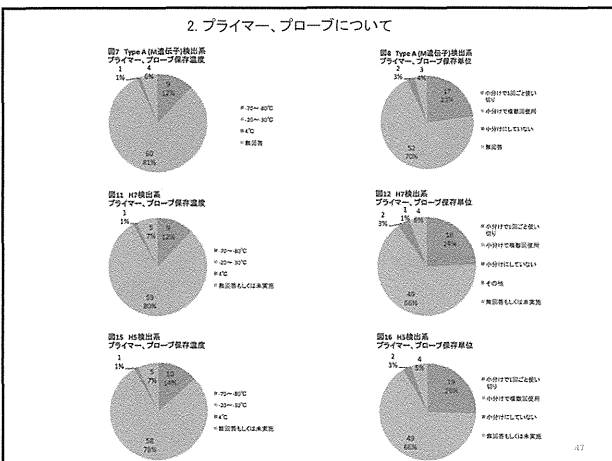
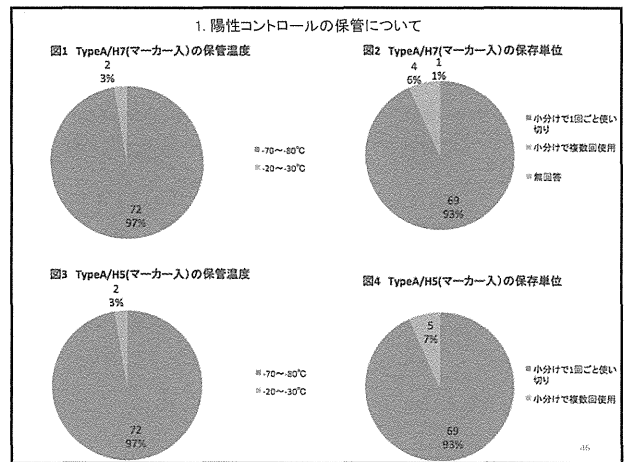
・各陽性コントロール中のMおよび各HA遺伝子のコピー数はほぼ同じ
・各陽性コントロールの 10^1 ～ 10^3 希釈液まで定量的検出が可能

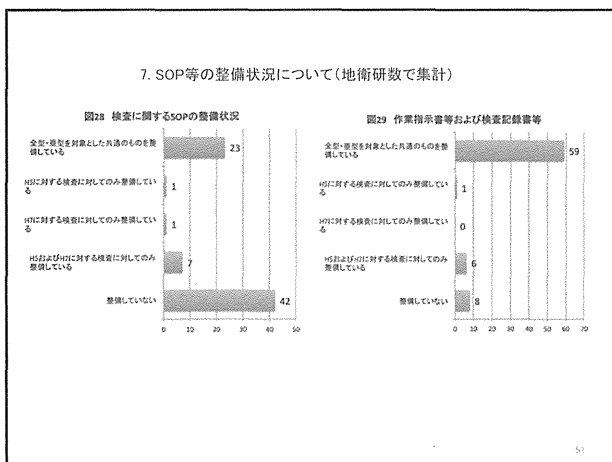
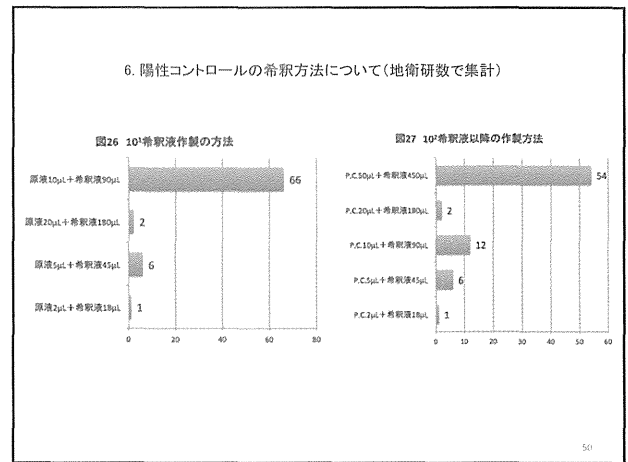
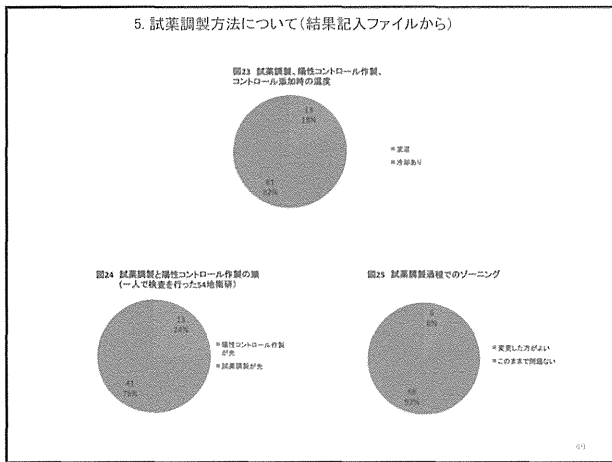


42

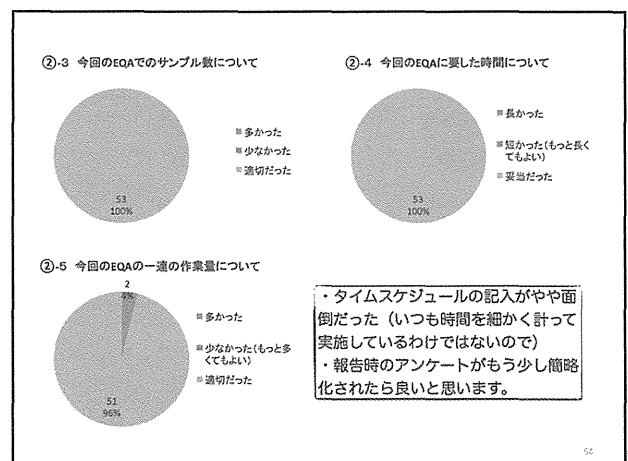
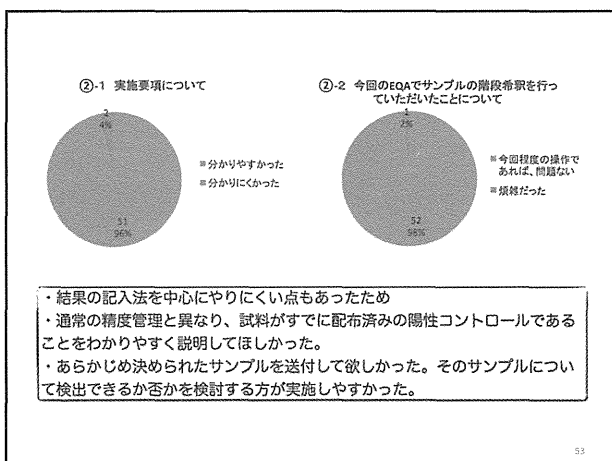


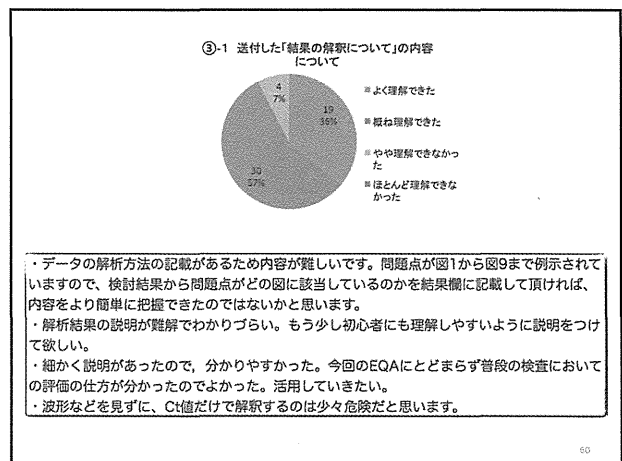
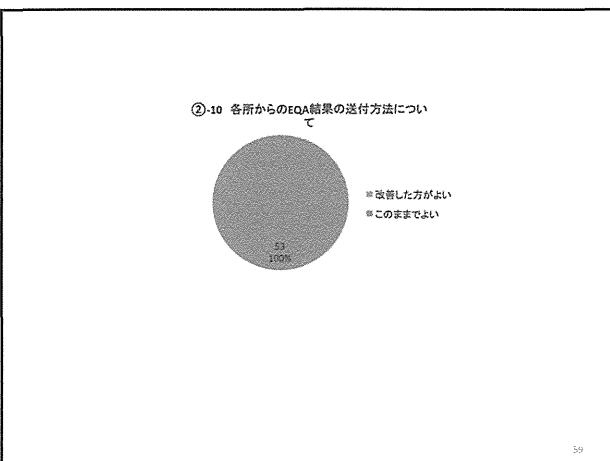
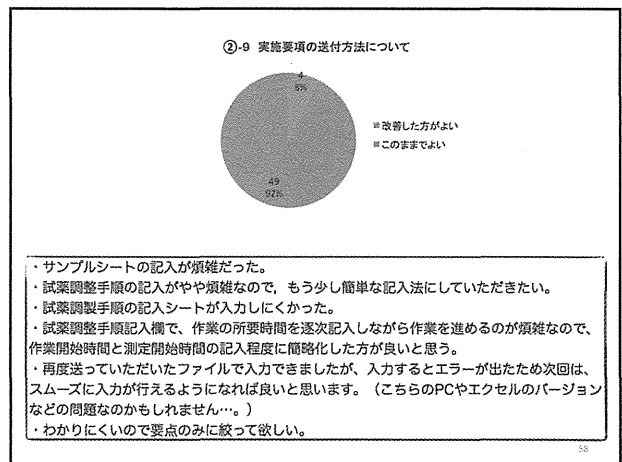
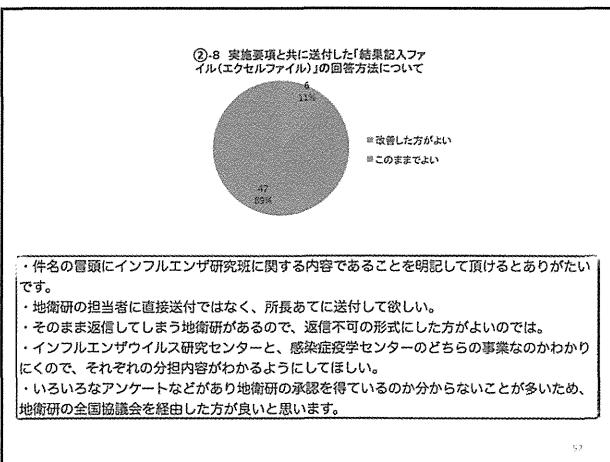
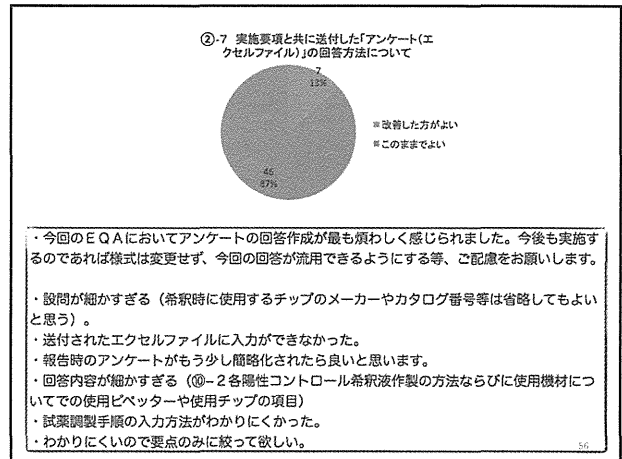
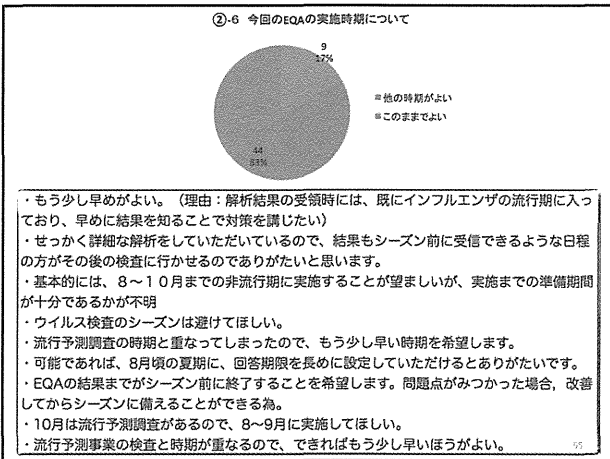
EQA時に行ったアンケート集計
76カ所

