

パルボウイルス B19 コントロールサーベイ関係資料

1. パネルに使用したウイルスの情報

弊社の海外関連会社より、米国で採血されたパルボウイルス B19（以下 B19）ゲノム陽性のヒト血漿を入手した。入手した血漿の B19 ゲノム濃度を LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit (Roche Diagnostics) により調べ、高レベルの血漿を選択した (F15)。一方 本 Kit で B19 ゲノムが陰性であった血漿が見つかり詳しく調べたところ、genotype 2 の陽性血漿であることが判明した (F27)。Genotype 1 の F15 と genotype 2 の F27 を血清化し、ゲノム濃度を両 genotype の定量が可能な artus parvo B19 TM PCR Kit (QIAGEN) で測定した。F15 は 11.2 Log IU/mL、F27 は 11.0 Log IU/mL であった。本血清を希釈用ヒト血清で 10^5 IU/mL になるよう希釈し、0.5mL ずつ分注して -80°C で保存した。F15 の塩基配列は決定していないが、F27 の塩基配列は決定済みで DDJB/EMBL/GenBank へ登録予定である。B19 陽性血漿は HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA、anti-B19 IgG が陰性で、希釈用ヒト血清は Anti-HIV、Anti-HCV、HBsAg、HIV-RNA、HAV-RNA、HBV-DNA、HCV-RNA が陰性で、B19-DNA、Anti-B19 が陰性であることを確認している。本希釈用血清を陰性コントロール検体としてもちいる。

2. プライマー情報

ベネシスでは両 genotype の B19 ゲノム定量を artus parvo B19 TM PCR Kit で行なっている。増幅領域、プライマー配列、プローブ配列は不明で増幅サイズは 76bp である。なお Roche 社の LightCycler Parvovirus B19 Quantification Kit では 2 型株 (F27) をまったく検出できなかった。

3. 感度検定用標品

artus parvo B19 TM PCR Kit に添付されている Quantitation standard ($10\sim 10^5$ IU/ μL) を用いている。Quantitation standard の領域やサイズは不明である。

4. ベネシス法の感度

2 の方法で 3 の検定用標品を用いた検出感度は 1 IU/reaction である。

5. その他の情報

(1) パネル分注品の均一性試験

各パネル 5 本の B19 ゲノム濃度を調べた (表 1)。最大値と最小値の差は 0.5Log 未満であった。

表 1. B19 パネル分注品の均一性試験

パネル名	平均±SD	最大値	最小値
F15	4.44±0.16	4.58	4.24
F27	4.19±0.15	4.42	4.06

各パネル分注品 5 本の B19 ゲノム濃度を artus parvo B19 TM PCR Kit により測定した。単位は Log IU/mL で示した。

(2) パネルの保存安定性と凍結融解の影響

-80°C保存後 2 ヶ月目の B19 ゲノム濃度を N=2 で調べた。同時に凍結融解を 2 回及び 3 回行った場合のゲノム濃度への影響を調べた (表 2)。その結果保存 2 ヶ月目では、F27 でやや高い数値を示した。凍結融解 2 回、3 回処理は B19 ゲノム濃度に著しい影響は及ぼさないものと思われる。

表 2. B19 パネルの保存安定性と凍結融解の影響

パネル名	0 ヶ月	2 ヶ月	凍結融解 2 回	凍結融解 3 回
F15	4.44	4.67	4.54	4.62
F27	4.19	4.70	4.62	4.38

-80°Cに保存後、2ヶ月後のゲノム濃度を N=2 で測定した。同時に凍結融解を 2 回及び 3 回繰り返したサンプルのゲノム濃度を N=2 で測定した。数値は平均値で単位は Log IU/mL で示した。

以上

(ベネシス社より提供されたパルボウイルスパネル)