

令和 7 年度外部精度管理事業
課題 1 腸管出血性大腸菌の遺伝子検査
実施手順書

- 1) 検体は腸管出血性大腸菌等から抽出した DNA を乾燥させたものです。到着後、検体記号がチューブの側面に記載されていることを確認してください。検体受け取り後、溶解を行うまでは 4°Cにて保管してください。
- 2) 各チューブのスピンダウンを行ってから、10 μ L の Nuclease-free water を加え、乾燥物を完全に溶解させてください。溶解後は速やかに検査を実施してください。検査後の残液は短期（1週間程度）であれば 4°C、長期であれば -20°C以下で保管してください。上記溶解液を 1 反応当たり、MLVA では 0.5-1 μ L、VT 検査では 0.2 μ L 程度使えば十分なシグナルが得られる想定です。（例えば、MLVA の SOP 上で DNA を 5 μ L 使用する、としている施設の場合には、10 倍程度希釈してご使用ください。）
- 3) 溶解後の検体について、VT 遺伝子の検査を実施し、陽性検体については血清群 O157、O26、O111 用の MLVA（反復配列多型解析）を実施してください。（腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について [平成 30 年 6 月 29 日付事務連絡] <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000307591.pdf> を参照）
- 4) 検査終了後、本手順書【各検体の結果入力項目】の内容（各検体の入力項目、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に入力してください。（「受領連絡」を行うと結果入力に進めます。入力の途中で一時保存可、のちに再開可能です）。
- 5) 評価対象となる必須項目は、VT 遺伝子検査の結果及び MLVA 検査の結果です。MLVA 検査において、当該検体についてすべての遺伝子座の数値が合致しなければ、評価は不一致となりますのでご注意ください。
- 6) 結果登録締切日（検体発送後約 3 週間、日付は検体発送時に通知、ホームページにも発表予定）までに結果の入力を完了し、必ず「確定」してください。期日前であれば「確定」していても修正可能ですが「確定」していないと登録とみなされません。
* 結果入力の確定が上記の締切日時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。連絡無しに検査結果が未確定や未入力の場合、参加辞退として処理されますのでご注意ください。
- 7) 結果の入力の正確性も評価対象です。例年、結果の記入漏れ・検体記号の誤記などのある施設が散見されます。これらの不備があった場合は正解になりませんので、正確な入力にご留意ください。
- 8) 判定後の検体残液は結果返送まで保管してください。試験のコントロールとして使用していたいただいてもかまいません。

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。

国立健康危機管理研究機構 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 2301)
E-mail: eqa@nih.go.jp

各検体の結果入力項目

送付検体についてそれぞれ下記項目を括弧内の入力規則に従っ

て記入してください。検体の順番は任意です。（設問Ⅰ. 及びⅡ. が評価対象となります。Ⅱ.(イ) は評価対象外です。）

<検体 1 > 検体記号（アルファベット 4 文字 [半角大文字]）： _____

I. VT 遺伝子検査の結果（右の項目より選択） 【陽性・陰性】

（ア）陽性の場合、VT 型を選んでください（右の項目より選択）【VT1・VT2・VT1+VT2】

II. MLVA 検査の結果

（ア）得られた各遺伝子座のリピート数を下表に従って、半角数字にて入力してください。（増幅産物が無い場合は「-2」と入力。複数のピークが観察された場合等については、高さが高い方のピークに相当するリピート数を入力し、アンケートの「その他」に詳細を記載してください。）

EH111-	EH111-	EH111-	EH157-	EH26-	EHC-	EHC-	EHC-	EHC-	O157-	O157-	O157-	O157-	O157-	O157-	O157-	O157-
11	14	8	12	7	1	2	5	6	3	34	9	25	17	19	36	37

（イ）2つのマルチプレックス PCR について、泳動ファイル（fsa ファイル）をアップロードしてください。アップロード先は反応液ごとに分かれています。ファイル名も冒頭に反応液番号「1」若しくは「2」を、次いで検体番号、機関名としてください。

例：1-ABCD-JIHS.fsa、2-VWXY-NIID.fsa

（O157-34 を含む方が反応液 1、O157-37 を含む方が反応液 2 です。）

<検体 2 ～> 検体記号（アルファベット 4 文字 [半角大文字]）： _____

以下、検体 1 と同様に回答してください

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。

- VT 遺伝子検査について記入してください（いずれも自由記載）
 - 使用したプライマー
 - 使用した PCR キット（Taq ポリメラーゼ、リアルタイム PCR キット名）
 - 使用したサーマルサイクラー若しくはリアルタイム PCR 機器

- MLVA 検査について記入してください（いずれも自由記載）
 - 使用したプライマー（例：xxx に記載のプライマーを自家調製、サーモフィッシャーから購入）
 - 使用した PCR キット（社名、キット名）
 - 使用したサーマルサイクラー（社名、機種名）
 - 泳動に使用したシークエンサー（社名、機種名）
 - 泳動に使用したサイズマーカー（例：GeneScan 600 LIZ dye Size Standard）
 - 解析に使用したフラグメント解析ソフト（バージョンを含む）
 - リポート数への変換について（エクセルを使用、マニュアル操作、マクロ（自家製）の使用、など）

- その他 ； 特記事項、意見、コメント等