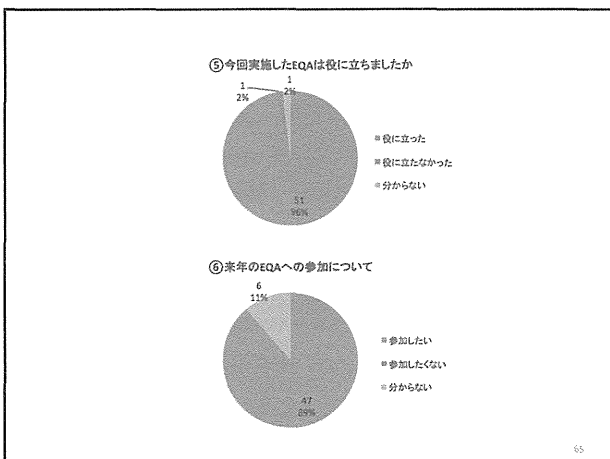
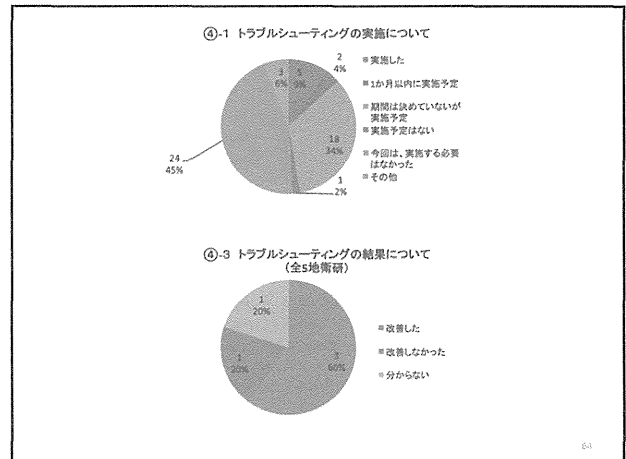
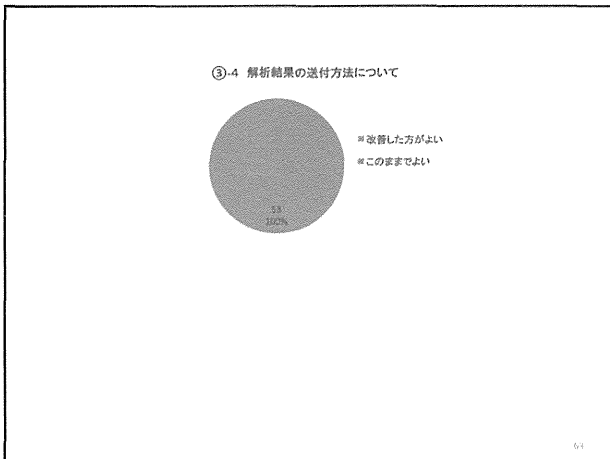
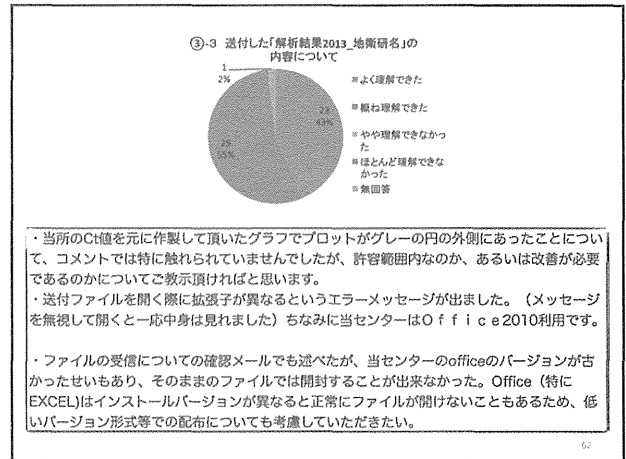
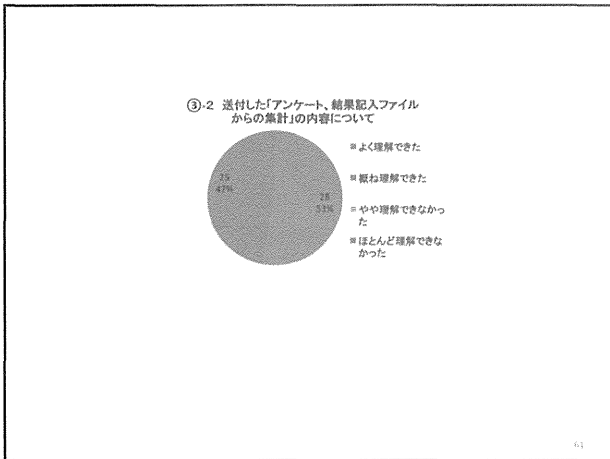




EQA後に行ったアンケート集計
53力所より回答をいただきました







EQA2014について

- 事前アンケート(参加確認)の送付(平成26年7月1日)
- 今年度は未知の検体として6検体を送付(平成26年7月28日～30日)
- 亜型同定およびCt値の報告(平成26年9月12日)
- 検査に関するアンケート(平成26年9月12日)

平成26年7月14日 佐多 班会議

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) 外部精度管理(EQA)について

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

影山 努

2014, 89, 37-44 No. 475

World Health Organization
Weekly epidemiological record
Relevé épidémiologique hebdomadaire

Organisation mondiale de la Santé 24 JANUARY 2014, 89th YEAR / 24 JANVIER 2014, 89^e ANNÉE
No. 475, 2014, 89, 37-44
<http://www.who.int/wer>

Contents

37 Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013

Sommaire

37 Récapitulatif de l'évaluation externe de la qualité de la détection des virus grippaux de type A par amplification génique, 2013

Detection of influenza virus subtype A by polymerase chain reaction: WHO external quality assessment programme summary analysis, 2013

Introduction

Global influenza virological surveillance has been conducted through the WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) for over 60 years. Currently 141 institutions in 111 Member States are recognized by WHO as National Influenza Centres (NICs). The laboratory network also comprises 6 WHO Collaborating Centres, 4 WHO Essential Regulatory Laboratories and ad

Récapitulatif de l'évaluation externe de la qualité de la détection des virus grippaux de type A par amplification génique, 2013

Introduction

Depuis plus de 60 ans, le Système mondial OMS de surveillance de la grippe et de riposte (GISRS) assure la surveillance virologique de la grippe au niveau mondial. On compte actuellement dans 111 États Membres 141 institutions reconnues par l'OMS comme Centres nationaux de la grippe (NICs). Le réseau de laboratoires comprend aussi 6 centres collaborateurs de l'OMS, 4 Laboratoires essentiels de réglementation et des groupes spéciaux mis en

Table 1. Panel composition and results of the WHO external quality assessment programme of National Influenza Centres and other laboratories for detection of influenza A and B viruses, panel 12 (2013).

Tableau 1. Composition de la série et résultats de l'évaluation externe de la qualité de la détection des virus grippaux A et B par les centres nationaux de la grippe et autres laboratoires, 12^e série (2013).

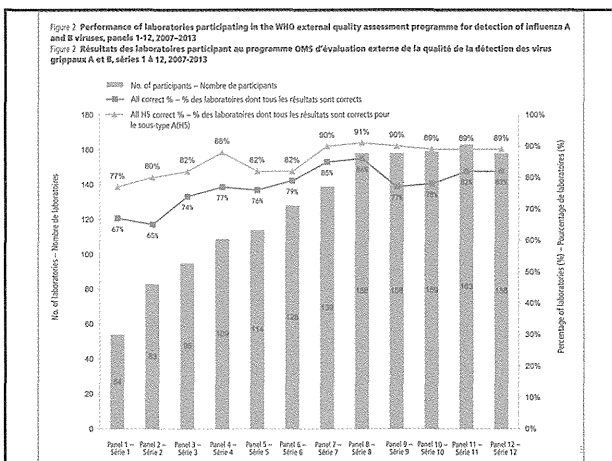
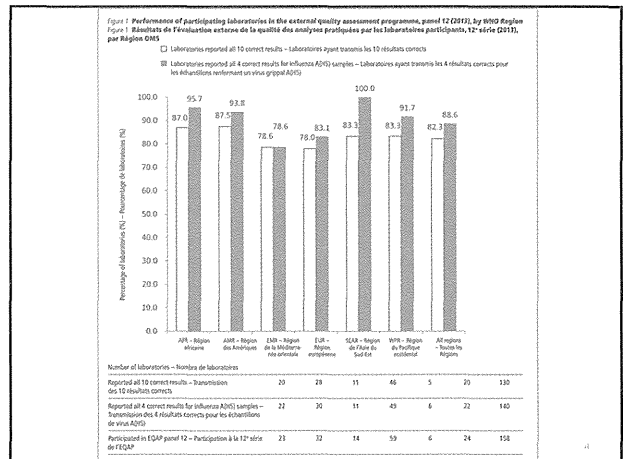
Influenza viruses - Virus grippaux	Strain/Clade* - Souche/Clade*	Sample number - Numéro de l'échantillon	Copies/µl ^b - Copies/µl ^b	No. (%) of laboratories correctly identifying sample (n=152) - Nombre (%) de laboratoires identifiant correctement l'échantillon (n=152)
A/IS05/11	2.1.1.1	V01-2013	7.62	145 (95.4)
A/IC/01/11	2.1.1.1	V04-2013	7.27	144 (95.4)
A/IS/01/11	2.1.1.1	V05-2013	1.13-1.10 ^c	153 (96.7)
A/IS/01/11	2.1.1.1	V10-2013	9.21-1.0 ^c	152 (96.2)
A/WH/10/09/09 ^d	A/California/7/2009 like virus - Virus analogues à A/California/7/2009	V09-2013	6.81-1.0 ^c	154 (97.5)
A/WH/02/11	A/Victoria/361/2011 like virus - Virus analogues à A/Victoria/361/2011	V07-2013	3.79-1.0 ^c	155 (98.1)
A/WH/02/11	A/Hong Kong/193/2009	V06-2013	8.63	153 (96.2)
Influenza B - Grippe B	B/ribnane/50/2009 like (Victoria) (Brisbane/10/2009) like (Victoria)	V02-2013	6.94-1.0 ^c	153 (96.8)
Influenza B - Grippe B	B/Wisconsin/02/2009 (Victoria)	V08-2013	3.68-1.0 ^c	151 (95.6)
Negative - Négatif	NA - NA	V03-2013	NA - NA	154 (97.5)

* The nomenclature of A/IS05/11 was based on the HA gene. For additional information, see http://www.who.int/influenza/laboratory_net_influenza/whn09n05/. La nomenclature des virus A/IS05/11 est basée sur le gène HA. Pour en savoir plus, voir http://www.who.int/influenza/laboratory_net_influenza/whn09n05/.

