

ぶどう膜炎微生物検出検査標準作業書
(ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症
病原体検出キット)

大分大学医学部附属病院

第 1.0 版 使用開始日：2019 年 11 月 7 日 作成：眼科

目次

	(目次)	(頁)
	目次	2
1.	精度の確保に係る基準 - 必要な文書と記録	3-4
2.	検査の目的	4
3.	検査に用いられる手順の原理	5
4.	性能特性	5
5.	サンプルの種類	5
6.	患者の準備	5-6
7.	使用するキット(採取容器及び添加剤の種類、必要な設備、環境及び安全管理、校正手順、精度管理手順)	6-7
8.	操作ステップ	7-9
9.	検査結果の電子カルテへの登録	9
10.	生物学的基準範囲、警戒値及び臨床的解釈	9
11.	可能性のある変動要因	10

ぶどう膜炎微生物検出検査標準作業書 大分大学医学部附属病院	第 1.0 版	使用開始日：2019 年 11 月 7 日
----------------------------------	---------	-----------------------

1. 精度の確保に係る基準 - 必要な文書と記録

「医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について」(資料 1: 医政発 0810 第 1 号、平成 30 年 12 月 1 日施行)により、医療機関が自ら検体検査を行う場合の精度の確保に係る基準が設定された。

(1) 標準作業書及び作業日誌又は台帳に求められる基準

	文書及び記録文書	基準(記載項目)	
1	検査機器保守管理標準作業書	1) 医療機器の添付文書、取扱説明書等をもって本書とすることも認められる。	
2	測定標準作業書	必修項目	可能な限り記載する項目
		1) 定義 2) 臨床的意義 3) 測定方法及び測定原理 4) 検査手順(フロー等) 5) 基準範囲及び判定基準	6) 性能特性(測定感度、測定内変動等) 7) 検査室の環境条件 8) 検査材料(検体量、採取条件) 9) 試薬、機器、器具及び消耗品 10) 管理資料及び標準物質の取扱方法 11) 検査の変動要因 12) 測定上の注意事項 13) 異常値を呈した検体の取扱方法 14) 精度管理の方法及び評価基準 15) 参考文献 等
3	検査機器保守管理作業日誌	1) 点検日時及び点検実施者 2) 各検査機器における保守管理上確認すべき内容 3) 確認すべき事項について特に付記すべき内容 4) 業者による定期保守点検を受けた場合は、その作業内容、点検を行った業者名等	
4	測定作業日誌	1) 検査項目ごとの実施件数 2) 実施件数の内、検査エラー又は検査不具合の発生件数	
5	試薬管理台帳	1) 試薬の有効期限 2) 保管されている試薬の在庫	
6	統計学的精度管理台帳 (内部精度管理)	1) 実施日及び実施検査項目 2) 実施者 3) 実施結果(検査エラー値の考察等を含む)	
7	内部精度管理の実施 【努力義務】	1) 日々の検査・測定作業の開始に当たっては、機器及び試薬に必要な校正が行われていること。 2) 定期的に管理試料等の同一検体を繰り返し検査した時の結果のばらつきの度合いを記録及び確認し、検査結果の精度を確保する体制が整備されていること。	
8	外部精度管理台帳	1) 受検日及び外部精度管理実施主体名 実施結果をもって代替可能。	
9	外部精度管理調査の受験 【努力義務】	1) 公益社団法人日本医師会、一般社団法人日本臨床衛生検査技師会、一般社団法人日本衛生検査所協会等が行う外部精度管理調査を受けるよう努めること。	

ぶどう膜炎微生物検出検査標準作業書 大分大学医学部附属病院	第 1.0 版	使用開始日：2019 年 11 月 7 日
---	---------	-----------------------

10	適切な研修 【努力義務】	1) 適切な研修に努める上では、研修は検体検査の業務を適切に行うために必要な知識及び技能を研修することを目的とし、次に掲げる事項を含むものとし、内部研修に留まることなく、外部の教育研修の機会も活用するよう努めること。 ① 各標準作業書の記載事項 ② 患者の秘密保持
----	------------------------	--

※1 作業日誌(3.4)の記録頻度：検体検査を実施した都度又は週～月単位が望ましい。

※2 各作業日誌及び各台帳については、作業の内容に応じて整理統合して差し支えない。

※3 努力義務：地域医療への影響等を勘案し、まずは努力義務としたところであるが、これらは精度の確保の方法として重要な手法であり、積極的に活用すべきである。

(2) ぶどう膜炎微生物検出検査に求められる基準

	文書及び記録文書	要否	備考
1	検査機器保守管理標準作業書	○	添付文書・取扱説明書
2	測定標準作業書	○	本作業書
3	検査機器保守管理作業日誌	○	
4	測定作業日誌	○	1) 実施件数 検体検査を実施した都度、検査者が結果記録。
		●	2) 検査エラー又は検査不具合の件数 検査者が結果記録。
5	試薬管理台帳	○	
6.7	統計学的精度管理台帳 (内部精度管理)	○	GAPDH
8.9	外部精度管理	×	2019 年 11 月現在、適切な外部精度管理システムが存在しないことから対象から除外。
10	適切な研修	○	測定部署で個別に指導。

2. 検査の目的

眼内液（前房水・硝子体）中の病原体の検出。（病原体感染の診断の補助）。

対象：単純ヘルペスウイルス 1 型・2 型(HSV1・2)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、Epstein - Barr ウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6)、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(HTLV-I)、梅毒、トキソプラズマ

ぶどう膜炎微生物検出検査標準作業書 大分大学医学部附属病院	第 1.0 版	使用開始日：2019 年 11 月 7 日
----------------------------------	---------	-----------------------

3. 検査に用いられる手順の原理及び測定法

本製品は、リアルタイム PCR 法を測定原理とした ぶどう膜炎の原因となる微生物の遺伝子を定性的に検出するための研究用試薬である。1 回の反応で 9 種類の微生物（HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HTLV-1, 梅毒, トキソプラズマ）を同時に検出することができる。8 連ストリップ に検出に必要なプライマー・プローブおよび PCR 酵素を固相化しており、前房水などの細胞組織をほとんど含まないサンプルは、核酸抽出せずに、付属の(PCR Reagent と混合して、添加するだけで反応を開始できる。

コントロールおよび各病原体の増幅曲線（Cq 値の検出の有無）から解析結果を判断する。内部コントロールである GAPDH の Cq 値が検出される場合、対象の病原体の Cq 値の有無で陽性または陰性の判定が行える。GAPDH の Cq 値が検出されない場合は、検体由来の反応阻害の影響などで判定不能のため、再解析が必要である。Cq 値の算出法は、ベースライン閾値解析法（閾値と増幅曲線の交点を Cq 値とする。）を用いる。

引用文書：島津製作所 ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症 病原体検出キット 取扱説明書

4. 性能特性

	性能特性	添付文書・安全データシート (SDS)
1	感度試験	100 コピー／反応
2	正確性試験	●記載事項なし。
3	同時再現性試験	測定内再現精度：0.1～2.6% 測定間再現精度：0.5～1.0%
4	最少検出感度	100 コピー／反応
5	交差反応性試験	●記載事項なし。
6	血清型との反応性	●記載事項なし。
7	相関試験成績	●記載事項なし。
8	注意事項	●添付文書注意事項・安全データシート (SDS) 参照

引用文書：引用文書：島津製作所 ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症 病原体検出キット 取扱説明書・安全データシート (SDS)

5. サンプルの種類

前房水または硝子体

6. 患者の準備 (感染予防対策)

該当なし

7. 使用する検査キット

(採取容器及び添加剤の種類、必要な設備、環境及び安全管理、校正手順、精度管理手順)

7.1 ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症病原体検出キットの構成

- (1) Detection Reagent WHITE (左)
- (2) PCR Reagent (右)



単純ヘルペスウイルス1型・2型(HSV1・2)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、Epstein - Barr ウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6)、ヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-I)、梅毒、トキソプラズマ

6FAM	GAPDH	HSV1	HSV2	EBV	HTLV-1	トキソプラズマ		
ROX	TBP	VZV	HHV6	CMV	梅毒			

※GAPDHはPCRの陽性コントロール、TBPは検体採取のコントロール(細胞数を反映)

7.2 感染性ぶどう膜炎微生物検出キットの保存方法、有効期限

- (1) 保存方法 2℃～8℃ にて保存、直射日光・高温多湿を避ける。
- (2) 有効期限 包装袋のラベルに記載

7.3 検査に必要な設備

- (1) マルチプレックスPCR装置 (FAM・ROXが測光可能であること)
- (2) マイクロピペットおよびフィルター付きチップ (20μLが計測可能であること)
- (3) プレートシェイカー
- (4) 小型遠心機 (0.2ml 8連ストリップチューブ、1.5ml/2.0ml チューブ用)
- (5) タイマー (3分間計測可能であること)

7.4 検査に必要な環境及び安全管理

- (1) 他者への感染に関して配慮がなされている環境であること。
- (2) 検体は、HIV・HBV・HCV等の感染の危険があるものとして取り扱い、接触感染予防対

<p>ぶどう膜炎微生物検出検査標準作業書 大分大学医学部附属病院</p>	<p>第 1.0 版</p>	<p>使用開始日：2019 年 11 月 7 日</p>
--	----------------	------------------------------

策を実施する。

- (3) 検体抽出液や調整後の検体が操作中に誤って目や口に入らないように、また皮膚に直接付着しないように注意すること。マスクを着用し、診察や処置・ケア等の前後の手指衛生を徹底する。万一目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けること。
- (4) 使用した試薬は感染性廃棄物として廃棄すること。
- (5) 検体等により汚染された場所は、次亜塩素酸ナトリウム(1000ppm 以上)にて消毒すること。

感染予防対策マニュアル ウイルス性疾患（水痘・播種性帯状疱疹、麻疹、風疹、流行性耳下腺炎）症例発生時の院内感染防止対応マニュアル参照

7.5 校正手順、精度管理手順

内部コントロールである GAPDH の C_q 値が検出されることを確認すること。

引用文書：島津製作所 ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症 病原体検出キット 取扱説明書

引用文書：第 73 回日本臨床眼科学会_インストラクションコース資料

8. 操作ステップ

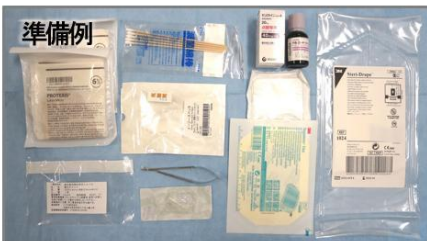
8.1 検体採取

引用文書：第 73 回日本臨床眼科学会_インストラクションコース資料

- 具体的な検体採取方法

前房水 房水ピペット推奨

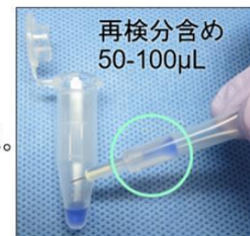
硝子体内注射に準じて、洗眼液(PAヨード20mL+生食80mL)、点眼麻酔、房水ピペット(ニプロ, NIP-021, 100本, 定価72,000円)・ない場合は1ccシリンジ+ 30G針で代用、採取容器(エッペンドルフ, 0030 121.589, 100本, 定価4,000円が便利)、開瞼器、ドレープ、ハサミ、滅菌綿棒(対側で眼球固定)、ガーゼ、手袋などを準備。



- ① 点眼麻酔後、洗眼し、ドレープ・開瞼器をかける。
- ② 房水ピペットをつまむ。



- ③ 綿棒などで眼球を固定、角膜輪部から前房内刺入、ゆっくりと指を緩める。助手に100μL=0.5cmで声掛けしてもらおうと安心。



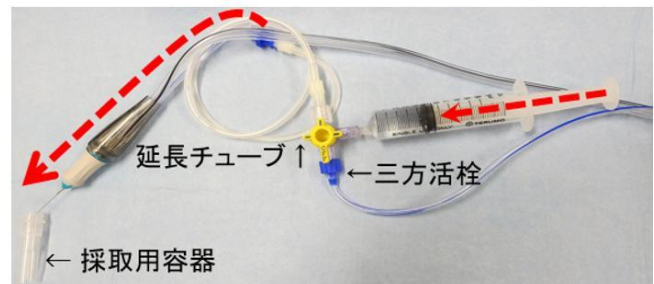
- ⑤ 針を抜き、出血等の異常が無いか確認。
- ⑥ 検体は清潔操作で保存容器に入れる。
- ⑦ 冷凍保存。



硝子体 (東京医科歯科大学 高瀬 博先生)

1. プライミング後、吸引ラインの灌流液を吸引除去。
2. カッターの接続部に三方活栓を接続。
3. 灌流ポート作成、カニユーラを接続し、灌流準備。
4. 無灌流下で硝子体切除。
5. チューブ内の硝子体が100μL(約10cm)になれば、カッターを外して灌流開始。
6. 三方活栓にシリンジをつけ、シリンジ内の空気で硝子体をチューブに押し出す。

