

令和元年度 外部精度管理事業
課題2 麻疹・風疹
実施手順書
(ウイルス遺伝子配列の解析)

- 1)検体を受け取りましたら、受領後3日以内に外部精度管理事業ウェブサイト課題2のログインページ (https://eqa.niid.go.jp/R1_MR/) にて**受領手続き**を行ってください。
- 2)検体は麻疹ウイルス RNA および風疹ウイルス RNA 各1点 (合計2点) です。各ウイルス RNA は RNA 安定剤と混合させた後に乾燥させており、チューブ内で黄色乾燥物として確認できます。検体受け取り後、溶解を行うまでは凍結せず4℃にて保管してください。
- 3)各チューブのスピンドウンを行ってから200マイクロリットルの Nuclease-free water を加え、室温で15分間静置してください。その後、30秒間のボルテックスおよび10回の転倒混和 (チューブ内の溶液が完全に上下移動するように、確実にシェイクする) を行い、黄色乾燥物が完全に溶解したことを確認してください。溶解後は検査が終了するまで、検体は-70℃以下にて保管してください。
- 4)溶解後の検体を「遺伝子検出検査でそれぞれ麻疹ウイルス・風疹ウイルスの遺伝子が陽性であった RNA 検体 (RNA 抽出済み)」として取り扱い、各参加施設の方法に従ってウイルス遺伝子配列の解析を行ってください。塩基配列、遺伝子型の決定が評価項目となります。
- 5) (任意項目) 解析を行った麻疹および風疹ウイルス株について、以下の情報を基に WHO が定める方法で命名してください (病原体検出マニュアル参照のこと)。
 - 麻疹ウイルス：貴所管轄地域内で2018年3月29日に発疹が出現した患者から採取された臨床検体から RT-PCR でウイルス遺伝子が検出された。同一週に検出されたウイルスとしては2番目である。
 - 風疹ウイルス：貴所管轄地域内で2018年2月25日に発疹が出現した患者から採取された臨床検体からウイルス分離を行った。分離されたウイルスの遺伝子解析を行った。同一週に検出されたウイルスとしては1番目である。
- 6)検査終了後、本手順書2ページ以降の内容 (基本項目、検査結果入力項目、アンケート調査項目) を外部精度管理事業結果入力専用ウェブサイト (https://eqa.niid.go.jp/R1_MR/) に入力してください。また、補助データ (RT-PCR 産物の電気泳動像、シークエンス波形データならびに系統樹データ) についても同一ウェブサイトからアップロードしてください (入力の途中で保存可、のちに再開可能です)。
- 7)使用後の検体は臨床検体に準じて廃棄してください。
- 8)**令和元年10月11日金曜日 17時**までに結果の入力を完了し、必ず「確定」してください。
 - *結果入力の確定が上記締切に間に合わないと見込まれる場合は、事前に事務局に連絡をお願いします。事前の連絡無しに検査結果が未確定や未入力の場合、参加辞退と判定しますのでご注意ください。

ご不明な点やトラブルなどがありましたら、下記にお問い合わせください。

国立感染症研究所 外部精度管理事業事務局
TEL 03-5285-1111 (内線 2326)
FAX 03-5285-1272
E-mail eqa@niid.go.jp

基本項目 括弧内の入力規則に従って結果入力専用ウェブサイトにて入力してください。

- 入力者（自由記載）
- 検査実施開始日・終了日（カレンダーから選択、もしくは自由記載）
- 特記事項（自由記載）

検査結果入力項目

1. 麻疹ウイルス解析

<必須項目>

1)検体番号（半角数字5桁）：_____

2)遺伝子型（以下の25項目より選択）

(A / B1 / B2 / B3 / C1 / C2 / D1 / D2 / D3 / D4 / D5 / D6 / D7 / D8 / D9 / D10 / D11 / E / F / G1 / G2 / G3 / H1 / H2 / 決定できず)

注：決定できなかつた場合には、どの段階でうまくいかなかつたか「<任意項目>2)備考」に記載ください

3)塩基配列（決定した遺伝子型決定領域の塩基配列を入力ください：自由記載）

注：一部配列が解析できなかつた場合も解析できた範囲で配列を入力ください。混合塩基の場合はIUPACの定める表記（例：G or AはRと表記）で記載ください。

<任意項目>

1)麻疹ウイルス株名（自由記載）

注：命名に関する情報は実施手順書を参照のこと

2)備考（自由記載）

2. 風疹ウイルス解析

<必須項目>

1)検体番号（半角数字5桁）：_____

2)遺伝子型（以下の14項目より選択）

(1a / 1B / 1C / 1D / 1E / 1F / 1G / 1H / 1I / 1J / 2A / 2B / 2C / 決定できず)