^b Reported by real-time RT-PCR. A range of template of inactivated virus (275 C₁) - Reported real-time RT-PCR template range of concentration is 2.00E+07 to 2.12E+08 copies/ml.

^c With nucleoside charge detector (CCD) in the NA gene as 10774 amino acid substitution resulting with highly reduced template detection by polymerase - Avec détecteur de la modification de charge nucléosidique (CCD) sur le gène NA comme 10774 acides aminés substitués à une forte réduction de la détection des templates par l'amplification.

NA, Not applicable - NA, Sans objet.



WHOのEQA

- 各国地域のNICが対象
- 不活化ウイルス10サンプル
- ウイルスRNAの検出および型・亜型同定を行う
- 薬剤耐性株のスクリーニング
- 検査方法の指定はない(WHOマニュアル、in house、市販キット、CDCキット、etc.)
- 問題があるかどうかを把握できるが、トラブルシューティング(原因の特定は難しい)

EQAの意義について

データに関する信頼性の維持・向上のための品質保証体系で基本的には誤差要因の解析とそれを取り除くことを目的とする。

- 検査精度の客観的な評価
- トラブルシューティング
- 検査精度の向上

(検査成績のランク付けが目的ではない)

新型インフルエンザ対策行動計画の改定について

◆背景・目的

平成21年に発生した病原性の低い新型インフルエンザ(A/H1N1)への対応を通じて得られた多くの貴重な知見や教訓を踏まえるとともに、病原性の高い新型インフルエンザが発生した場合でも適切な対応が図れるよう新型インフルエンザ対策行動計画の改定が行われた。

◆検討経緯

2010年 6月10日 新型インフルエンザ(A/H1N1)対策総括会議 報告書 公表
2011年 2月28日 新型インフルエンザ専門家会議 見直し意見 公表
2011年 8月15日 新型インフルエンザ及び鳥インフルエンザ等に関する関係省庁対策会議(局長級) 改定案決定
2011年 9月20日 新型インフルエンザ対策関係会議
(新型インフルエンザ対策閣僚会議において新型インフルエンザ対策行動計画の改定を決定)

「新型インフルエンザ対策行動計画」の改訂 (平成23年9月20日)

5.サーベイランスに関するガイドライン(新設)について ウ.新型インフルエンザ発生時に強化するサーベイランス

(イ)ウイルスサーベイランス

① 目的

新型インフルエンザ発生時には、平時から行うウイルスサーベイランスに加え、患者発生サーベイランスにおける全数把握患者及び学校サーベイランス等でのウイルス検査を実施することで、インフルエンザウイルスの型・亜型、抗原性、抗インフルエンザウイルス薬への感受性等を調べることで、診断・治療等に役立てる。

② 実施方法

患者発生サーベイランスにおける全数把握患者及び学校サーベイランス等でのウイルス検査を原則として地方衛生研究所にて実施する。検査する検体数については、地域の実情に応じて可能な限りにおいて行う。

6.医療体制に関するガイドラインについて

(1)発生前から進めるべき医療体制の整備

ウ. 検査体制の整備

(ア)検査体制の整備

- 国は、新型インフルエンザに対する迅速診断キットの開発を支援する。
- 国は、都道府県等に対し、地方衛生研究所における新型インフルエンザに対するPCR検査等を実施する体制を整備するよう要請し、その技術的支援を行う。

精度管理

内部精度管理
(施設内精度管理)
Internal Quality Control (IQC)

施設内部で精度管理を行うこと

標準試料(既知濃度)を用いた繰り返し測定によって測定値が許容範囲に含まれているかどうかを確認する

外部精度評価
(施設間精度管理)
External Quality Assessment (EQA)

他施設と比較して検査技術・正確度を評価すること

個々の検査施設を対象に共通条件のもとに広域で測定結果を調査する

リアルタイムRT-PCR法を用いた インフルエンザウイルス核酸検出検査の精度管理

- 検体からのRNA抽出について(試薬・方法)
- rRT-PCRについて(試薬・装置)
- rRT-PCRの検出感度・特異性について
- 検査室で生じる問題(操作ミス・コンタミ・記載ミス、技量の違いなど)
- 検査結果の解釈の違いなど

M遺伝子:A型
NS遺伝子:B型
HA遺伝子:H1, H1pdm, H3, H5, H7
(Primer/Probe配列、反応試薬は共通)

目次

インフルエンザ診断マニュアル (第2版)

(平成24年3月)

Part 1 インフルエンザおよびインフルエンザウイルス検査法の概要	
1. 概要	4
2. 対応するインフルエンザウイルス	4
3. 臨床検査	5
4. 検査の進め方	5
Part 2 ウイルス分離と検定	
1. インフルエンザウイルス分離のための臨床検体	8
2. ウイルス分離検体の検定方法	8
3. 培養検定法によるインフルエンザウイルスの分離	8
4. 顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの検定	13
5. 免疫検定法(ELISA)によるインフルエンザウイルスの検定	17
6. ウイルス遺伝子増幅法によるインフルエンザウイルスの検定	21
7. 迅速診断のためのインフルエンザウイルスの検定	34
Part 3 インフルエンザウイルスの遺伝子解析	
1. 遺伝子解析の方法	39
2. GISAID (Global Influenza Surveillance Network) への登録	47
Part 4 インフルエンザの疫学	
1. 流行曲線の調査	51
2. ウイルス学的検査による疫学的事象	53
Part 5 最新鋭インフルエンザウイルスの検出	
1. 最新鋭性変異の検出	
A. NA遺伝子対比法による遺伝子解析による検出	59
B. H5-specific RT-PCR法によるH5N1変異の検出	61
2. 最新鋭性変異の検定	
A. M2NSA遺伝子を用いた遺伝子解析	66
B. NA遺伝子を用いた遺伝子解析	68

目次

高病原性鳥インフルエンザ 診断マニュアル (第3版)

(平成24年3月)

Part 1 高病原性鳥インフルエンザの概要	
1. 高病原性鳥インフルエンザの概要	3
2. 検査の進め方	4
3. 検定方法の概要について	4
Part 2 ウイルス検定	
1. インフルエンザウイルス検定のための臨床検体の採取	10
2. ウイルス分離検体の検定方法	10
3. 顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの検定	12
4. ウイルス遺伝子増幅法によるH5N1遺伝子増幅法によるインフルエンザウイルスの検定	13
1. 遺伝子増幅法(PCR)による検定	13
2. Conventional RT-PCR法による検定	19
5. 検定結果の報告	23
6. 検定結果の報告のためのインフルエンザウイルスの検定	24
7. 検定結果の報告のためのインフルエンザウイルスの検定	21
検査結果	30
検査結果	30

※本マニュアルは、H5N1遺伝子増幅法を用いた検定結果の報告を目的とした。

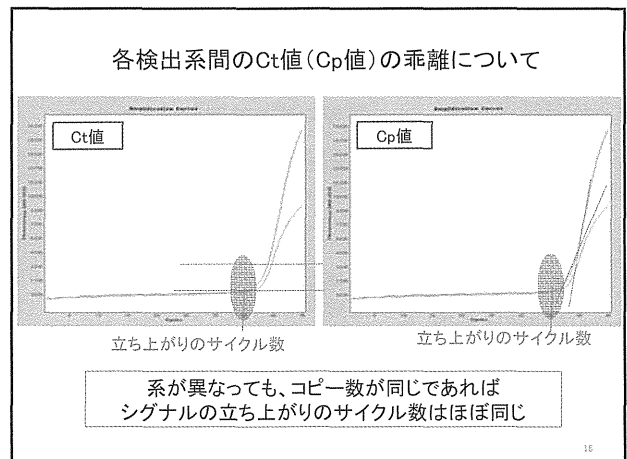
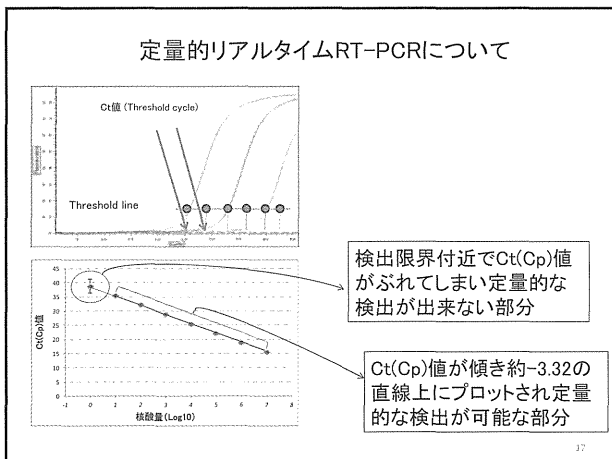
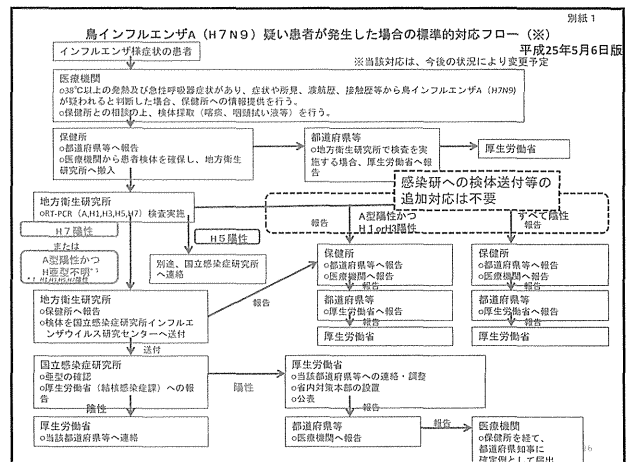
目次

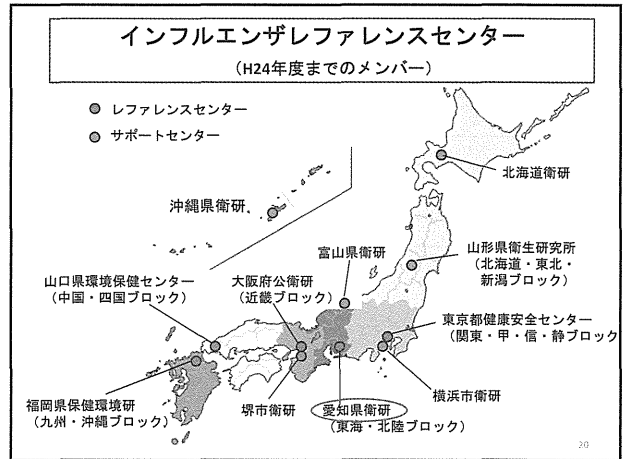
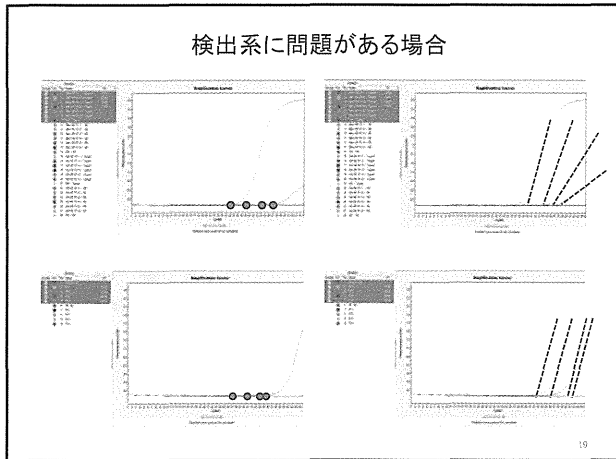
鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス 検出マニュアル (第2版)