※ リンパ腫検査もある場合は予め延長チューブを接続、最大2ml採取可能。



● 検体保存

20μL以上の検体を採取し、清潔操作で滅菌チューブ(例:セーロックチューブ・バイオピュア 1.5mL エッペンドルフ, 0030 121.589 など、個包装が望ましい。)に入れて冷凍庫保存。凍結融解を繰り返さない。(冷凍後約 2 週間は検査に影響しない)

8.2 キットの操作及び判定方法

引用文書：第 73 回日本臨床眼科学会 インストラクションコース資料

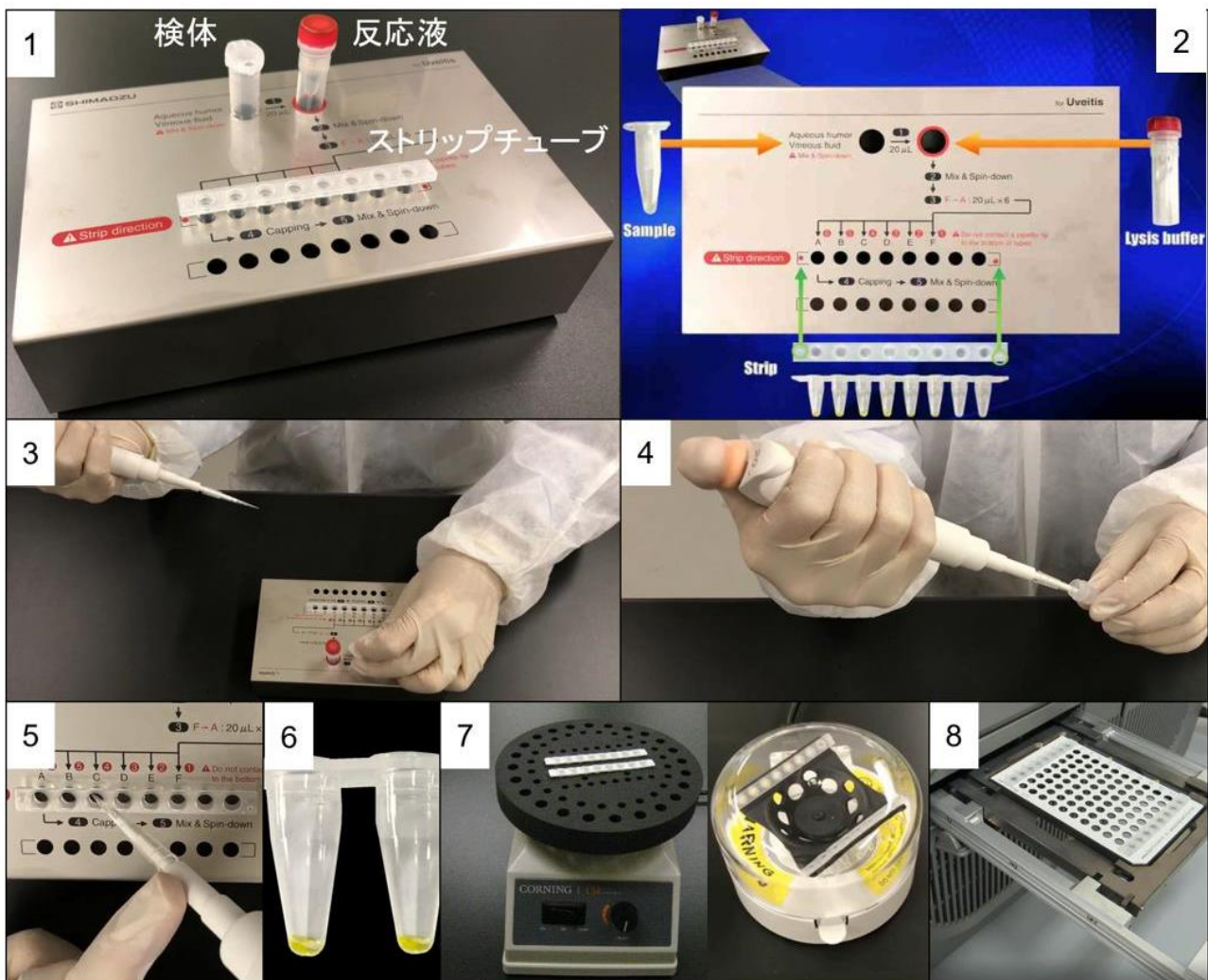
引用文書：島津製作所 ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症 病原体検出キット 取扱説明書

引用文書：大分大学眼科 ホームページ

● 試薬調整方法

概ね 10 分以内で操作を行う。

1. 2. 検体（前房水・硝子体）・反応液（PCR Reagent）・ストリップチューブ（Detection Reagent WHITE）を試薬立て（島津製作所）にセットする。
3. チップを付けたピペットで、検体 20 μ L（PCR Reagent）を反応液のチューブに添加する。
4. ピペッティングにて攪拌。（10 回程度）
5. チップを変えず、上記 4 を、シールを剥がしたストリップチューブ（Detection Reagent WHITE）の F ウェルから A ウェルの順に各 20 μ L ずつ分注する。
6. ストリップチューブの底にコーティングされた試薬に、チップの先が触れないよう注意する。
7. ストリップチューブ（Detection Reagent WHITE）にキャップを取り付けた後、プレートシェイカーで3分間しっかり攪拌し、ストリップ底に固定化された試薬を溶解した後、小型遠心機でスピンドウンする。
8. 直ちにマルチプレックス・リアルタイム PCR 装置にセットして、反応を開始する。



●PCR 増幅条件

温度 時間

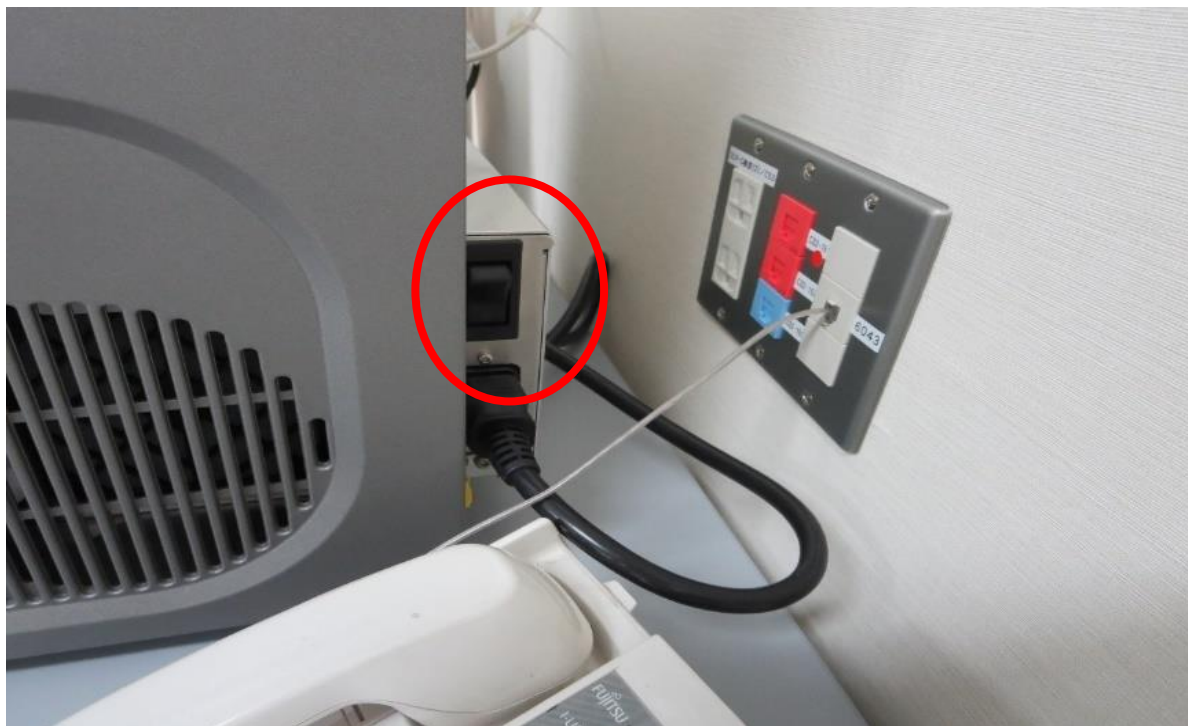
95°C 10 秒

↓

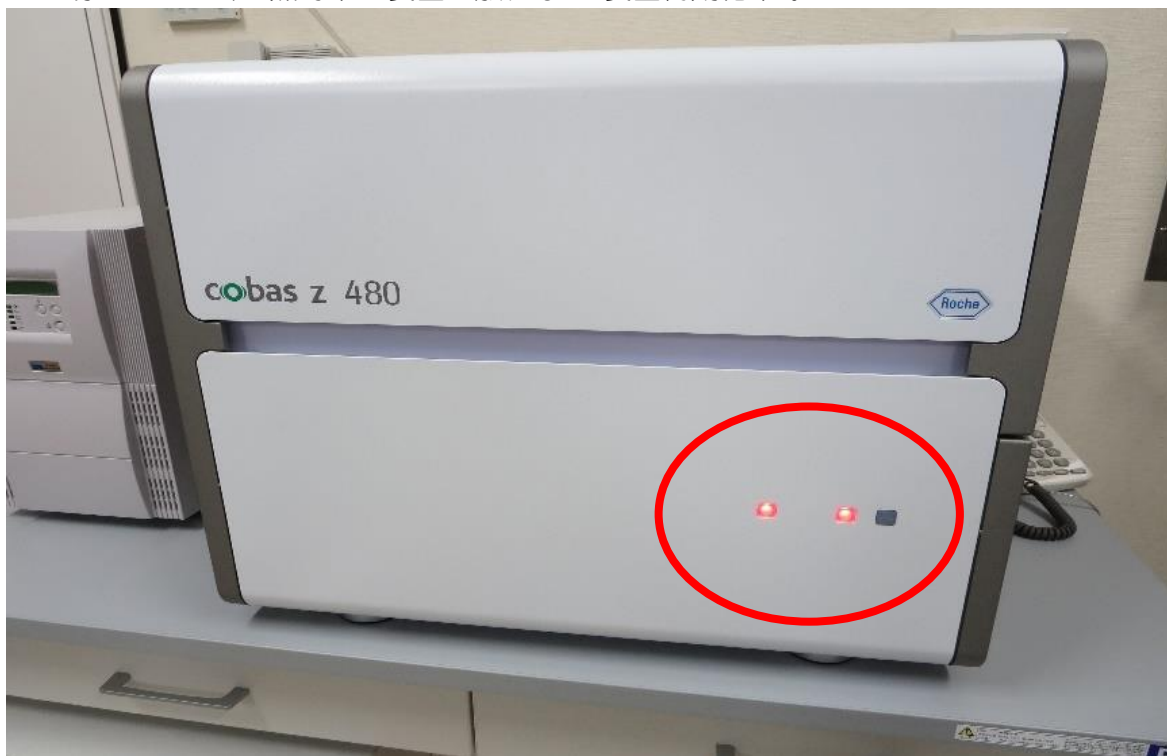
95°C 5 秒 60°C 20 秒 ×45 サイクル

●LightCycler 480/コバス z480 研究用アプリケーション 使用手順
測定 (Run)