注：決定できなかつた場合には、どの段階でうまくいかなかつたか「<任意項目>2)備考」に記載ください

3)塩基配列（決定した遺伝子型決定領域の塩基配列を入力ください：自由記載）

注：一部配列が解析できなかつた場合も解析できた範囲で配列を入力ください。混合塩基の場合はIUPACの定める表記（例：G or AはRと表記）で記載ください。

<任意項目>

1)風疹ウイルス株名（自由記載）

注：命名に関する情報は実施手順書を参照のこと

2)備考（自由記載）

補助データの登録

入力データの確認のため、以下の情報について登録してください。

1)RT-PCR 産物の電気泳動図

次ページの「泳動図 Powerpoint ファイル作成要領」を参考にして作成したファイルをアップロードしてください。

2)シーケンス波形データ

配列決定に用いた波形データを麻疹／風疹前半断片／風疹後半断片、フォワードプライマー／リバースプライマー／補助プライマー別にアップロードしてください。ab1 もしくは scf 形式ファイルをアップロードしてください。入力項目に該当しない場合やファイル形式が異なる場合には事務局に相談ください。

<登録項目>

1. 麻疹 フォワードプライマー
2. 麻疹 リバースプライマー
3. 風疹前半断片 フォワードプライマー
4. 風疹前半断片 リバースプライマー
5. 風疹後半断片 フォワードプライマー
6. 風疹後半断片 リバースプライマー
7. 風疹後半断片 補助プライマー (使用した場合のみ)

3)遺伝子型決定に用いた系統樹図

pdf または Powerpoint ファイルでアップロードしてください。

泳動図 Powerpoint ファイル作成要領

1. 外部精度管理事業ホームページ (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/reference/eqa.html>) から泳動図例 Powerpoint ファイル (R1_eqa_MR_EP_image.ppt) をダウンロードしてください。
2. 麻疹検査と風疹検査でそれぞれ 1 枚のスライドページを作成し、1 つのファイルにまとめてください。
3. 後述の記載例に従って、電気泳動写真画像を貼り付け、説明を追加してください。
4. 作成したファイルを保存し、結果入力専用ウェブサイトにて、ファイルをアップロードしてください。

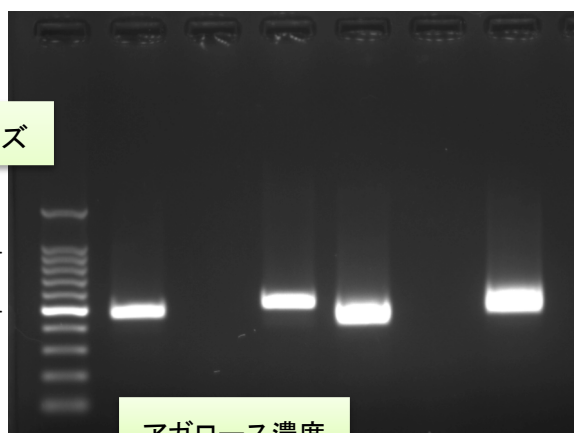
施設名

麻疹ウイルスまたは風疹ウイルス

国立感染症研究所 風疹ウイルス遺伝子型決定領域増幅RT-PCR産物 泳動図 (例)

レーン番号

1 2 3 4 5 6 7



マーカーサイズ

1.0kb -

0.5kb -

アガロース濃度

(1.5% agarose gel)

特記事項

報告事項があれば、こちらに記載して下さい

各レーンの説明

1. 100 baseラダーマーカー
2. 麻疹検体_E1-(2)
3. ネガティブコントロール_E1-(2)
4. ポジティブコントロール_E1-(2)
5. 麻疹検体_E1-(3)
6. ネガティブコントロール_E1-(3)
7. ポジティブコントロール_E1-(3)

2, 3, 4は、病原体検出マニュアル記載のE1-(2)断片増幅RT-PCRの産物、5, 6, 7は同じくE1-(3)断片増幅RT-PCRの産物である。いずれもRT-nested PCR産物を電気泳動した。

用いた RT-PCR 法について、1st PCR もしくは Nested PCR の産物のどちらを泳動したか等を簡単にご説明ください。

アンケート調査項目 以下の回答はトラブルシューティングに活用されます。

麻疹

■遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR

○方法（以下の3項目より選択）

病原体検出マニュアル

病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）

その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

○用いた試薬を選択ください。

注：逆転写反応と PCR を一回の反応で行う試薬の場合は、<RT 試薬>から選択ください。その場合、<1st PCR 試薬>では<非該当>を選択ください。Nested PCR を実施しなかった場合には<非該当>を選択ください。

・RT 試薬（以下の15項目より選択）

PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time)