(平成25年6月更新)

1. 臨床検体またはウイルス培養検体のRNAの抽出(※)	3
2. リアルタイム RT-PCR法による鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの検定	4
3. Conventional PCR法による鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの検定	8
4. 別検体とした H7N9 検体(検定)の管理・使用について	11
5. RT-LAMP 法による鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの検出方法(※)	13

※1. RNA抽出
※2. RT-PCR法による鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの検定
※3. Conventional PCR法による鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルスの検定





これまでのEQAについて

年月	参加地衛研	パネル
～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール

- ### 実施要項
- 実施スケジュール
・測定期間： パネル検体到着日～平成23年9月30日
 - パネル検体
 - ① 亜型同定用RNA: 未知濃度のウイルスRNA 7検体
 - ② 不活化ウイルス: 濃度の異なるA/California/7/2009ワクチン株2検体
陰性検体 1検体
 - ③ 標準RNA: A/H5N1 CL2.3.2北海道株由来RNA

他、標準RNA希釈用に希釈用チューブ、希釈用蒸留水、チップ (P200用: MBP社 ARTフィルターチップ ART 200U を1箱(96本入り)) を配布
 - パネル検体到着時の注意事項
輸送容器からパネル検体を取り出す際は、ドライアイスの残存および検体の凍結状態を確認し、検体が融解しないように素早く-70度以下に保存。検体到着時の状況及び保管状況は「アンケート記入シート」に入力。
 - 各地衛研で行っている試験方法等についてをアンケートに回答。
- 各パネル検体を11カ所のコア・サポート地衛研に配布

- ### 実施方法
- ① (未知濃度のウイルスRNA 7検体)に対する亜型同定検査を各地衛研のSOPに従って実施し、各検体のCt(Cp)値の算出し、亜型同定を行う。
 - ② (不活化ウイルス)より、各地衛研のSOPに従ってRNAの抽出を行い、抽出したRNAを用いて、Type A(M遺伝子)およびH1pdm09 (HA遺伝子)のCt(Cp)値の算出を行う。
 - ③ (標準RNA)より10倍階段希釈液の作製を行い、各地衛研のSOPに従ってType A(M遺伝子)およびH5亜型(HA遺伝子)の検出を行い、各希釈列のCt(Cp)値の算出を行う。

参加地衛研数: 11
のべ検査回数: 27 (最小1回、最大6回)

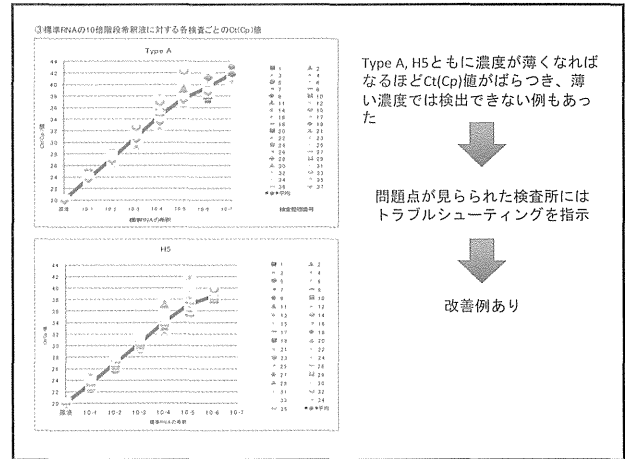
①亜型同定用RNA抽出液 間違ったり検出できない例もあった

サンプル名	RNA液希釈液	地衛研数 (検出率)
A 1.5mL チューブ (赤)	H1pdm	11/11 (100%)
B 1.5mL チューブ (青)	H1pdm (Aの10-3希釈)	11/11 (100%)
C 1.5mL チューブ (白)	H3	11/11 (100%)
D 1.5mL チューブ (黄)	H3 (Cの10-3希釈)	10/11 (91%)
E 1.5mL チューブ (緑)	DW	9/11 (82%)
F 1.5mL チューブ (橙)	H5	11/11 (100%)
G 1.5mL チューブ (黒)	H5 (Fの10-2希釈)	9/11 (82%)

	サンプル A-G 検出の正答率	判定できなかった理由	地衛研数
最初の検査で結果判定	7/7 (100%)		4
他の方法と合わせて結果判定	6/7 (85.7%)	亜型を同定できなかった	2
	6/7 (85.7%)	陽性を陽性または判定不能と判断	2
1回以上の再検査を行って結果判定	7/7 (100%)		1
1回以上の再検査を行って結果判定	6/7 (85.7%)	亜型を同定できなかった	1
	6/7 (85.7%)	陽性を陰性と判断	1

② RNA抽出効率の差違 地衛研間でばらつきはほとんどなかった

RNA抽出時のRNA濃縮率(倍)	サンプル使用量/抽出量(μL)	地衛研数
4	200/50	2
3.1	200/65	1
2.3	140/60	6
2	200/100	1
2	140/70	1



これまでのEQAについて

年月	参加地衛研	パネル
～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール

- ### 実施要項
- 実施スケジュール
 - 測定期間: パネル検体到着日～平成24年12月7日
 - パネル検体
 - ① RNA抽出が不要な4検体(既に核酸抽出済み)
 - ② RNA抽出が必要な6検体
 - ・H5N1感染疑いの検体が含まれるという前提で検査を行う
 - ・最初の検査は同時に10検体について必ずType A検査を入れて行う
 - パネル検体到着時の注意事項
 - ・ドライアイスが残存および検体の凍結状態を確認する
 - ・使用時まで-70度以下に保存する
 - アンケート回答・結果記入

サンプル名	型・亜型	濃度 (copies/μl)	各施設の H5 検査 SOP による同定数 (同定率)	再検査・追加検査 同定数/実施数 (最終同定率)	
A B C D	RNA 抽出液 (そのまま反応に使用)	H5N1	1.0 × 10 ⁶	11/11 (100%)	
		H5N1	1.0 × 10 ³	11/11 (100%)	
		H5N1	1.0 × 10 ²	11/11 (100%)	
		H5N1	10	9/11 (82%)	1/1 (91%) *
E	不活化ウイルス及び RNA 抽出液 (RNA 抽出後使用)	H1N1pdm	1.0 × 10 ⁵	11/11 (100%)	
		TypeB	1.0 × 10 ²	下記参照	
F G	不活化ウイルス及び RNA 抽出液 (RNA 抽出後使用)	H3N2	4.3 × 10 ³	11/11 (100%)	
		Opti-MEM	—	11/11 (100%)	
H I J	不活化ウイルス及び RNA 抽出液 (RNA 抽出後使用)	TypeB	1.0 × 10 ⁵	下記参照	
		H1N1pdm	50	10/11 (91%)	1/1 (100%) **
		H3N2	43	10/11 (91%)	1/1 (100%) ***

* 1 台目の機械では TypeA(+), H5(-)で判定保留。2 台目の機械で同定

** TypeA(+), H1pdm(-)で判定保留。2 回目の検査で同定

*** TypeA(+), H2(-)で判定保留。real-time PCR 法以外の方法により同定

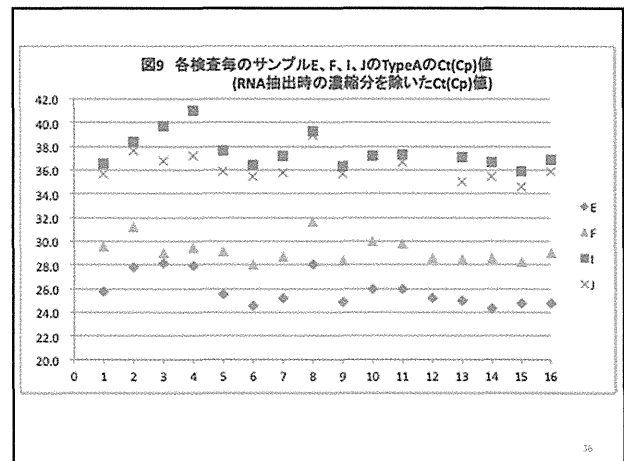
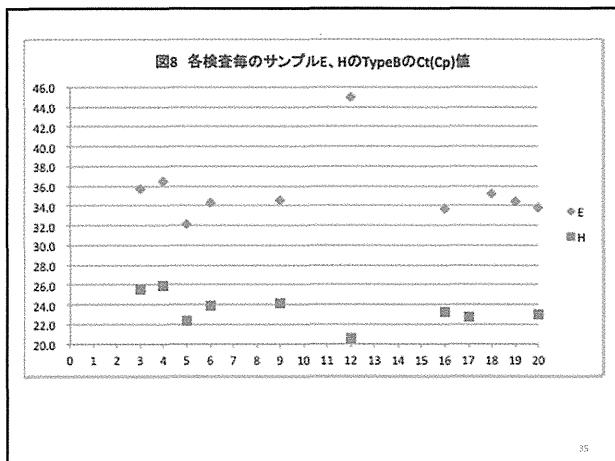
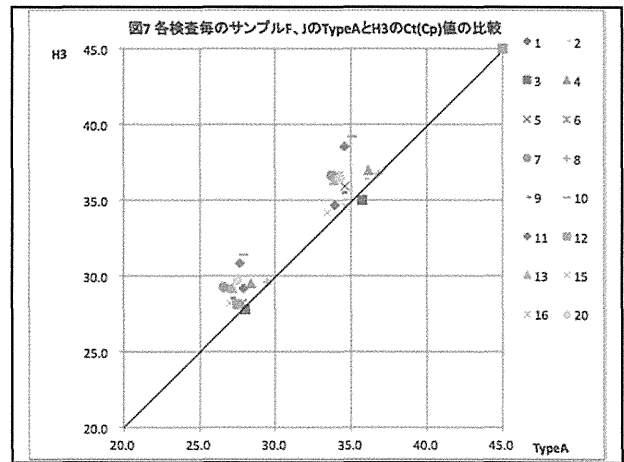
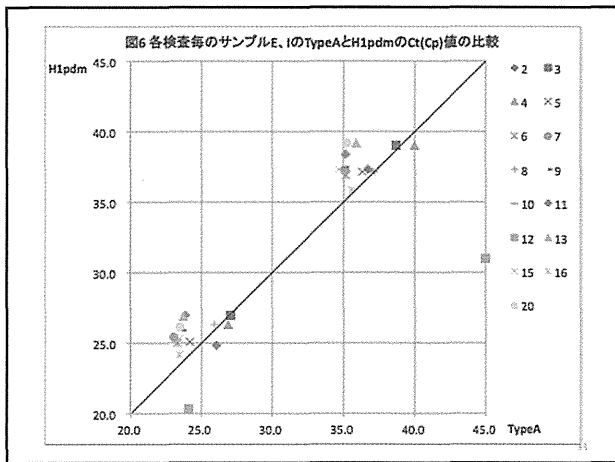
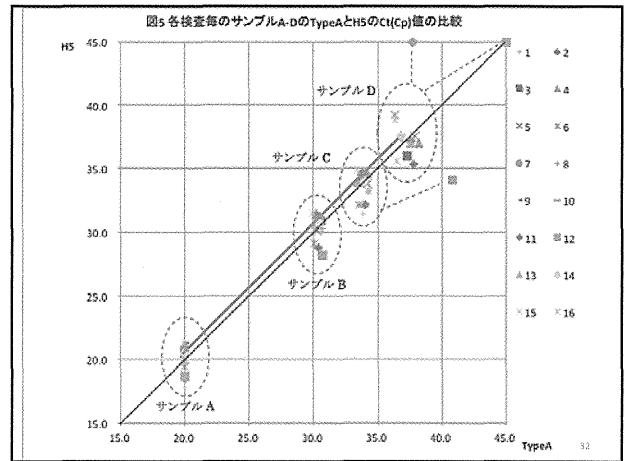
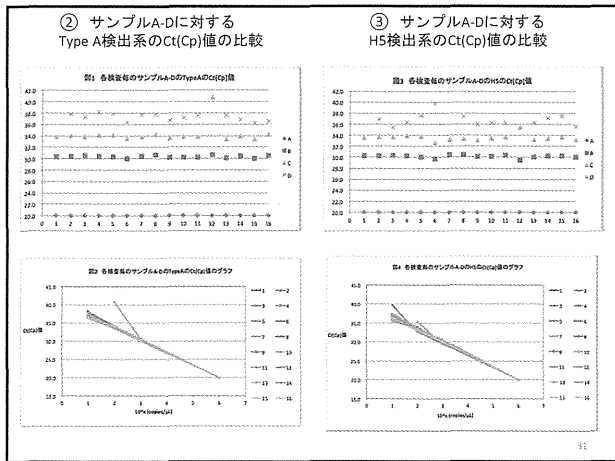
サンプルの取り違いによる判定違いや、コンタミネーションによる偽陽性はなかった。