1. 本体後ろにある電源スイッチを ON にする。



(注) 赤ランプ(2 個)点灯中は装置に触れない(装置初期化中)。



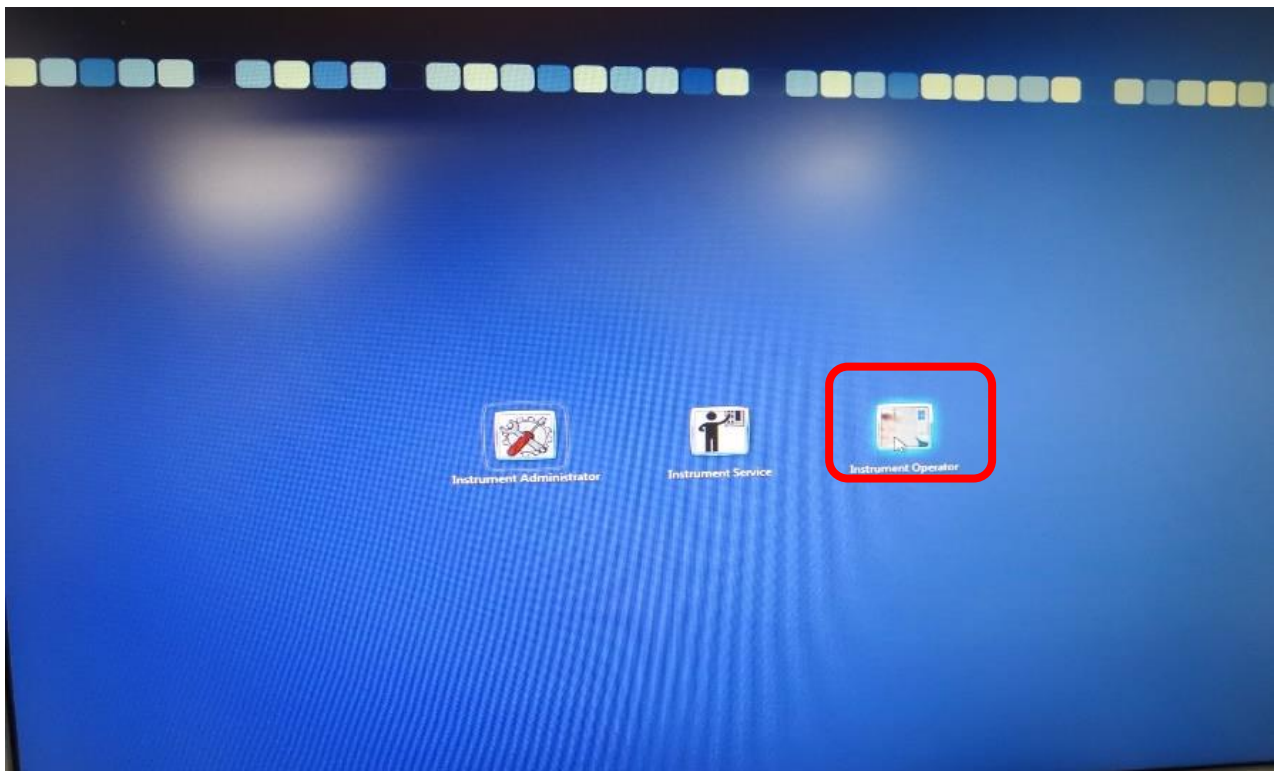
2. PC を起動する。



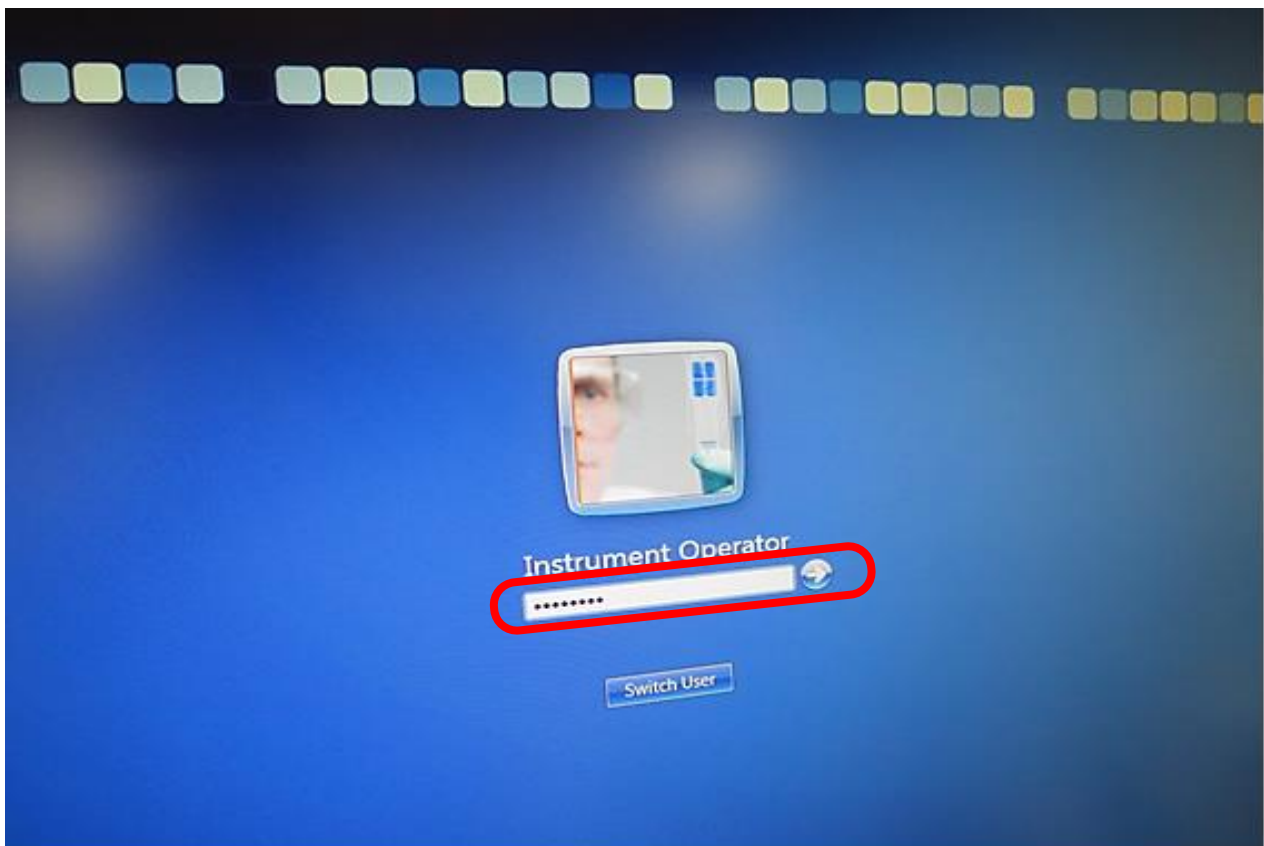
3. PC のスイッチを入れ、PC が立ち上がったらすぐに下矢印のカーソルを押して、Enter。そのまま別のプログラムがたちあがり、Light Cycler のプログラムがデスクトップ上にあらわれない。その時は再起動する