PrimeScript Reverse Transcriptase

PrimeScript II Reverse Transcriptase

Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR

SuperScript II Reverse Transcriptase

SuperScript III Reverse Transcriptase

SuperScript IV Reverse Transcriptase

ReverTra Ace qPCR RT

ReverTra Ace - α -

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit

SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase

SuperScript IV One-Step RT-PCR

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

・1st PCR 試薬名（以下の16項目より選択）

PerfectShot Ex Taq

Tks Gflex DNA Polymerase

TaKaRa Ex Taq Hot start version

TaKaRa Ex Taq

EmeraldAmp PCR master mix

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase

PrimeSTAR Max DNA Polymerase

AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase

Platinum II Taq DNA polymerase

Platinum SuperFi DNA Polymerase

- KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
- KOD -Plus- Neo
- KOD FX Neo
- 非該当
- その他（特記事項に記載）
 - 特記事項（自由記載）
- ・ Nested PCR 試薬名（以下の 16 項目より選択）
 - PerfectShot Ex Taq
 - Tks Gflex DNA Polymerase
 - TaKaRa Ex Taq Hot start version
 - TaKaRa Ex Taq
 - EmeraldAmp PCR master mix
 - PrimeSTAR GXL DNA Polymerase
 - PrimeSTAR Max DNA Polymerase
 - AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase
 - AmpliTaq Gold DNA polymerase
 - Platinum II Taq DNA polymerase
 - Platinum SuperFi DNA Polymerase
 - KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
 - KOD -Plus- Neo
 - KOD FX Neo
 - 非該当
 - その他（特記事項に記載）
 - 特記事項（自由記載）

■PCR産物の精製

- 方法（以下の 3 項目より選択）
 - 溶液から直接精製
 - ゲルからの切り出し精製
 - その他（特記事項に記載）
 - 特記事項（自由記載）
- 試薬（以下の 10 項目より選択）
 - QIAquick PCR Purification kit
 - QIAquick Gel Extraction kit
 - MinElute PCR Purification kit
 - MinElute Gel Extraction kit
 - Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system
 - ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up

PureLink PCR Purification kit

PureLink Quick Gel Extraction kit

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

■シーケンス反応

○方法（以下の3項目より選択）

病原体検出マニュアル

病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）

その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

○試薬（以下の5項目より選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit

BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit

DTCS Quick Start kit

外部委託

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

■シーケンス反応産物の精製（ダイターミネーター除去）

○試薬または方法（以下の6項目より選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

Centri-Sep

AutoSeq G-50

NucleoSEQ

エタノール沈殿

外部委託

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

風疹

■遺伝子型決定領域増幅 RT-PCR

○方法（以下の3項目より選択）

病原体検出マニュアル

病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）

その他（方法を特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

○用いた試薬を選択してください。

注：逆転写反応と PCR を一回の反応で行う試薬の場合は、<RT 試薬>から選択してください。

その場合、<1st PCR 試薬>では<非該当>を選択してください。Nested PCR を実施しなかった場合には<非該当>を選択してください。

・RT 試薬（以下の15項目より選択）

PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time)

PrimeScript Reverse Transcriptase

PrimeScript II Reverse Transcriptase

Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR

SuperScript II Reverse Transcriptase

SuperScript III Reverse Transcriptase

SuperScript IV Reverse Transcriptase

ReverTra Ace qPCR RT

ReverTra Ace - α -

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit

PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit

SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase

SuperScript IV One-Step RT-PCR

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

・1st PCR 試薬名（以下の16項目より選択）

PerfectShot Ex Taq

Tks Gflex DNA Polymerase

TaKaRa Ex Taq Hot start version

TaKaRa Ex Taq

EmeraldAmp PCR master mix

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase

PrimeSTAR Max DNA Polymerase

AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase

Platinum II Taq DNA polymerase
Platinum SuperFi DNA Polymerase
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix
KOD -Plus- Neo

KOD FX Neo

非該当

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

・Nested PCR 試薬名（以下の 16 項目より選択）

PerfectShot Ex Taq

Tks Gflex DNA Polymerase

TaKaRa Ex Taq Hot start version

TaKaRa Ex Taq

EmeraldAmp PCR master mix

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase

PrimeSTAR Max DNA Polymerase

AmpliTaq Gold 360 DNA polymerase

AmpliTaq Gold DNA polymerase

Platinum II Taq DNA polymerase

Platinum SuperFi DNA Polymerase

KAPA2G Robust HotStart ReadyMix

KOD -Plus- Neo

KOD FX Neo

非該当

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

■PCR産物の精製

○方法（以下の 3 項目より選択）

溶液から直接精製

ゲルからの切り出し精製

その他（特記事項に記載）

特記事項（自由記載）

○試薬（以下の 10 項目より選択）

QIAquick PCR Purification kit

QIAquick Gel Extraction kit

MinElute PCR Purification kit

MinElute Gel Extraction kit

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system
ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up
PureLink PCR Purification kit
PureLink Quick Gel Extraction kit
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■シーケンス反応

○方法（以下の3項目より選択）

病原体検出マニュアル
病原体検出マニュアル改変（変更点を特記事項に記載）
その他（方法を特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

○試薬（以下の5項目より選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit
DTCS Quick Start kit
外部委託
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）

■シーケンス反応産物の精製（ダイターミネーター除去）

○試薬または方法（以下の6項目より選択）

注：外部委託で実施した場合は、試薬名ではなく＜外部委託＞を選択してください。

Centri-Sep
AutoSeq G-50
NucleoSEQ
エタノール沈殿
外部委託
その他（特記事項に記載）
特記事項（自由記載）