今回のEQAにおけるTypeBに対する検査実施内訳

TypeBに対する検査の実施について	地衛研数
全ての検体に対して実施	6
一部の検体に対して実施	1
今回は実施せず	4

TypeBの同定率

	サンプル E	サンプル H
同定率	5/6 (83%)	7/7 (100%)



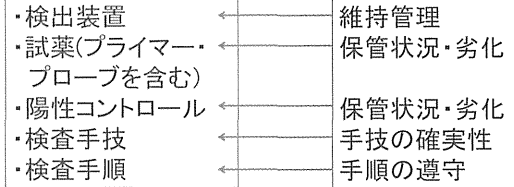
これまでのEQAについて

年月	参加地衛研	パネル
～2011年9月	11 (コア・サポート)	1. H5陽性コントロール 2. 未知7検体 3. RNA抽出チェック 2検体
～2012年12月	11 (コア・サポート)	1. 未知4検体(RNA抽出不要) 2. 未知6検体(要RNA抽出)
～2013年12月	74	1. H5陽性コントロール 2. H7陽性コントロール

47

H25年度は全国規模EQAの試行という位置づけ
→ なるべくシンプルに

配布済み陽性コントロールのみを利用した精度管理



38

その背景として

診断マニュアルのH5およびH7亜型検査プライマー・プローブ配列、試薬、反応条件は、一定の検出感度・特異性については担保

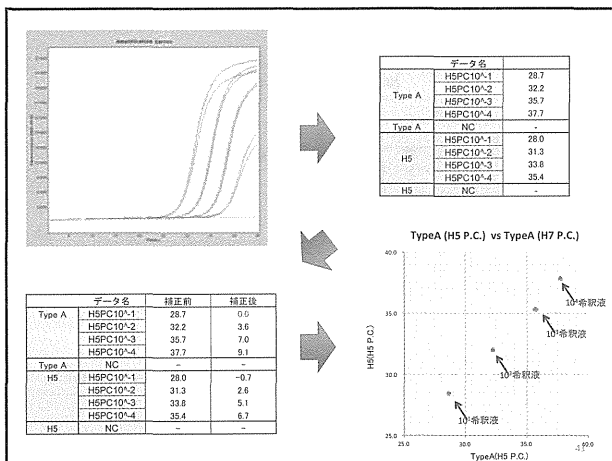
診断系に問題があった際は、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、手技等のどこに問題があるのか、原因追究が比較的容易に行えるのではないかと

39

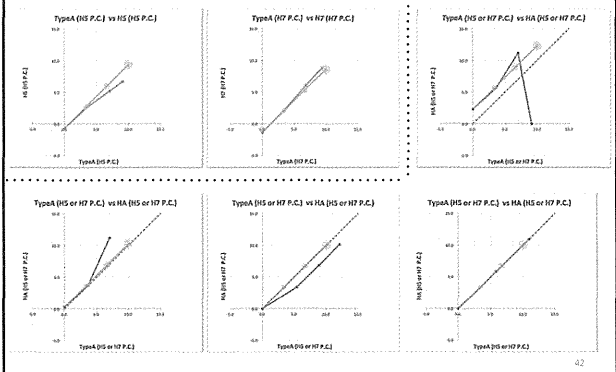
実施要項

- 実施スケジュール
実施要項配布: 平成25年9月11日
測定期間: ～平成25年10月31日
- パネル検体
① TypeA/H7 (マーカー入) 陽性コントロールRNA (平成25年7月に配布)
② TypeA/H5 (マーカー入) 陽性コントロールRNA: (平成24年9月に配布)
③ 各所で使用している陰性対象(滅菌蒸留水等)
- 測定方法
・ 10^{-1} ～ 10^{-4} までの10段階希釈液を製作する
・TypeAとH5, TypeAとH7のリアルタイムRT-PCR法、各サンプルのCt (Op)測定
- 結果記入・アンケートへの回答
・試薬調製手順
・キットなど詳細および陽性コントロールの希釈に使用した試薬および器具

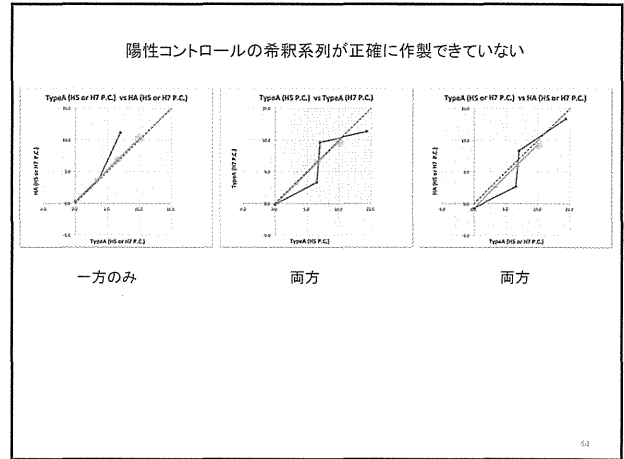
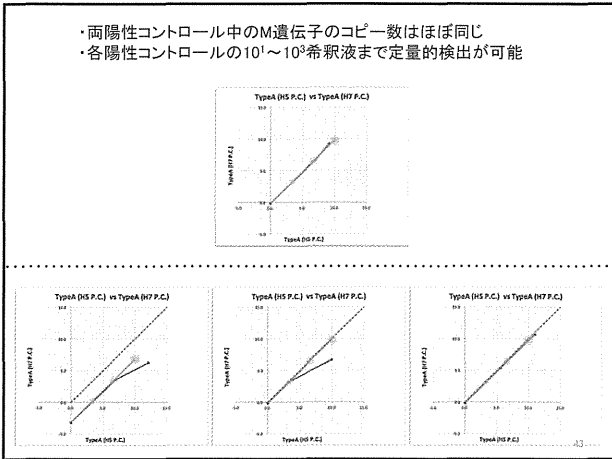
40



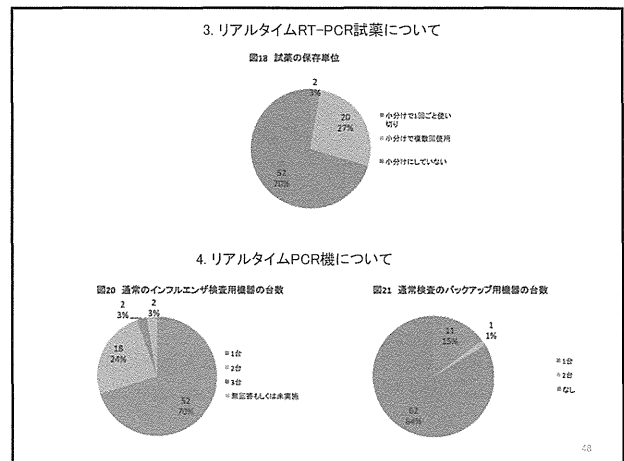
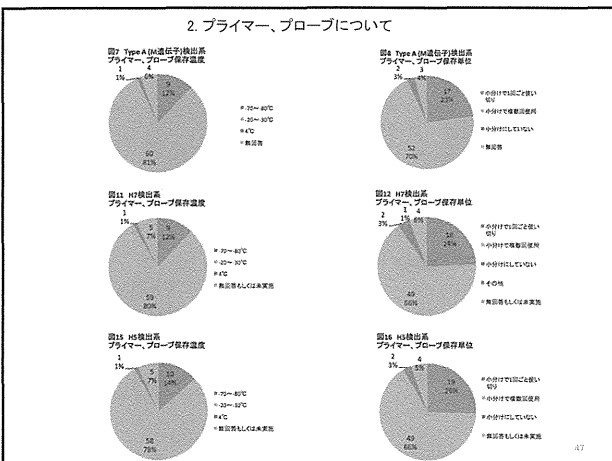
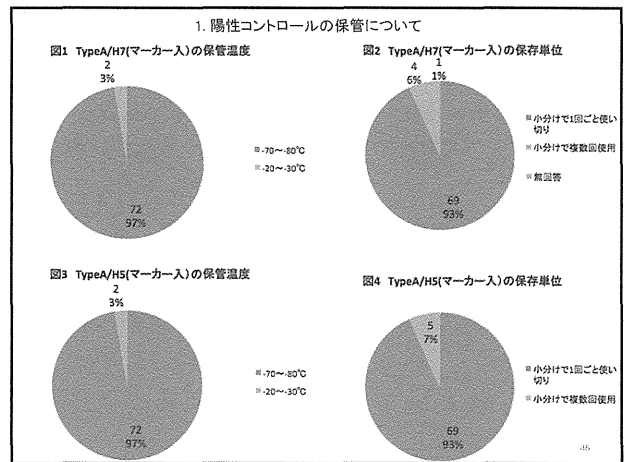
・各陽性コントロール中のMおよび各HA遺伝子のコピー数はほぼ同じ
・各陽性コントロールの 10^1 ～ 10^3 希釈液まで定量的検出が可能

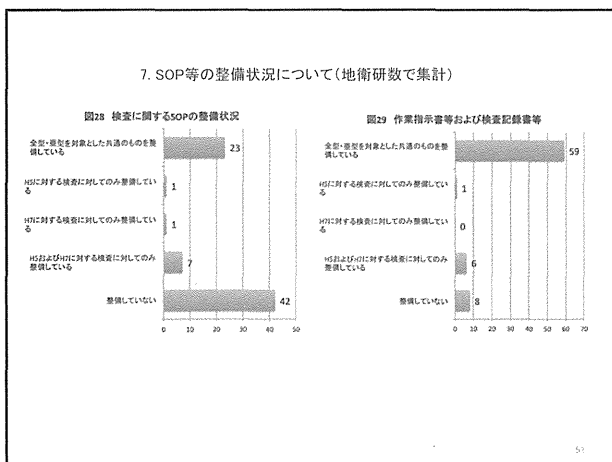
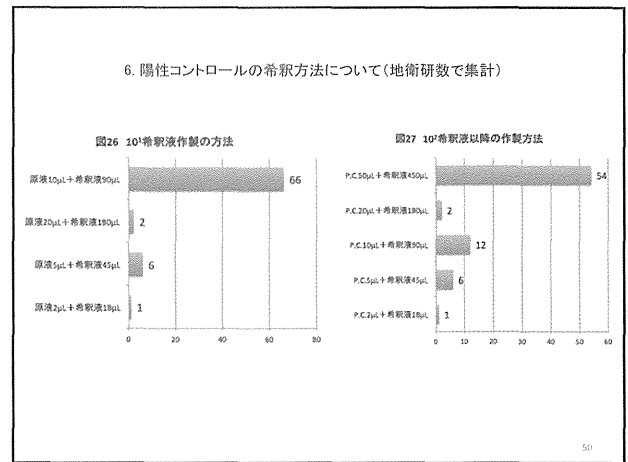
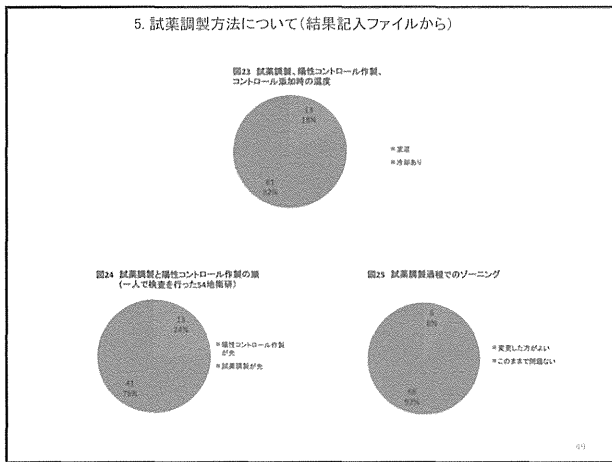