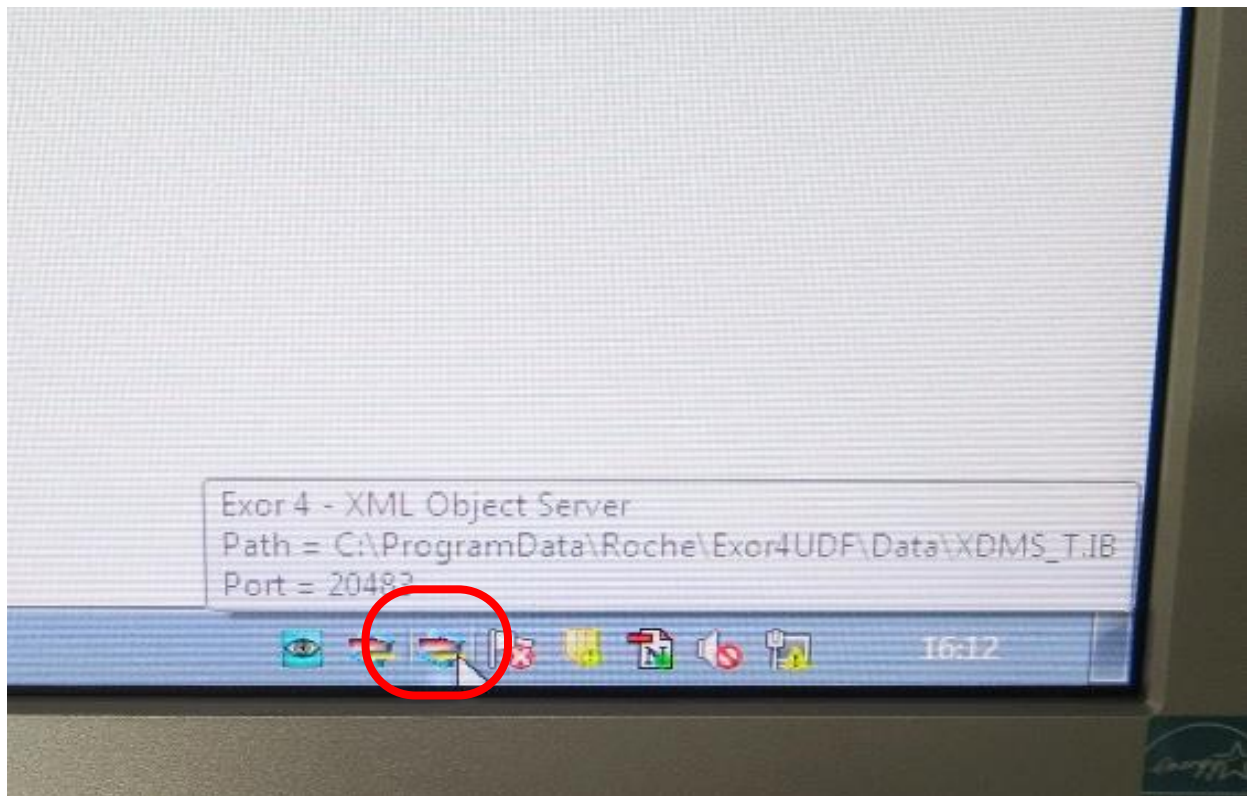
4. 右端の Instrument Operator クリック



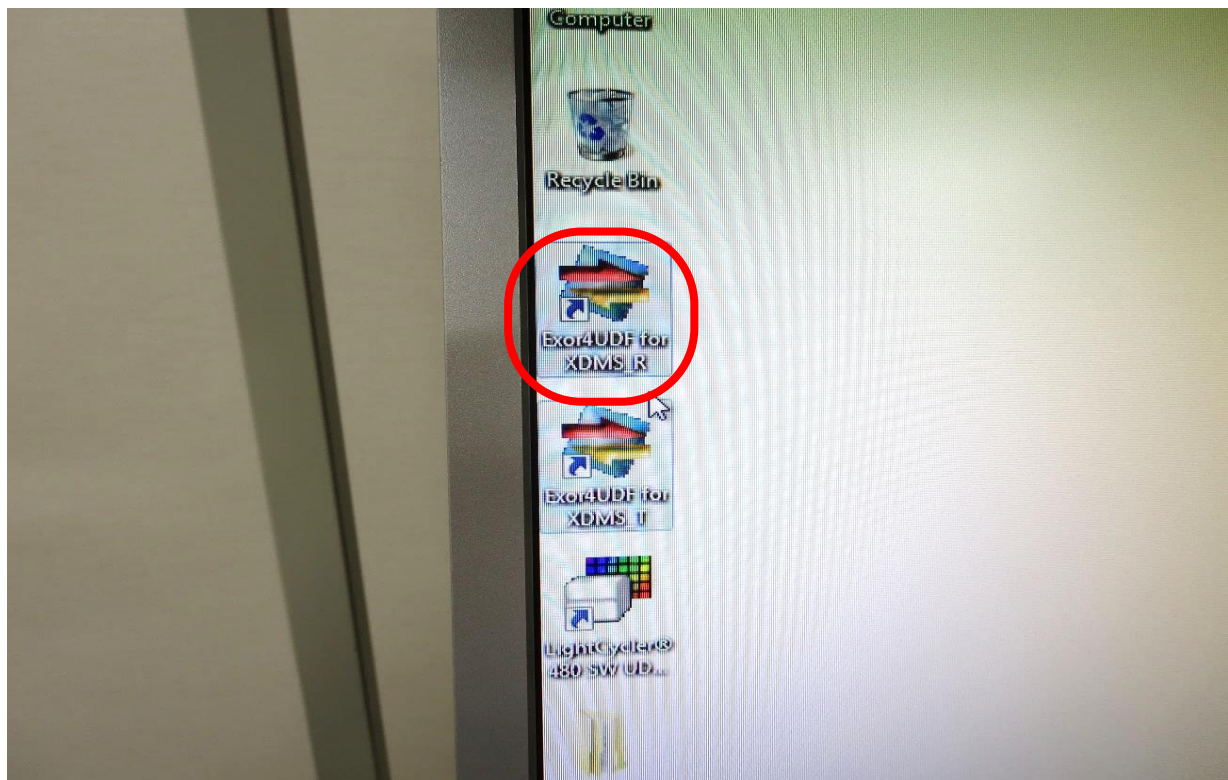
5. パスワードを入力



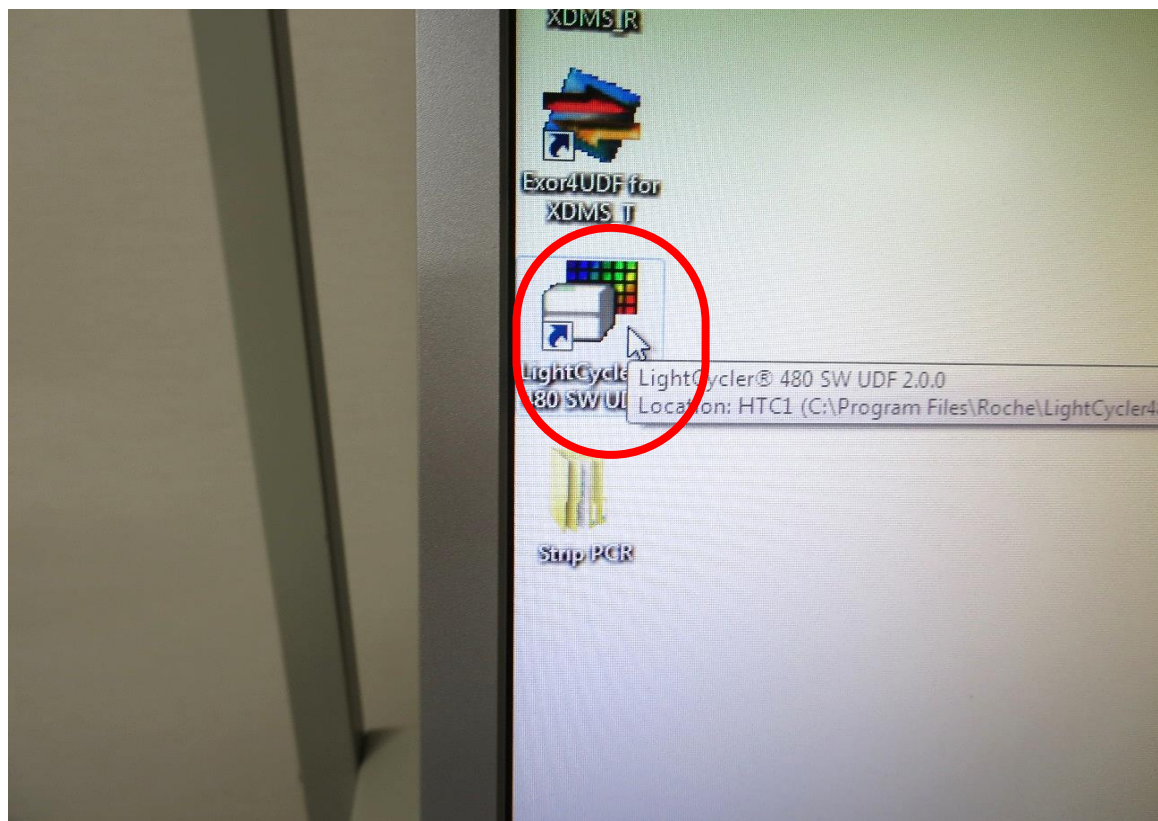
6. 通知エリアを参照し、「Exor4」が1つ起動していることを確認。



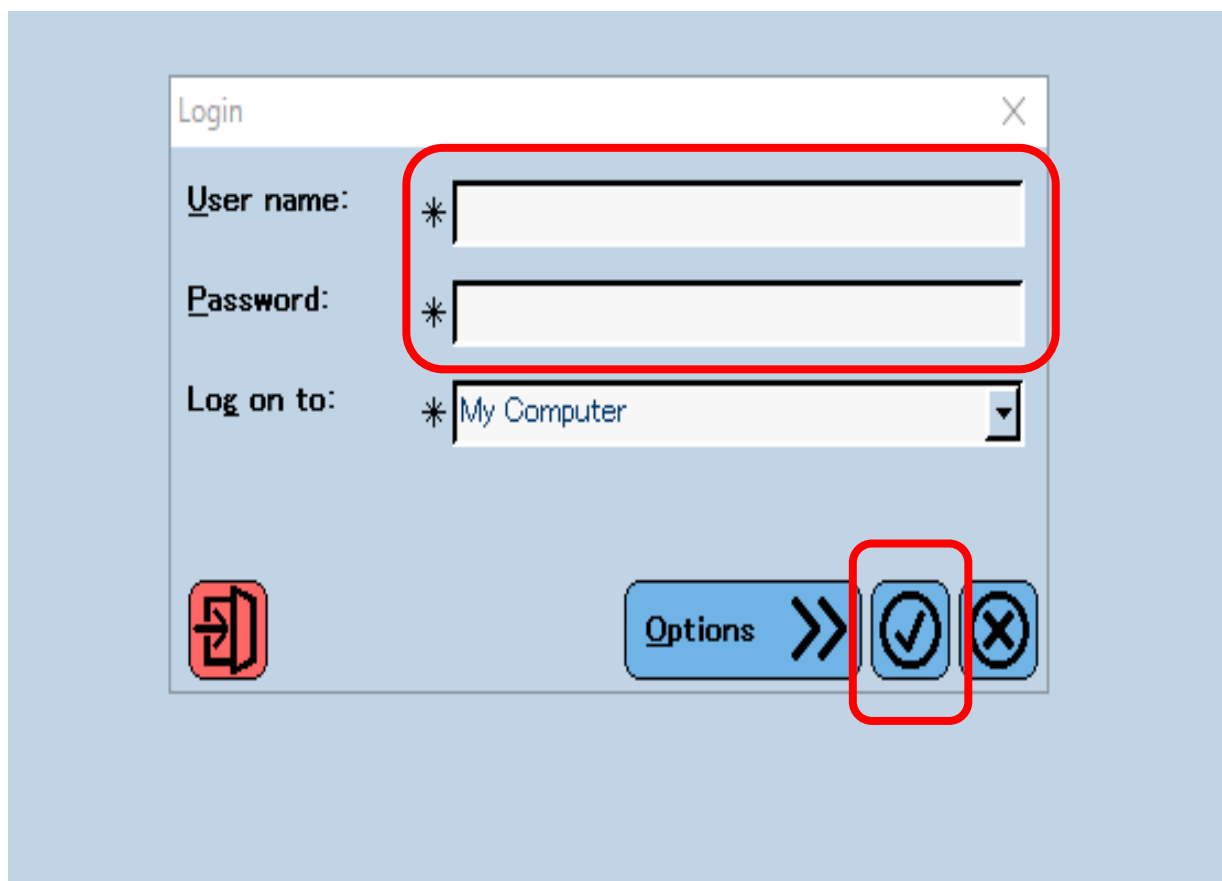
(注) アイコン表示が無い場合は、デスクトップ上のアイコンから起動する。



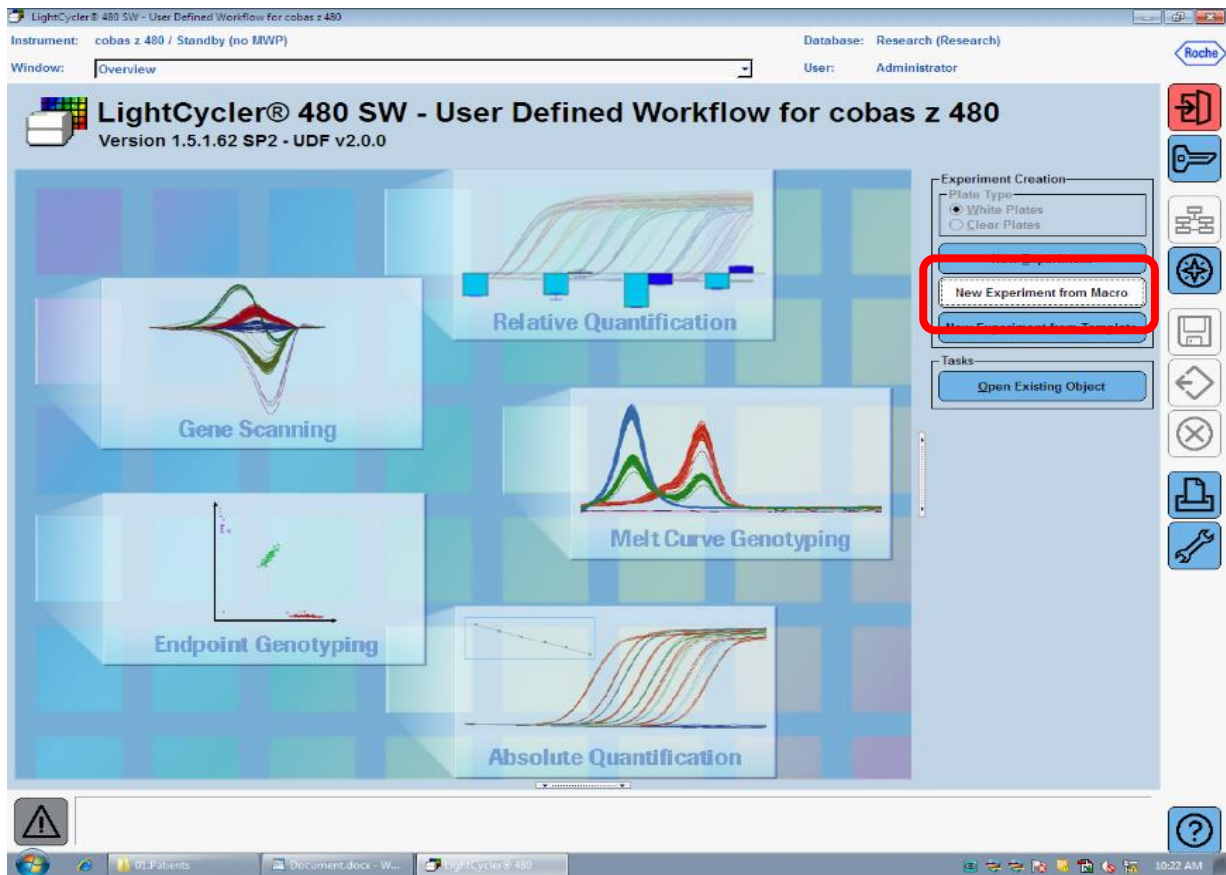
7. デスクトップ上のアイコンから LightCycler480 のソフトを起動。



ユーザー名(User name)とパスワード(Password)を入力し、✓ ボタンを押す。



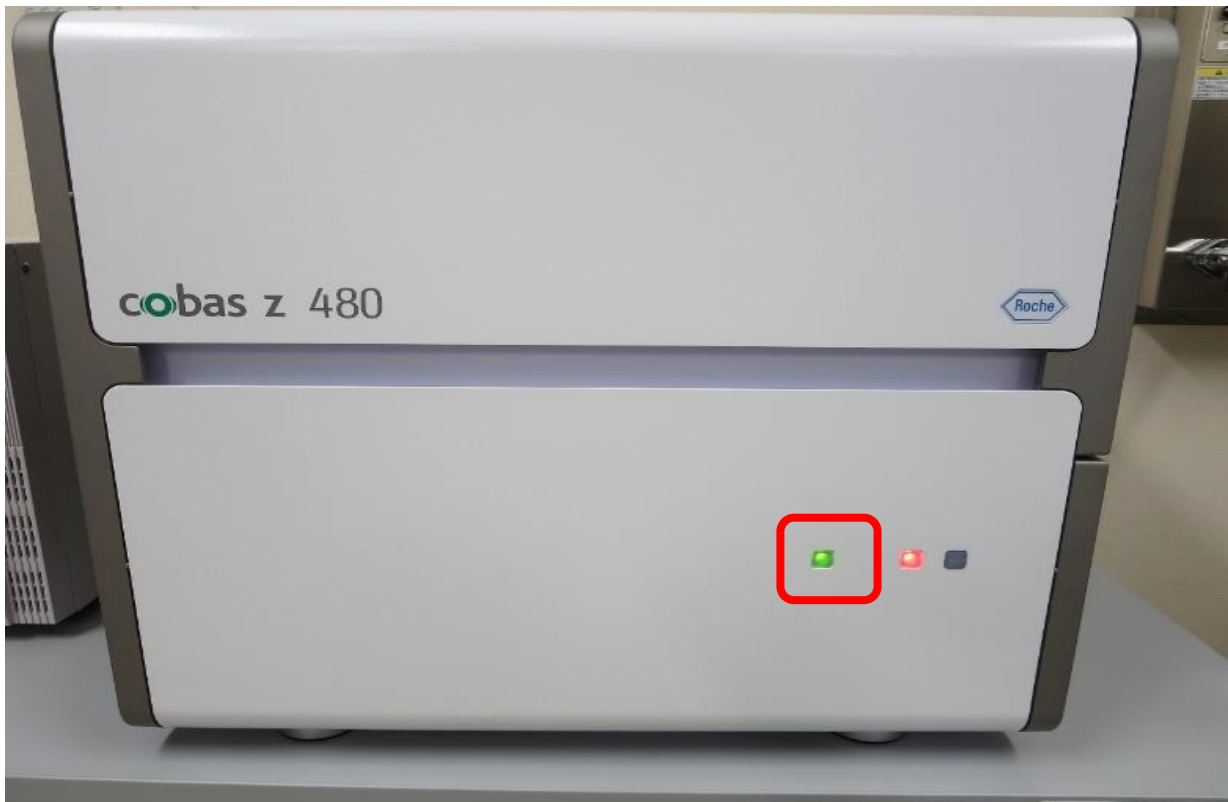
8. 「New Experiment from Macro」をクリック。



9. リストの中から「Macro_FAMROX uveitis」を選択し、✓ ボタンを押す。

Macros		
Name	Location	
Macro Cy5	/Administrator/Macros	6
Macro Cy5 AMP	/Administrator/Macros	6
Macro Cy5 AMP 8strip	/Administrator/Macros	1
Macro Cy5 kanzou	/Administrator/Macros	6
Macro FAM qPCR	/Administrator/Macros	1
Macro FAMROX cornea	/Administrator/Macros	1
Macro FAMROX uveitis	/Administrator/Macros	1
Macro FAMROX uveitis2	/Administrator/Macros	1
Macro ROX	/Administrator/Macros	6
Macro ROX ketsueki	/Administrator/Macros	6
Macro ROX noCC	/Administrator/Macros	6

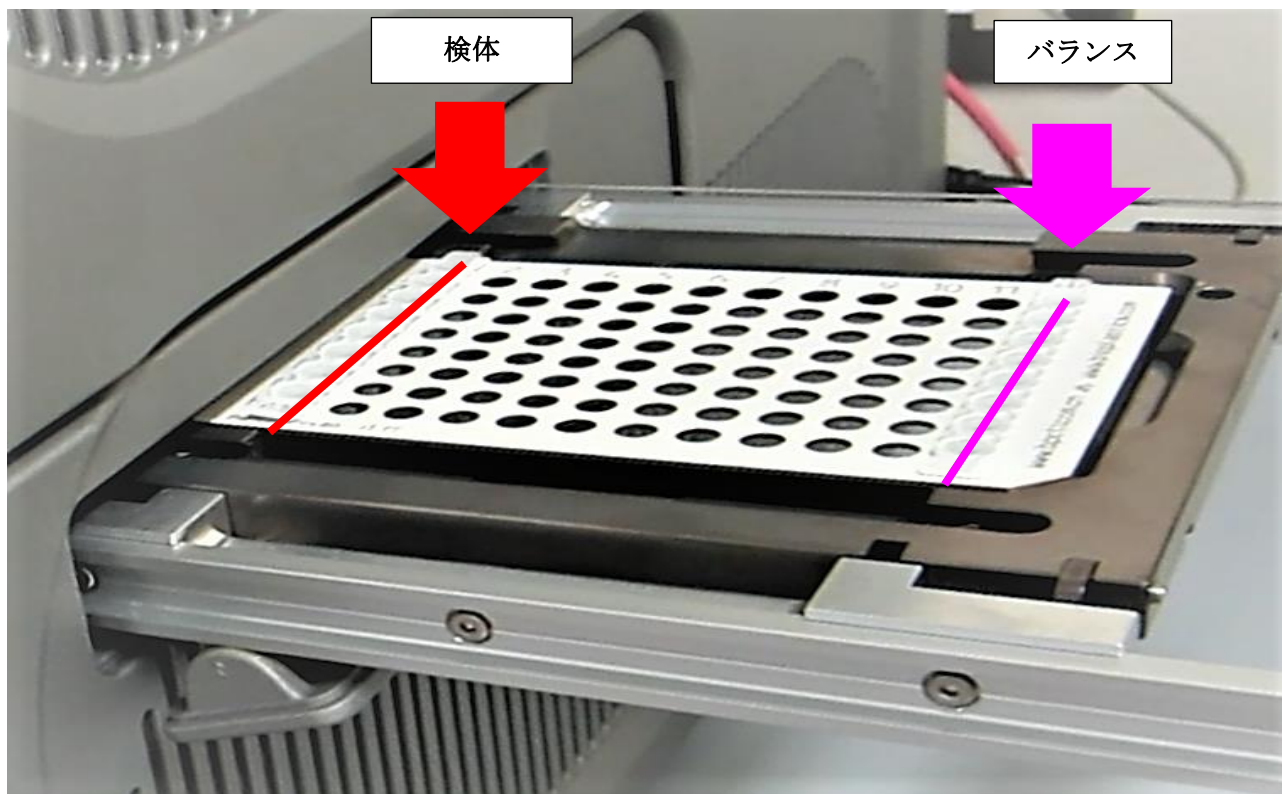
10. 装置のランプ(左側)が緑色になっていることを確認し、トレイ開閉ボタンを押す。



ボタンを押すと、トレイが出る。



11. Strip チューブ内の液体を全て指定のプレートに移しシールをして、トレイに乗せる。アダプターは不要。または、アダプターに8連チューブストリップをセットして、トレイに乗せる。



(注 1) 写真は設置例。チューブストリップはバランスよく対称となるように配置する。1 個の場合は列 1 に設置し、バランスを取るために空チューブを列 12 に設置。

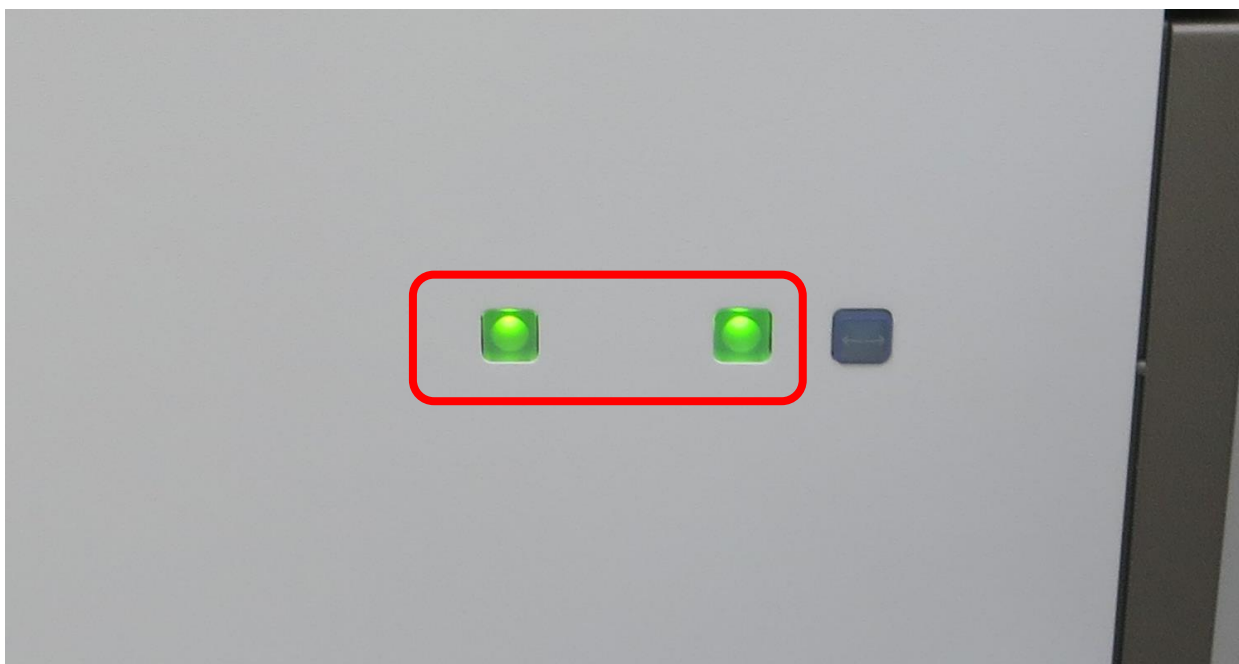
(注 2) チューブが反っている場合は、手で真っ直ぐになるように修正してから設置する。アダプターとトレイ上でチューブを押さえない。(トレイなどが破損する恐れがある)

12. トレイ開閉ボタンを押し、トレイを収納。



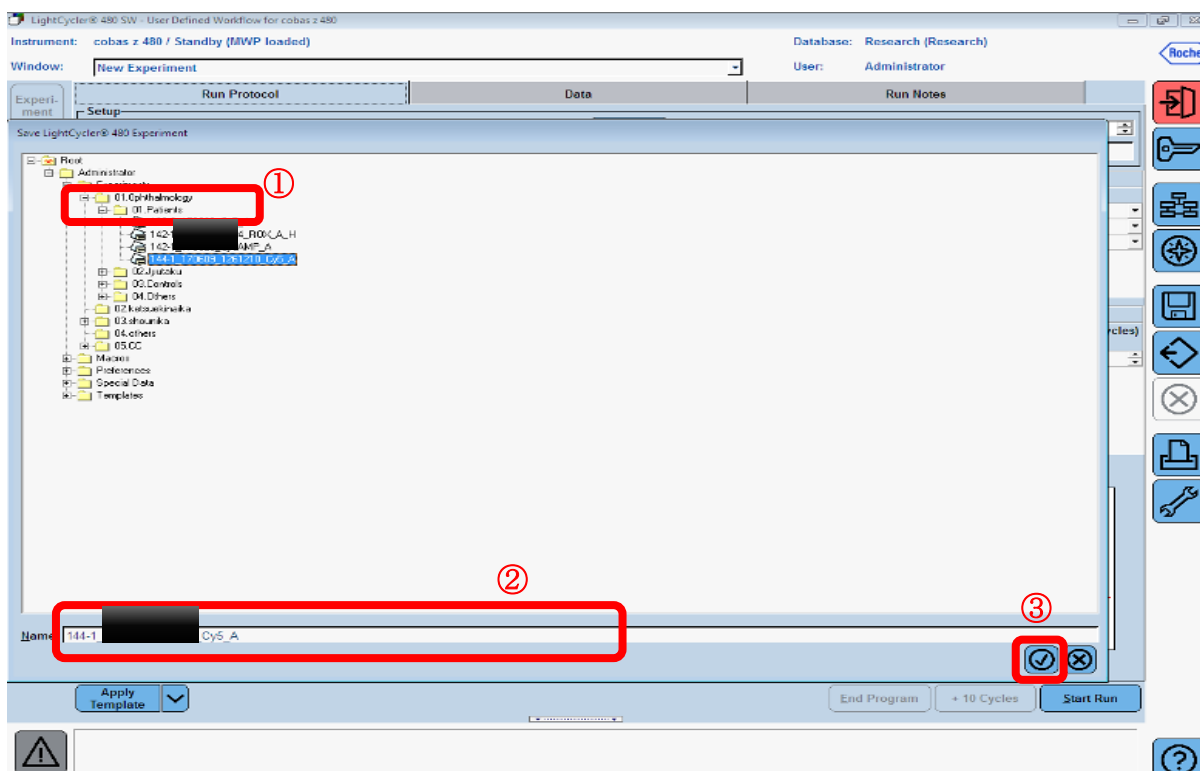
(注) トレイを手で収納しない。必ず開閉ボタンを使用する。

13. ランプが両方とも緑色に点灯していることを確認。

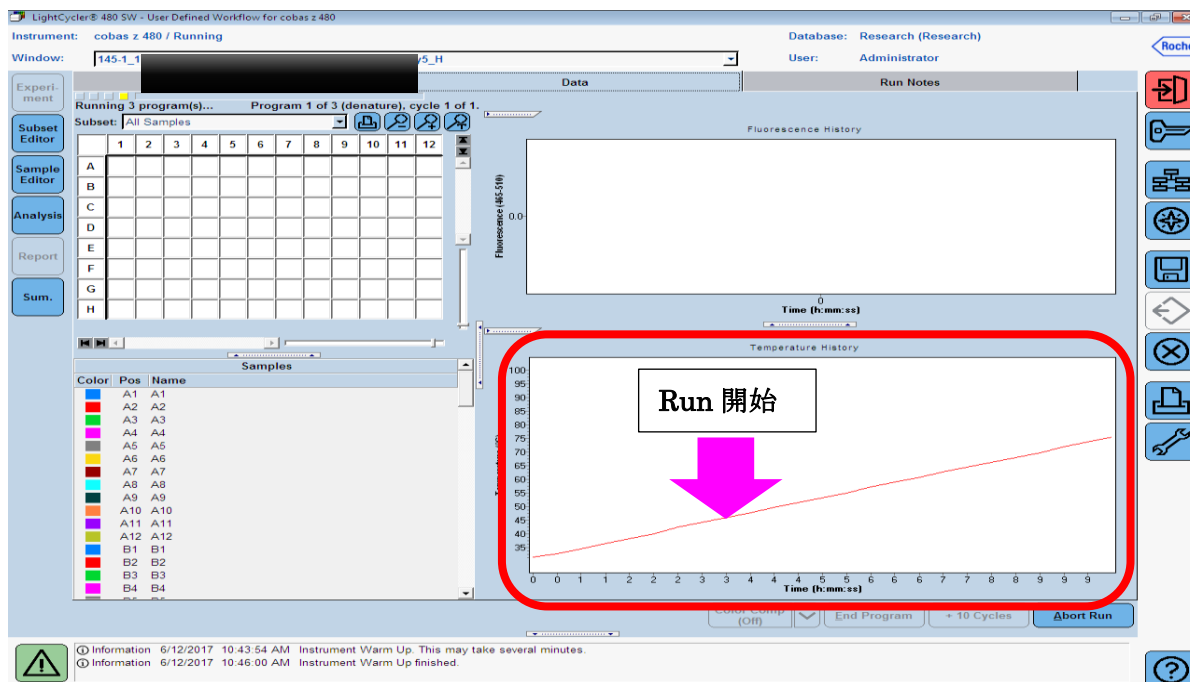


14. 測定データを保存するためのファイル名を付ける。

- ① 保存するフォルダを選択。
- ② ファイル名を入力。検査日、患者 ID、キットロット番号、検体を入れた列などを含めると便利。180302_0552266_lot121255_A など。このファイル名がカルテ用 PDF に出力される。
- ③ ✓ ボタンを押す。