42

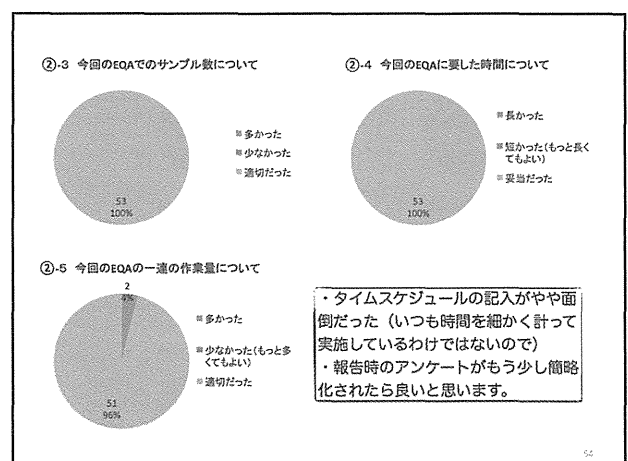
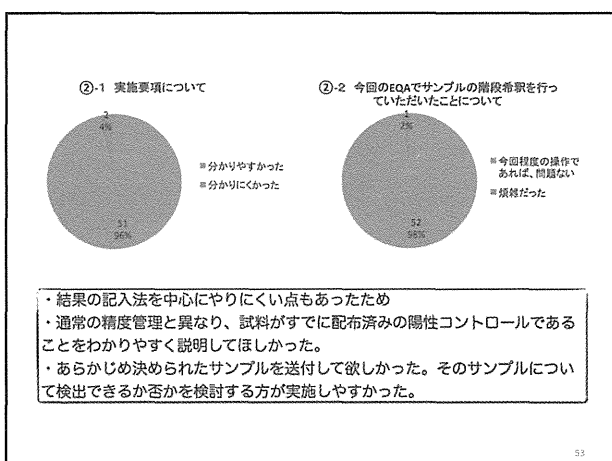


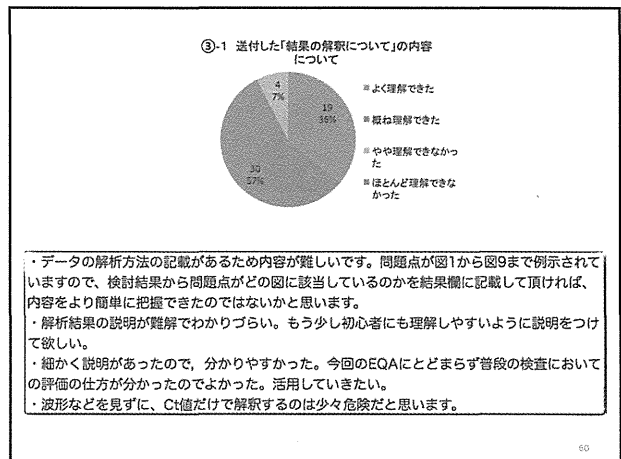
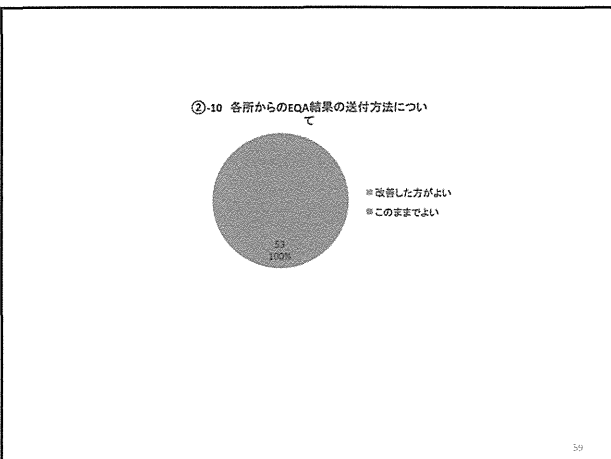
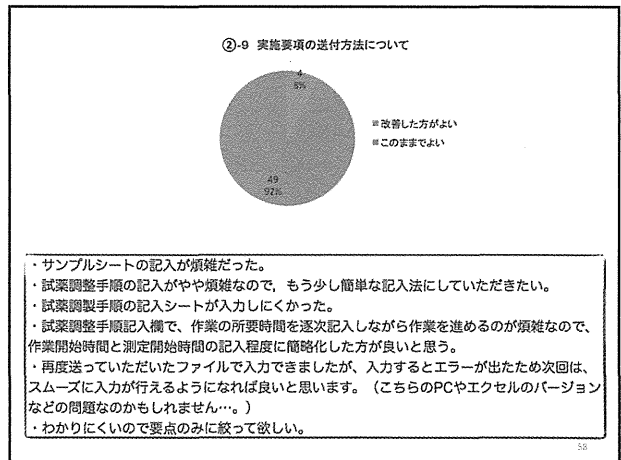
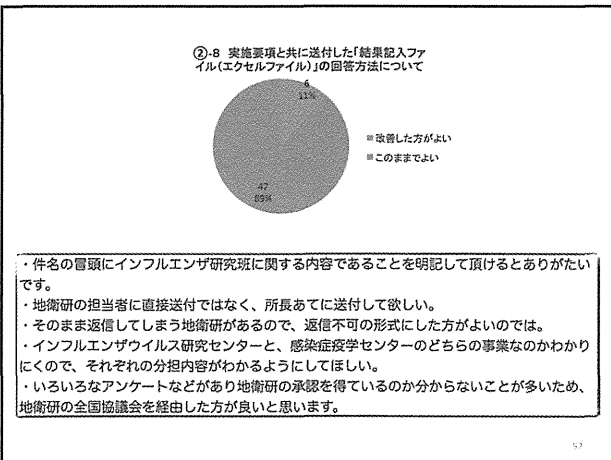
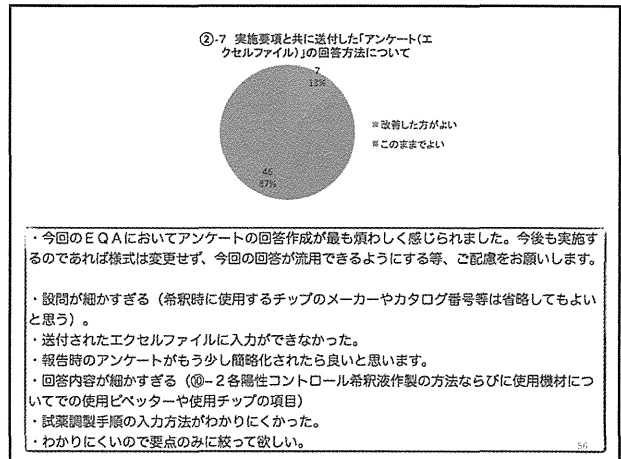
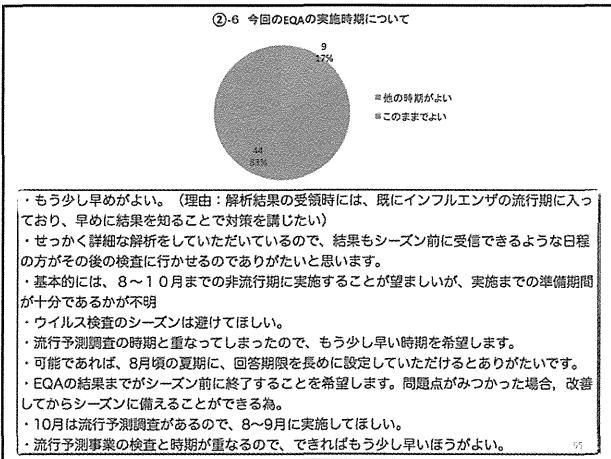
EQA時に行ったアンケート集計
76カ所

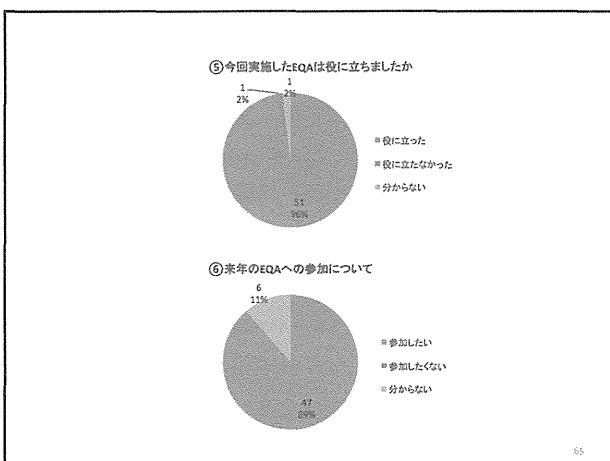
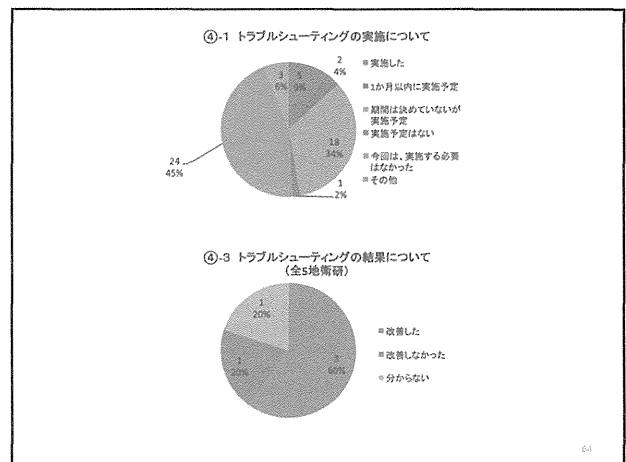
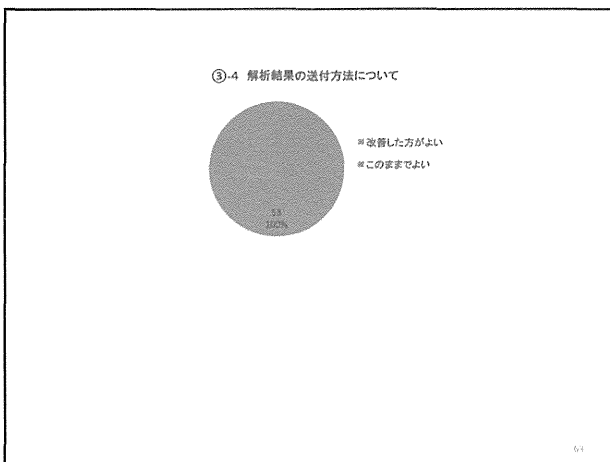
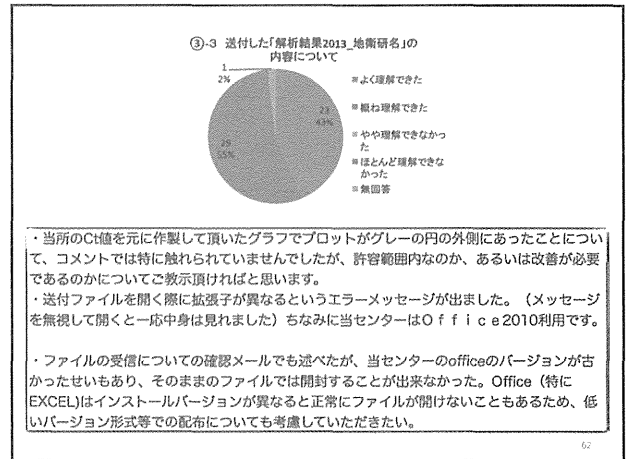
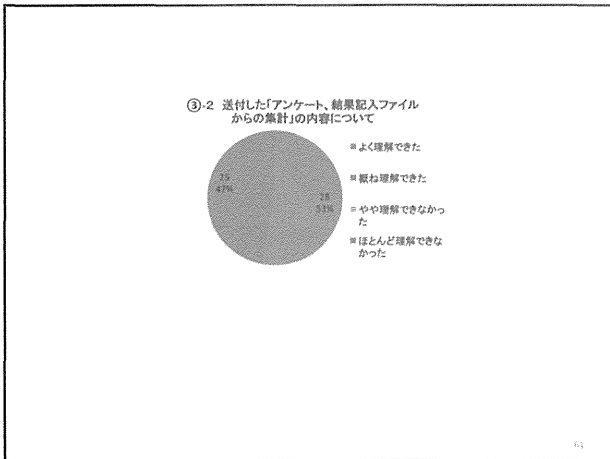