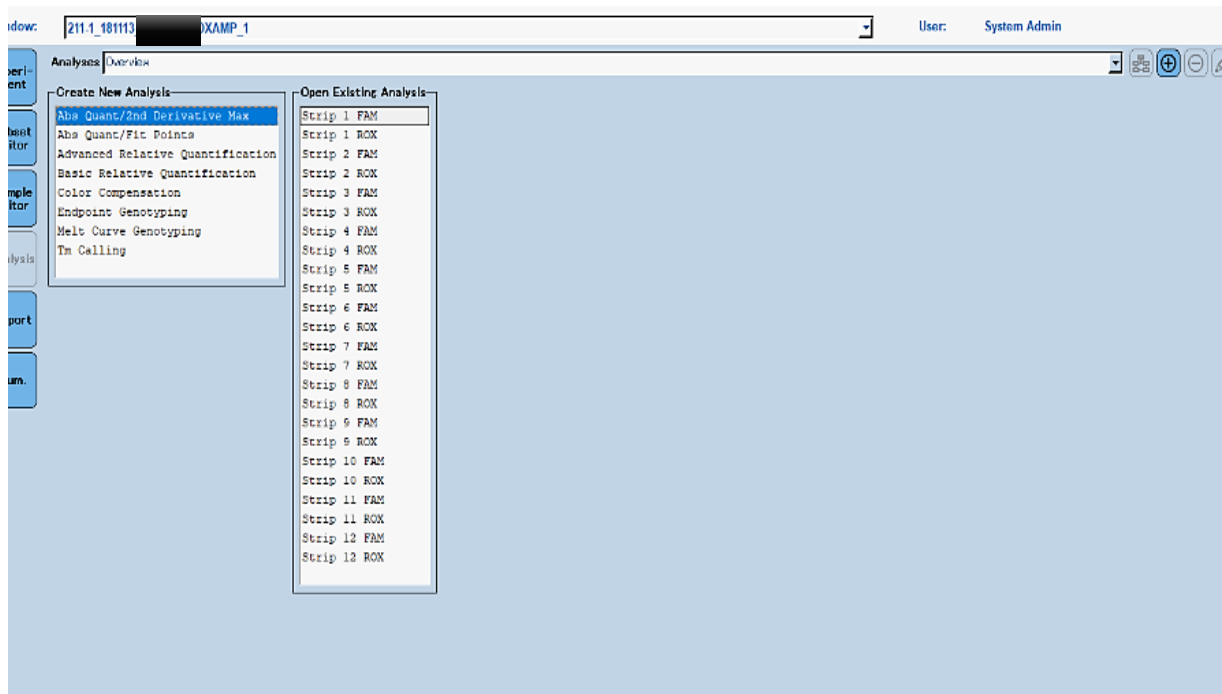
15. ここから Run 開始の蛍光が立ち上がるのを確認してから、その場を離れること。



(注) 測定(Run)に要する時間は 50 分程度。

解析 (Analysis)

1. 下記の画面が表示され、測定が終了していることを確認。

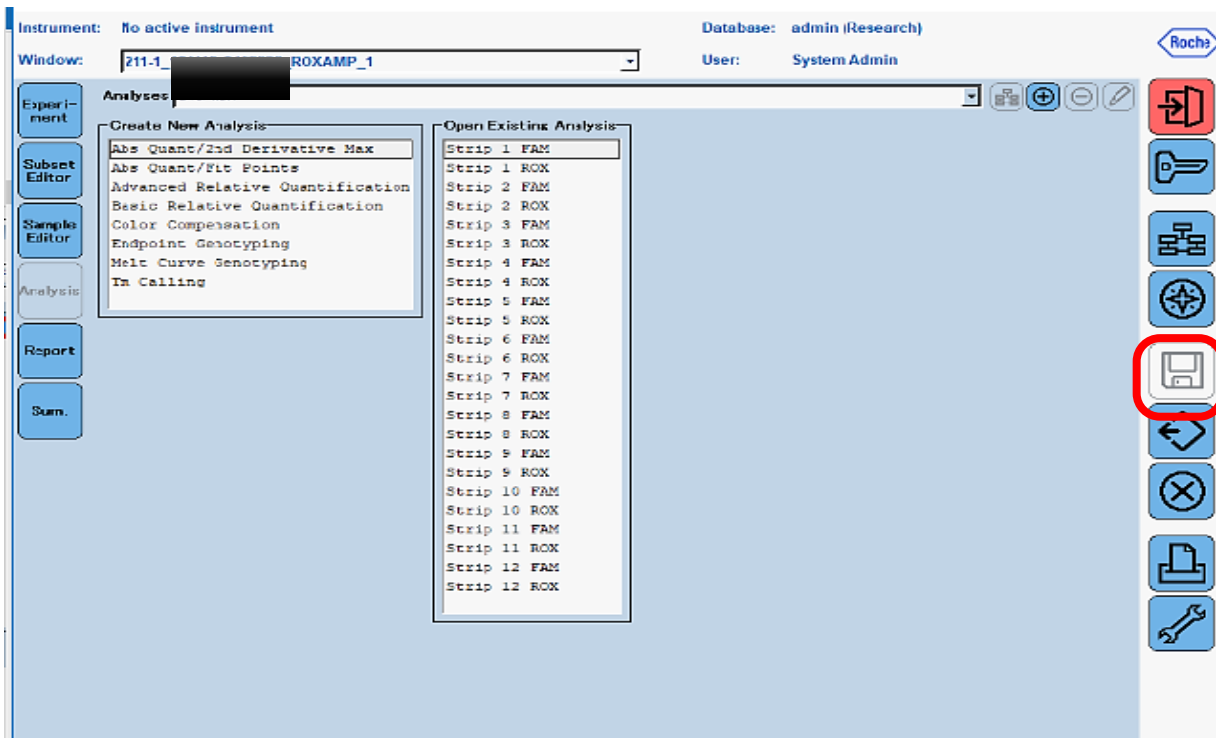


2. 閉閉ボタンを押し、装置からアダプターと 8 連チューブストリップを取り出し、再びボタンを押し、閉める。閉まったことを確認して、装置本体後ろにある電源スイッチを OFF。



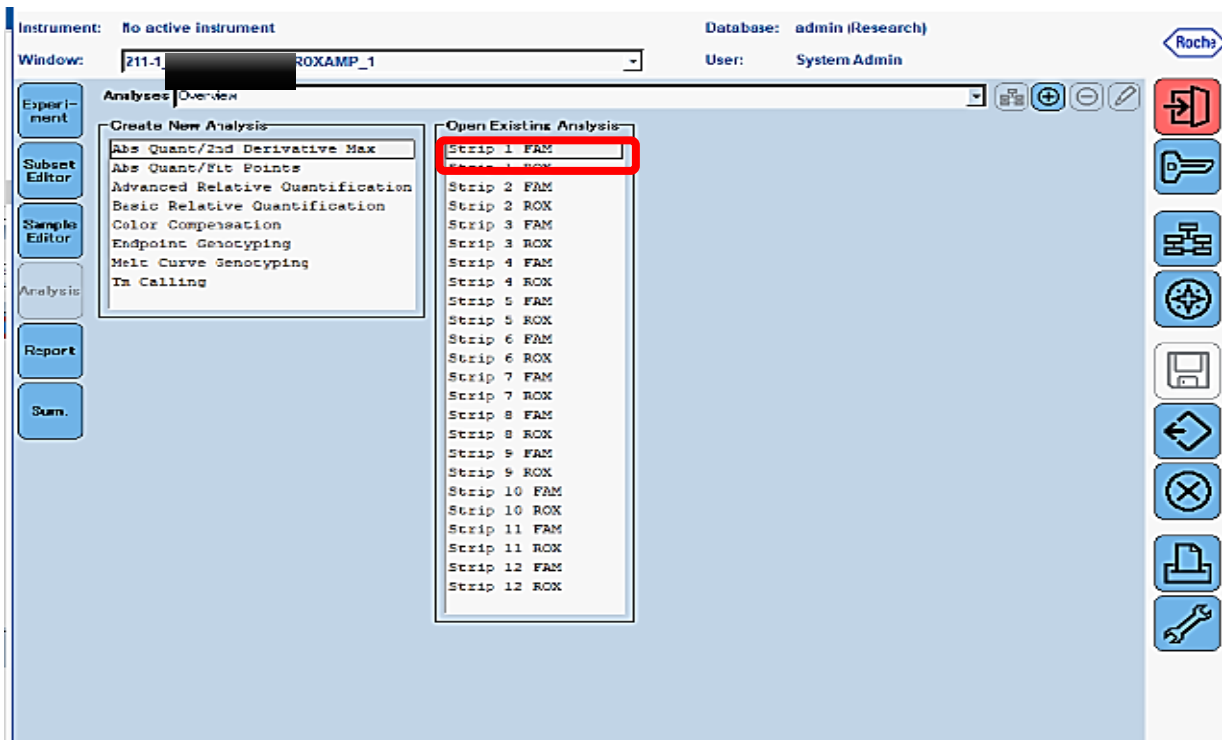
(注) 測定後のチューブはチャック付き袋に入れるなどし、内容物(PCR 増幅産物)が飛散しないように廃棄。チューブは開けない。オートクレーブは行わない。

3. データを保存。

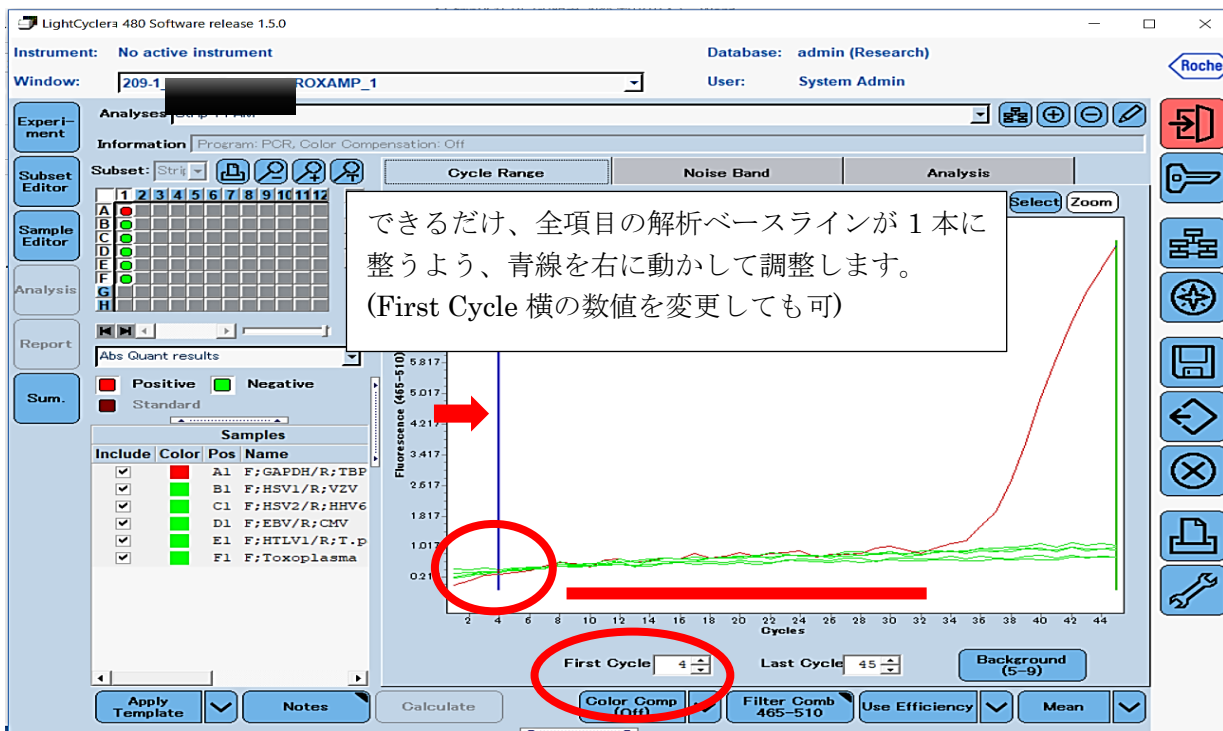


(注) 保存が終了すると、アイコンがグレイアウト表示になる。

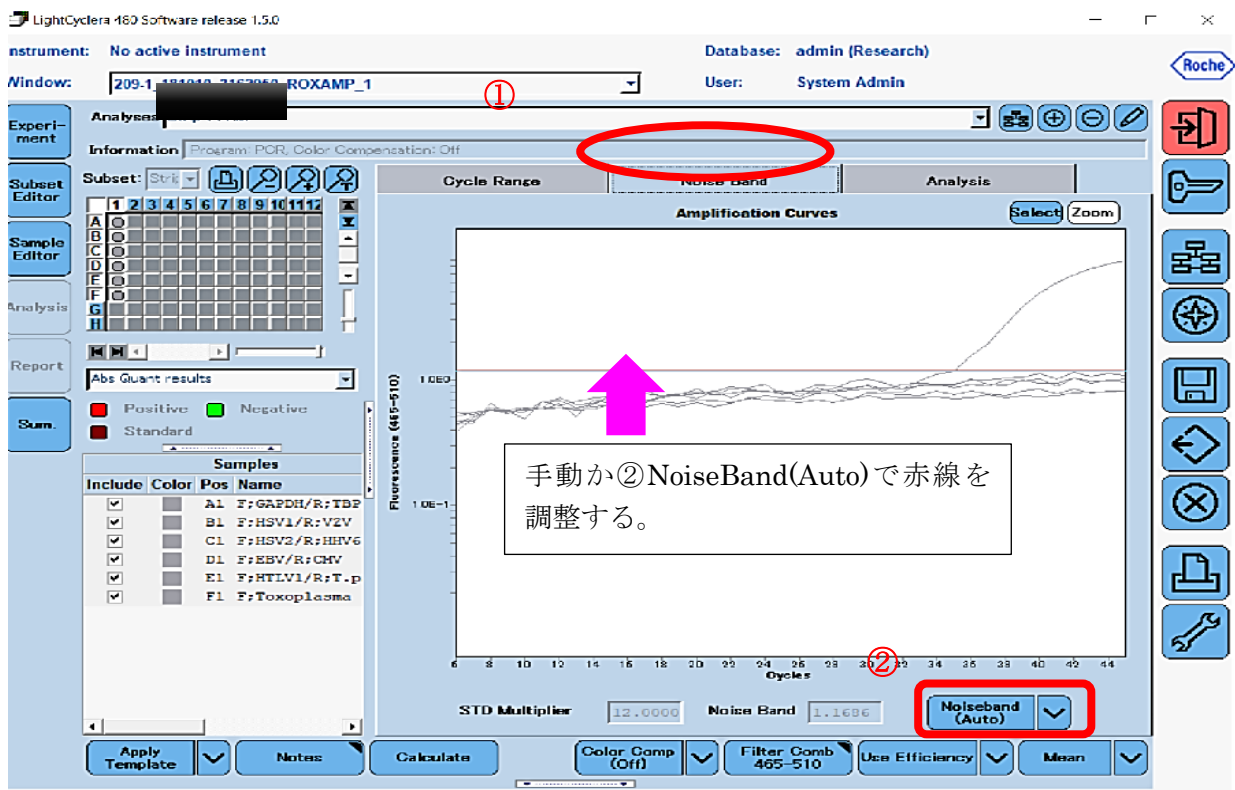
4. 解析を、FAM、ROX の順に行う。測定チューブを入れた列のFAM を選択。



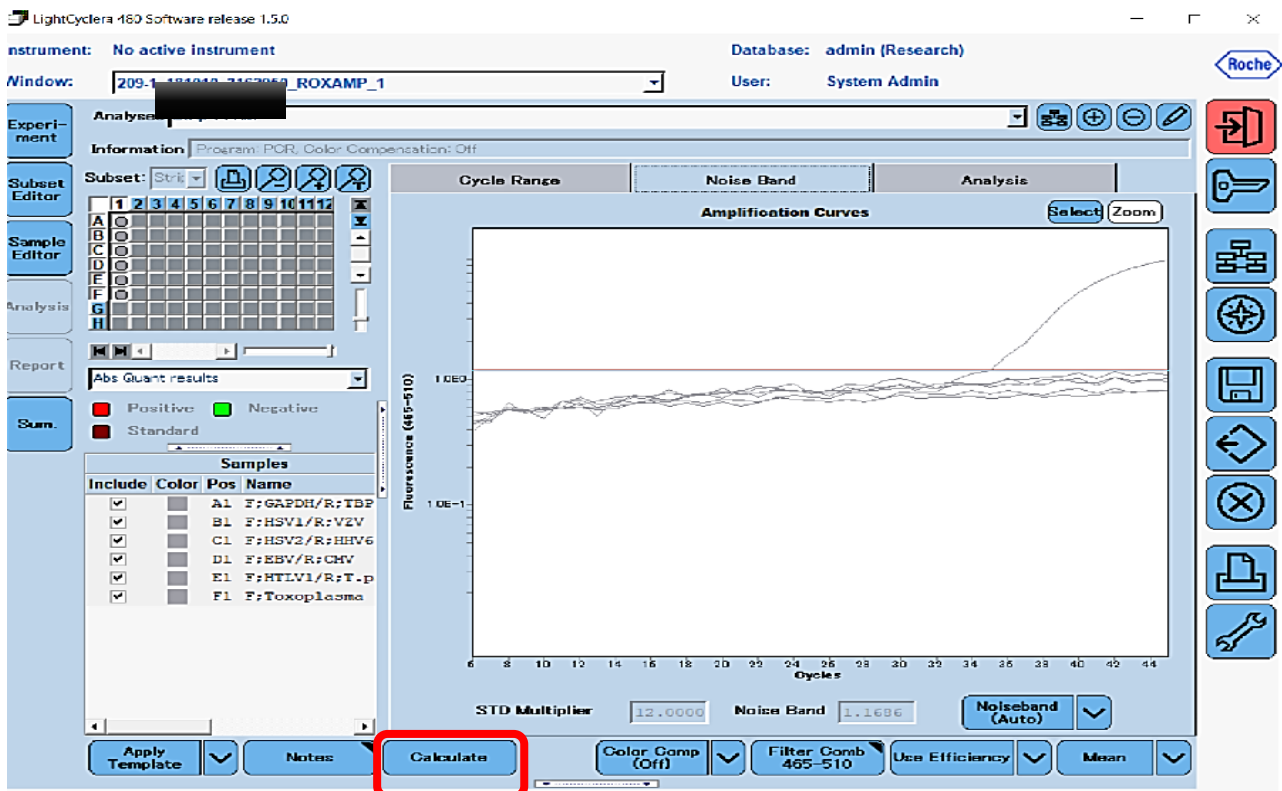
5. 青線を動かして解析を開始するサイクル数(First Cycle)を 7~14 サイクルの間に変更して、ベースラインを調整。(最初の数サイクルは蛍光が安定しないので除外するため。)



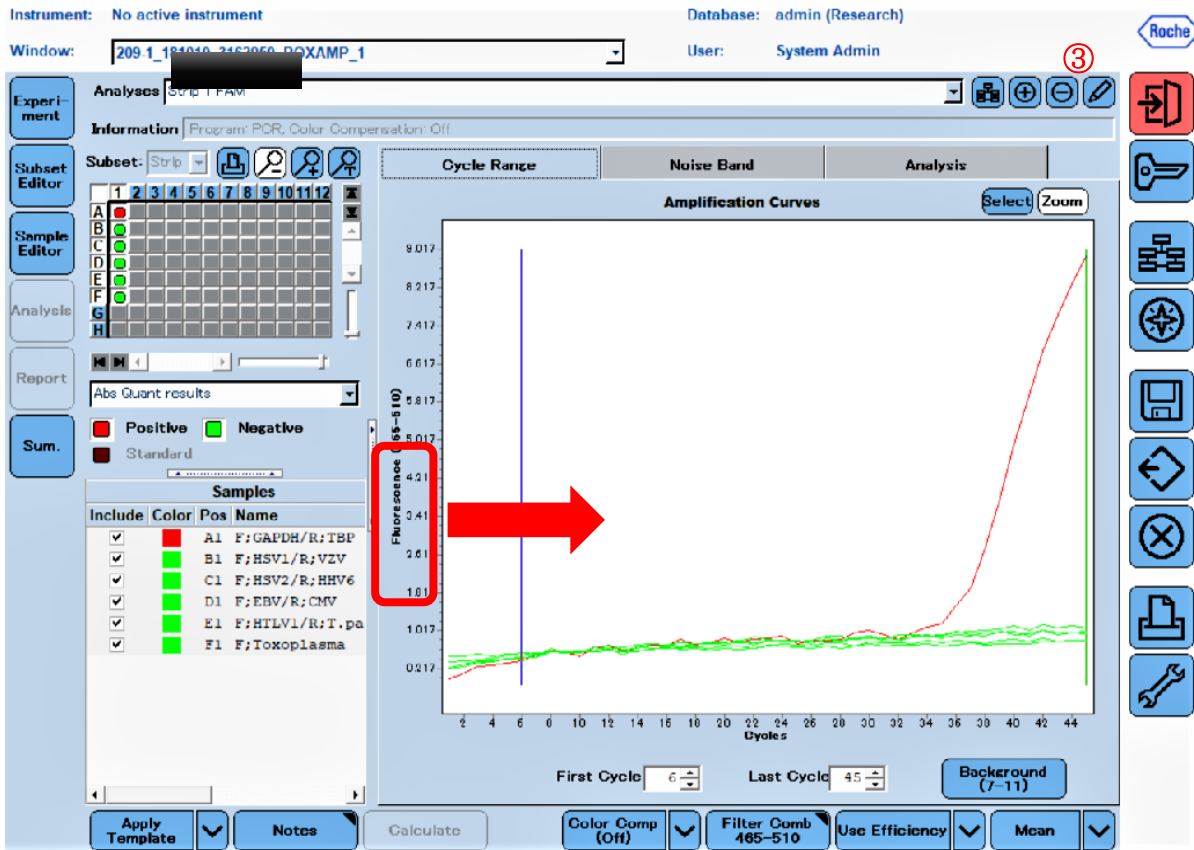
6. ノイズが多い場合などカットオフがうまく設定できていない場合は、①Noise Bandを開き赤線を動かして調整。(問題がなければ Auto 設定のままで可。)