EQA後に行ったアンケート集計
 53力所より回答をいただきました







EQA2014について

- 事前アンケート(参加確認)の送付(平成26年7月1日)
- 今年度は未知の検体として6検体を送付(平成26年7月28日～30日)
- 亜型同定およびCt値の報告(平成26年9月12日)
- 検査に関するアンケート(平成26年9月12日)

今後の課題

- RNA抽出
- ウイルス分離

67

平成26年度厚生労働科学研究費補助金
「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続の実施のための
事業体制の構築に関する研究」(班班会議 (H26-健危-一般-001)
平成26年7月14日

感染症検査における外部および内部精度管理
の先行事例等について

- 麻疹ウイルス検査診断における
精度管理について -

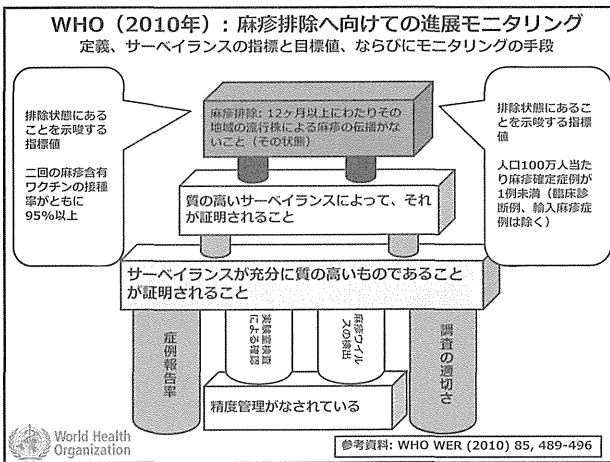
ウイルス第3部第一室
駒瀬 勝啓

麻疹

- 5類感染症/全数把握感染症
- 学校保健安全法(解熱後3日間の出席停止)
- WHOが中心となり地球上から排除を目指している感染症

- 2015年まで
麻疹による死亡者数を2000年と比較して95%減少させる。
各地域での麻疹並びに風疹/CRSの排除目標を達成する。
- 2020年まで
少なくとも5つの地域で麻疹排除を達成する。
(Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012-2020)

- 麻疹に関する特定感染症予防指針
「目標: 平成27年までに麻疹の排除を達成し、世界保健機関による麻疹排除の認定を受け、その後も排除状態を維持する」



麻疹

- 5類感染症/全数把握感染症
- 学校保健安全法(解熱後3日間の出席停止)
- WHOが中心となり地球上から排除を目指している感染症

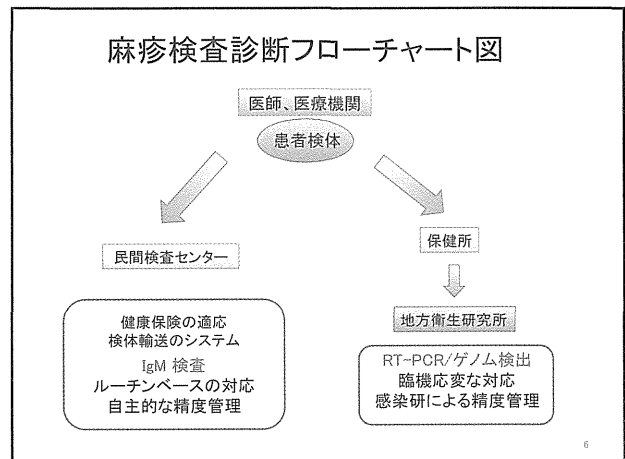
- 2015年まで
麻疹による死亡者数を2000年と比較して95%減少させる。
各地域での麻疹並びに風疹/CRSの排除目標を達成する。
- 2020年まで
少なくとも5つの地域で麻疹排除を達成する。
(Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012-2020)

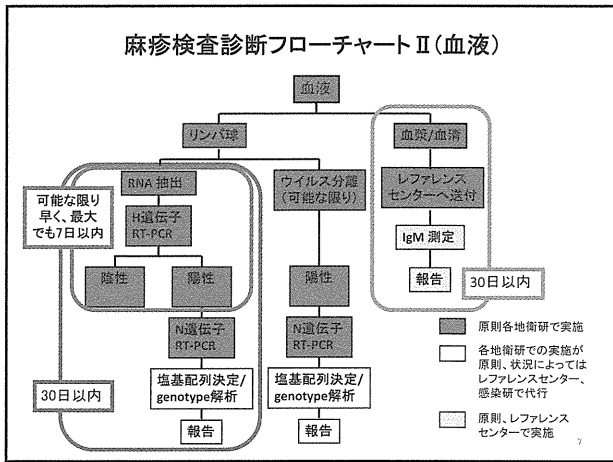
- 麻疹に関する特定感染症予防指針
「目標: 平成27年までに麻疹の排除を達成し、世界保健機関による麻疹排除の認定を受け、その後も排除状態を維持する」

麻疹に関する特定感染症予防指針

(平成24年12月14日 一部改正、平成25年4月1日 適用)

- 第2 原因の究明
- 三 麻疹の届出基準
…風しん等の類似の症状を呈する疾病と正確に見分けるためには、病原体を確認することが不可欠であることから、原則として全例に検査の実施を求めるものとする。しかしながら、迅速な行政対応を行うため、臨床診断をした時点でまず臨床診断例として届出を行うとともに、血清IgM抗体検査等の血清抗体価測定の実施と、都道府県等が設置する地方衛生研究所でのウイルス遺伝子検査等の実施のための検体の提出を求めるものとする。…
- 六 ウイルス遺伝子検査等の実施
都道府県等は、医師から検体提出された場合は、都道府県等が設置する地方衛生研究所において、原則として全例にウイルス遺伝子検査等を実施するとともに、その結果の記録を保存することとする。検査の結果、麻疹ウイルスが検出された場合は、可能な限り、地方衛生研究所において麻疹ウイルス遺伝子配列の解析を実施する。又は国立感染症研究所に検体を送付し、同研究所が遺伝子配列の解析を実施することとする。国立感染症研究所は、解析されたウイルスの遺伝子情報を適切に管理し、流行状況の把握や感染伝播の制御等に役立てることとする。





Measles/Rubella IgM Proficiency Testing

Objectives

- Assess proficiency of laboratories in the WHO global network
- Identify any problems with assays in routine use
- Check the accuracy of data reporting
- Check assay validation criteria
- Laboratories to report results within 14 days of receiving panel

Jennie Lyndon (VIDAL); 11th Global Measles & Rubella laboratory meeting (June 2013)

麻疹 IgM ELISA (Proficiency test)

- 対象 レファレンスセンター(10カ所)
- 検査検体 血清20検体に送付
- 検査キット 感染研から配布
- 回答までに期間 検体を受け取ってから2週間
- 方法 麻疹IgM 抗体価を配布したキットで測定し、判定結果を感染研の結果と比較する
- 試験成立条件をみたしているかを確認する。
- 成立条件を満たし、90%以上の正答で「合格」とした。
- WHOが「M & R LabNet」実施しているIgM PTと概ね同じ考え方

2011年度麻疹IgM ELISA PT 結果

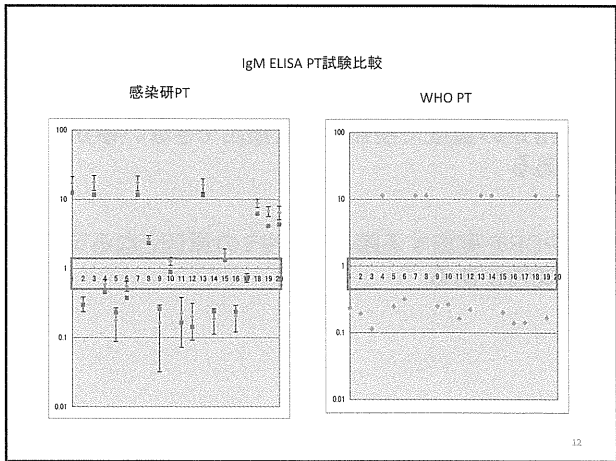
Method	Kit Brand Name	Batch/Serial No.	Expiry Date
EIA	エンザイブテスト	40738	2012/6/23

	Antigen O.D.	Control Antigen O.D.	Δ O.D.	有効性の確認
reference P/N	0.050	0.048	0.002	<0.1
reference P/P	0.603	0.653	0.050	0.899602918
reference P/P	0.529	0.605	0.479	-0.899602918

sample	Antigen O.D.	Control Antigen O.D.	Δ O.D.	Assay Value	Pos./Neg./Equi
2011-1	0.078	0.075	0.003	0.003090276	-
2011-2	0.072	0.068	0.004	0.004120565	-
2011-3	0.154	0.132	0.022	0.022982729	-
2011-4	0.441	0.624	0.271	0.388579524	-
2011-5	0.168	0.066	0.152	0.135976876	+
2011-6	0.107	0.053	0.014	0.014421799	-
2011-7	0.057	0.055	0.002	0.002000000	-
2011-8	0.078	0.073	0.005	0.005160632	-
2011-9	0.635	0.071	0.568	0.582022288	+
2011-10	0.078	0.071	0.008	0.008241011	-
2011-11	0.685	0.081	0.605	0.605160632	-
2011-12	0.071	0.068	0.003	0.003000000	-
2011-13	0.376	0.055	0.211	0.238466524	+
2011-14	0.088	0.081	0.016	0.018542274	-
2011-15	0.079	0.072	0.007	0.007210884	-
2011-16	0.163	0.068	0.095	0.095150632	-
2011-17	0.375	0.081	0.294	0.302857143	+
2011-18	0.091	0.085	0.006	0.006160632	-
2011-19	0.068	0.079	0.007	0.007210884	-
2011-20	0.508	0.084	0.414	0.416472303	+