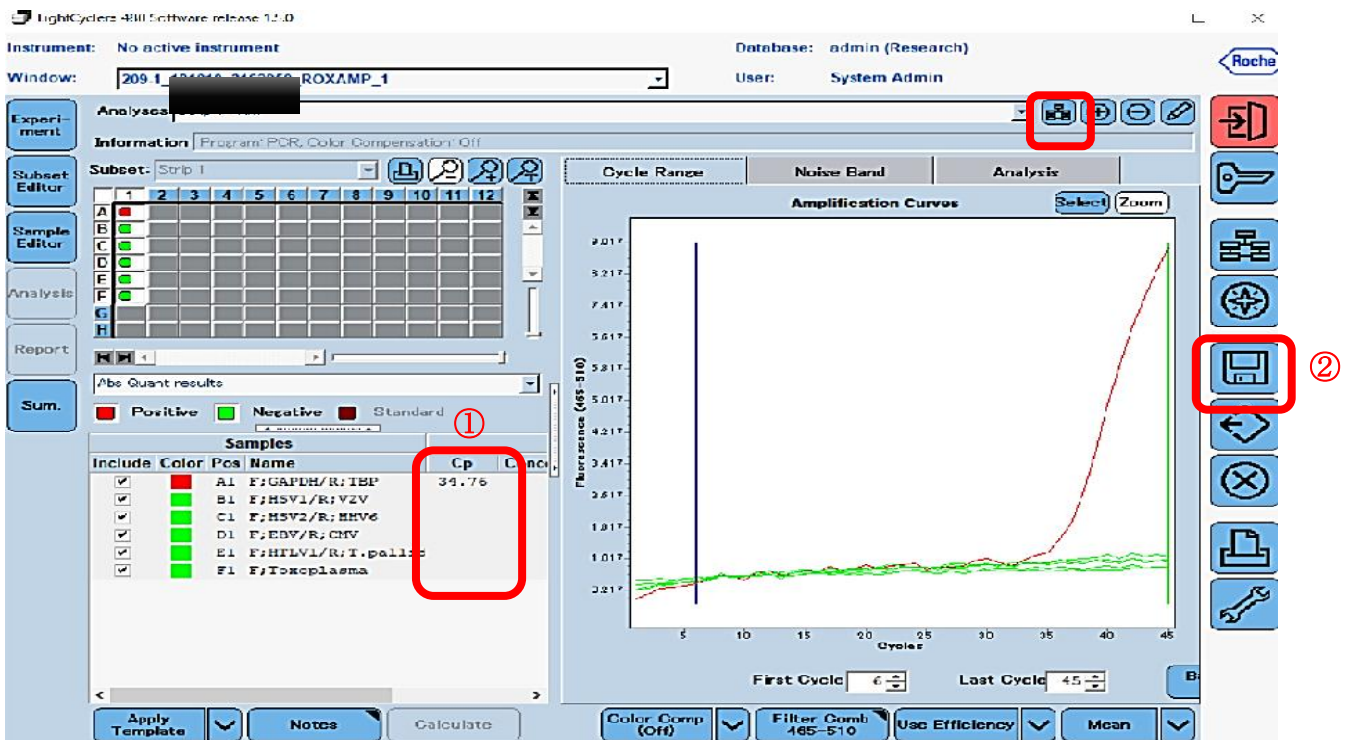
7. Calculate ボタンを押す。



8. 仕切りを動かす。



9. ① C_q (= C_p , C_t) 値を確認。
- ② 保存。
- ③ を押し、ROX を選択、FAM と同じ手順で解析する。

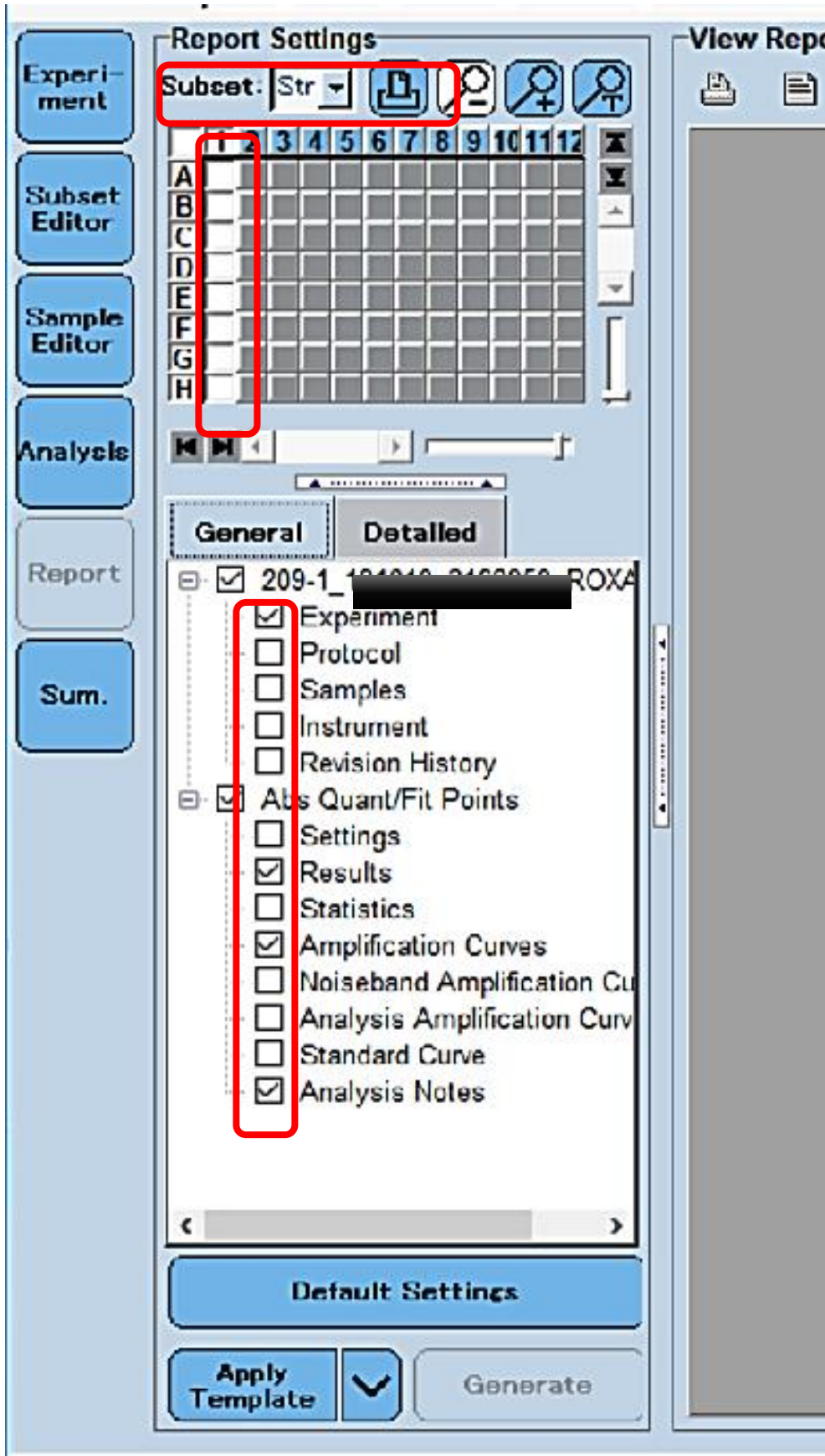


10. 解析レポートをPDFファイルとして出力するため、Reportを押す。(カルテに取り込み可)

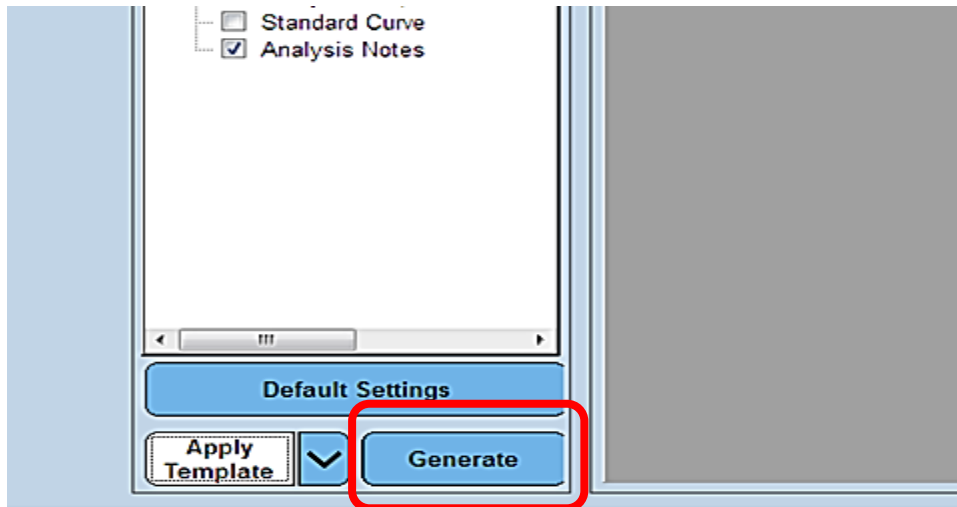
The screenshot shows a software interface for analyzing PCR results. On the left, a vertical menu contains buttons for 'Experiment', 'Subset Editor', 'Sample Editor', 'Analysis', 'Report', and 'Sum.'. The 'Sum.' button is highlighted with a red circle. The main window displays 'Analyses Strip 1 ROX' and 'Information Program: PCR, Color Compensation: Off'. Below this is a grid for 'Strip 1' with columns 1-12 and rows A-H. Row A, column 1 contains a red circle, while all other cells are empty. To the right of the grid is a vertical axis labeled 'Fluorescence (610-670)' with a scale from 0.089 to 1.089. Below the grid, there are controls for 'Abs Quant results' and a legend for 'Positive' (red square), 'Negative' (green square), and 'Standard' (dark red square). A table titled 'Samples' lists the following data:

Include	Color	Pos	Name	Cp	Con
<input checked="" type="checkbox"/>	■	A1	F;GAPDH/R;TBP	35.53	
<input checked="" type="checkbox"/>	■	B1	F;HSV1/R;VZV		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	C1	F;HSV2/R;HHV6		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	D1	F;EBV/R;CMV		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	E1	F;HTLV1/R;T.pallid		
<input checked="" type="checkbox"/>	■	F1	F;Toxoplasma		

11. PDF 出力したい列を選択し、出力したい項目(図の項目がおすすめ)を選択します。



12. Generate ボタンを押します。



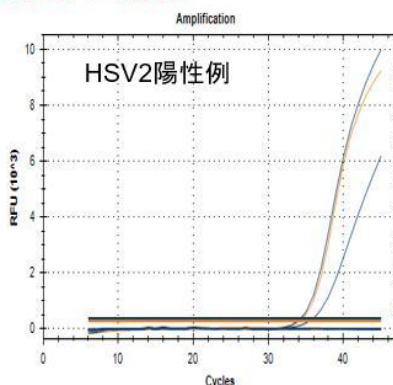
13. PDF ファイルが表示される。

- ① run/analysis データを保存。
- ② を押すと、印刷。
- ③ 任意の場所に PDF ファイルとして保存できる。
- ④ run/analysis データのコピー (ixo ファイル) をエクスポートできる。

●解析の考え方

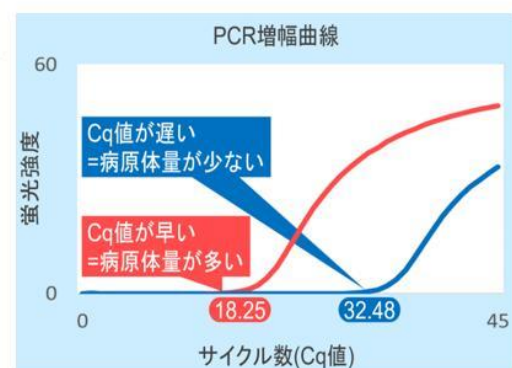
各微生物およびコントロールの増幅曲線 (Cq 値の検出の有無) から解析結果を判断する。
(ベースライン閾値解析法：閾値と増幅曲線の交点を Cq 値とする。)

実際の結果



GAPDH
TBP] 内部コントロール

HSV2



●再検査基準：

GAPDH が増幅しない場合、検体由来の反応阻害など、増幅不成功が疑われるため、再検査を行う。

8.4 使用済み検体及びキットの廃棄

感染性廃棄物として廃棄する。増幅産物による汚染を防ぐために、PCR 後の反応チューブはふたを開けないで廃棄する。エアロゾルが発生して汚染原因となる可能性があるため、廃棄の際にオートク

ぶどう膜炎微生物検出検査標準作業書 大分大学医学部附属病院	第 1.0 版	使用開始日：2019 年 11 月 7 日
----------------------------------	---------	-----------------------

レーブは行わない。

9. 検査結果の電子カルテへの登録

(1) 検査結果の記録

検査結果用紙に下記事項を含む。

- 1) 依頼バーコードラベル（用紙裏面に貼布）
- 2) 検査番号
- 3) 検査日時
- 4) 患者 ID
- 5) 検査項目：ぶどう膜炎微生物検出検査（ROXAMP）
- 6) 検査結果：CP 値・グラフ・コピー数
- 7) 検査コメント：再検査等の情報を記録

(2) 電子カルテ登録を検査部に依頼

- 1) 検査結果用紙（用紙裏面に依頼バーコードラベルを貼布）を検査部に提出。
- 2) 当日中に電子カルテに登録。夜間・休日は翌検査日に登録。

(3) 医事請求

依頼バーコードラベル発行時に医事課に伝達される。

10. 生物学的基準範囲、警戒値及び臨床的解釈

- (1) 生物学的基準範囲 なし
- (2) 警戒値(異常値) 陽性時

感染と診断する。

入院患者の場合は、「感染予防対策マニュアル：ウイルス性疾患（水痘・播種性帯状疱疹、麻疹、風疹、流行性耳下腺炎）症例発生時の院内感染防止対応マニュアル」に従い対応すること。

11. 可能性のある変動要因

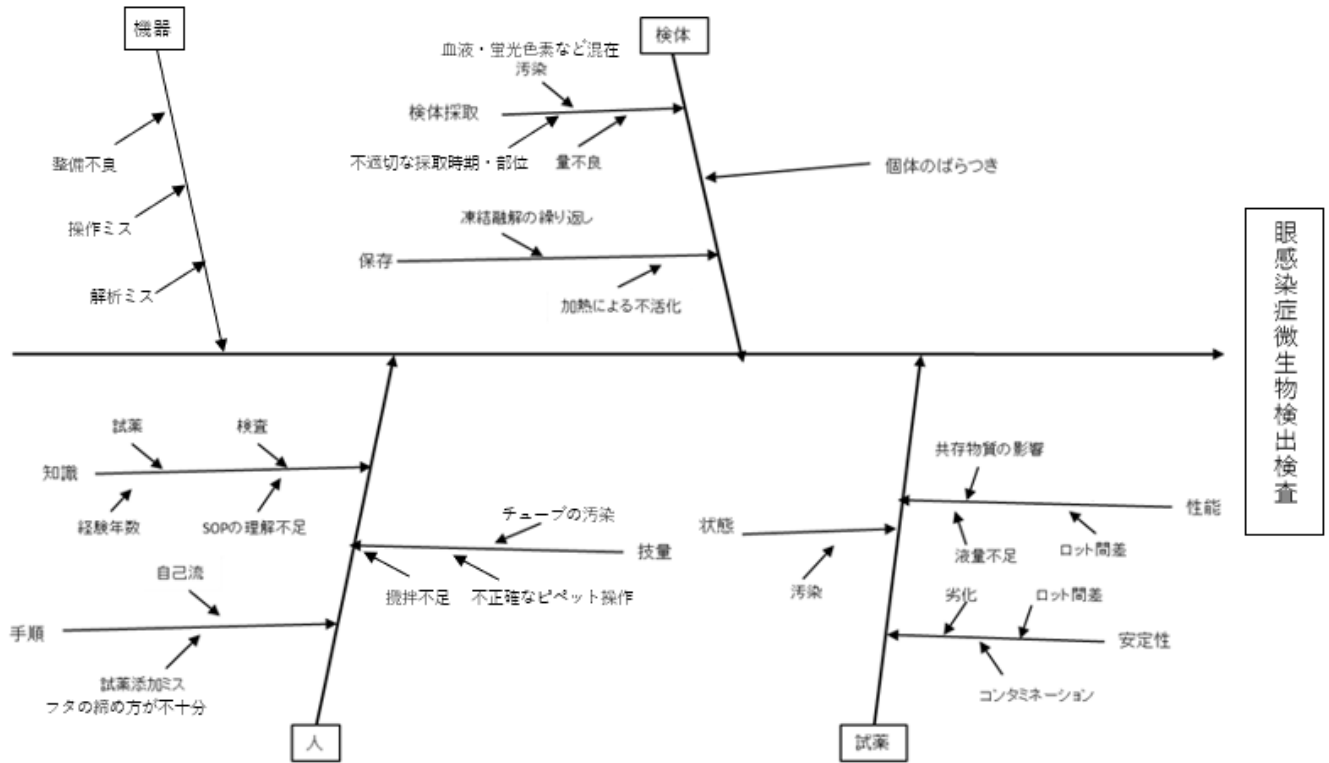
(1) 検体

- 1) 検体採取の不備
- 2) 攪拌不良

(2) その他の変動因子

- 1) Detection Reagent WHITE、PCR Reagent の不備(開封後の時間経過を含む)
- 2) 試薬の不適切保管(管理温度上限超)
- 3) 攪拌不良を含む不適切な検査手順
- 4) 感染初期による、微量さ。

(3) 特性要因図



参考文献：水痘・带状疱疹ウイルスキット デルマクイック VZV 添付文書を改変