IgM ELISA Proficiency Test (2008)

Sample	NIID			REFERENCE CENTER										正答率
	判定	判定	判定	A	B	C	D	E	F	G	H	I		
008-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-10	Equi	Equi	Equi	+	Equi	+	+	+	Equi	+	+	Equi	+	33.3
008-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-15	+	Equi	+ / Equi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
008-17	-	Equi	- / Equi	-	-	-	Equi	-	-	-	Equi	Equi	-	100
008-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
008-20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100
				正答率	95	100	95	95	95	100	95	95	100	



麻疹IgM ELISA精度管理の問題点

- 検体の確保
感染研には検体が集まらない
倫理問題
- 検査キットのコスト
Siemens IgM kit
130,000円/kit + 補助試薬 40,000円/kit
- 配送の手続き、コスト

13

RT-PCR法

14

Reference RNA について

- RT-PCRの陽性コントロール
- RT-PCRの精度管理用
- ワクチン株ゲノム由来の合成RNA (genotype A)

15

Results of RT-PCR using reference RNA by National Laboratory (NIID)

1.5% agarose gel

16

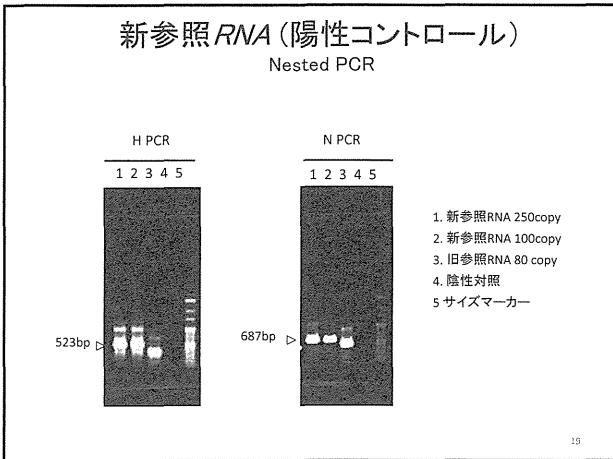
参照RNAの問題点

- 指定の濃度で使用すると検出できない事がある
- PCRを実施する際のコンタミの原因となる可能性がある

17

新参照RNA(陽性コントロール)

18



1.5-2µg RNA (17 well) を用意し、各PCR検体 10µL を下記の表の順序で電気泳動
(Size marker-N または Size marker-H も 10µL/lane で泳動)
この順序を 2 検体(検体用、N 用)し、下記の表の通り泳動に記録の上、写真を添って PDF 等でご送付下さい。

Lane	サンプル	検体	備考	通/不通
1	1 st PCR	5000 copy / 10µL	新検体検品	通
2		1000 copy / 10µL		
3		500 copy / 10µL		
4		100 copy / 10µL		
5		50 copy / 10µL		
6		旧 reference RNA	旧検体検品	通
7		蒸留水	陰性対照	不通
8	100bp ladder (L1は100bpの遺伝子サイズマーカー)			
9	Nested PCR	5000 copy / 10µL	新検体検品	通
10		1000 copy / 10µL		
11		500 copy / 10µL		
12		100 copy / 10µL		
13		50 copy / 10µL		
14		旧 reference RNA	旧検体検品	通
15		蒸留水	陰性対照	不通
16	Size marker - H (523bp) 又は Size marker - N (687bp)		どちらかを使用	

写真

Real-time PCR法

CDC法

Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens
(Hummel et al., Journal of Virological Methods 132 (2006) 166-173)

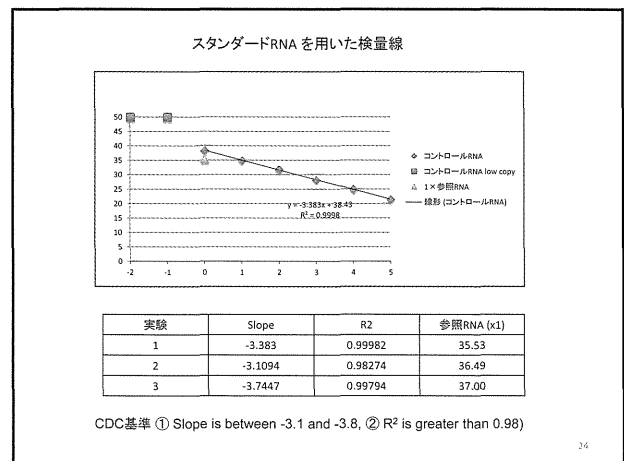
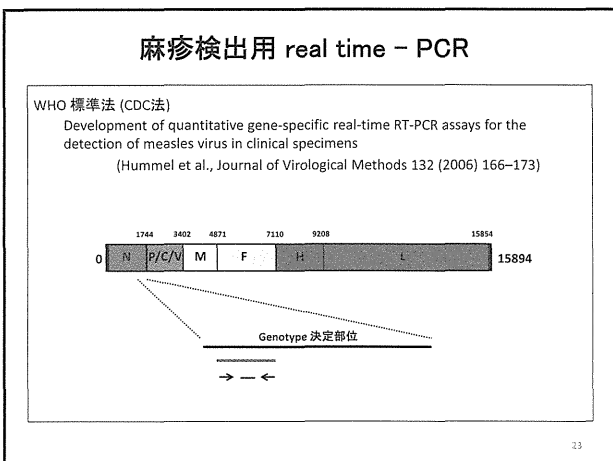
必要なオリゴDNA

Forward Primer (MVN1139F) : 5' TGGCATCTGAACTCGGTATCAC 3'
Reverse Primer (MVN1213R) : 5' TGCTCTCAGTAGTATGCATTGCAA 3'

Probe (MVNP1163P) : 5' FAM-CCGAGGATGCAAGGCTGTTCAGA-TAMRA 3'

修正したCDC法 (TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix)

water	7.6µl	1 cycle [50°C 5min 95°C 20sec
4 × Master mix	5µl (1 ×)	
MVN1139F (10µM)	0.8µl (400nM)	50cycle 95°C 15sec 60°C 1min
MVN1213R (10µM)	0.8µl (400nM)	
MVNP1163P (6.25µM)	0.8µl (250nM)	
サンプル	5µl	
	20µl	detector : FAM-TAMRA



レファレンスセンターにお願いした事

- ① 本方法の確認 → 様々な機器、試薬で一般化が可能か?
「Real-time RT-PCR法による麻疹ウイルスN遺伝子の検出」を参考に最適化を実施してください。
- ② 過去にNested-PCRで検査を実施した検体の本方法での検査 → 判定基準をどのようにすればいいか?
- ・Nested-PCRで結果がでている「陽性検体」「陰性検体」を使用してください
 - ・遺伝子型、感度等の影響も検討したいのでできるだけ多くの検体で実施してください。
 - ・過去のNested-PCRでの検査との整合性を確認してください。

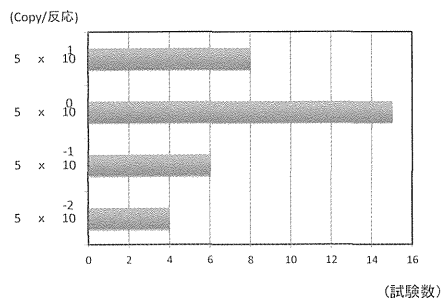
25

Real time PCRの検量線の解析

項目	求められる範囲	規格に対する適合率
スロープ	-3.1 ~ -3.8	100% (33/33)
検量線のR ² 値	0.98 以上	97% (32/33)
Standard RNA 5 × 10 ² の検出	Ct ≤ 40	100% (33/33)

26

検出されたStandard RNA (≤40)



27

試験法の違いによる試験の感度、特異度の比較

結果	試験方法	手順書と同じ (4施設)	その他 (7施設)
5 (copy/反応)で検出不可 (Ct > 40)		0/12 = 0%	9/21 = 42.9%
陰性対照(水)でも検出 (Ct < 40)		0/12 = 0%	4/21 = 19%
0.5(copy/反応)以下が検出可能 (Ct < 40)		1/12 = 8.3%	9/21 = 42.9%

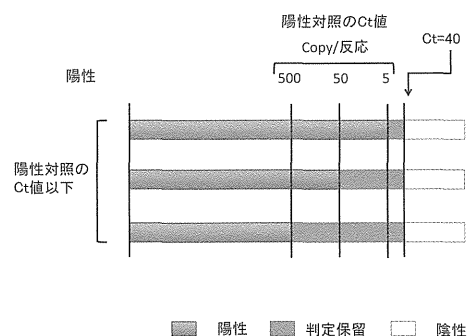
28

結果と機器・試薬の関係

	機器	試薬
良好な結果が得られた機器、試薬の組み合わせ	ABI 7500 (またはABI 7500 Fast)	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
	ABI 7500 (またはABI 7500 Fast)	QuantiTect Probe RT-PCR kit
	ABI 7500 Fast	One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time)
	Roche LightCycler 480 system II	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix
	ABI stepOne Plus	QuantiTect Probe RT-PCR kit
問題が考えられた機器、試薬の組み合わせ	Roche LightCycler 480	QuantiTect Probe RT-PCR kit
	ABI stepOne Plus	TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix

29

判定方法



30

Real-time PCRとcPCRの比較解析

		Real-time PCR			
		陽性	判定保留	陰性	
				Ct > 40	反応せず
cPCR	陽性	54	7	1	3
	陰性	0	3	0	71

(N=139検体、陰性対照が陽性になった施設を除く)

31

Real-time PCRとcPCRの比較解析

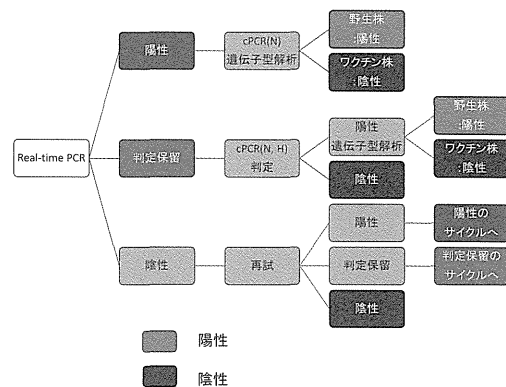
		判定保留	
		陰性に含む	陽性に含む
感度		83.1%	93.8%
特異性		100%	95.9%

32

試験成立の基準、試験法の変更

	項目	求められる範囲
試験成立条件	スロープ	-3.1 ~ -3.8
	検量線のR ² 値	0.98 以上
	Standard RNA 5 x 10 ¹ の検出	Ct ≤ 40
	陰性対照	陰性 (Ct > 40)
試験法の変更	陽性対照の調整: 5 x 10 ⁶ 及び 5 x 10 ¹ copy/反応 の2希釈を陽性対照として使用。Ct ≤ 40 となるより薄いスタンダードRNAを陽性対照とする。	

33



34

Molecular PTの問題点

- RNAの配布(方法、手間、コスト)
- 機器、試薬等の違いによる方法の調整
- 機器のメンテナンスの問題
- 精度管理の程度

35

Molecular PT(案)

- Real-time PCR
- 検量線用RNAの配布 (10⁷ copy/μL)
RNA希釈液 (10⁵-10¹ copy/μL) を作製し、real-time PCRを実施し、検量線を作成する。
→ 規格を満たす検量線が再現できるかを確認する
 - 陽性検体2、陰性検体1(FTA card)で配布
FTA cardからRNA抽出 → real-time PCRを実施 → 適切に検出できるかを確認する

36