

2019年度IGRA(QFT)外部精度管理

QFT検査の品質向上に向けた提案

2020年10月31日
結核感染診断研究会(Web)

ファルコバイオシステムズ
総合研究所 山下和也

はじめに

- 結核感染診断研究会は2019年12月～2020年1月にQFT外部精度管理調査を実施した
- 各施設の精度状況を評価し、QFT検査の精度向上に寄与することを目的とした

2019年度 IGRA〔QFT〕 外部精度管理調査

調査項目

- 試料 レベル1、2 三重測定(IFN- γ 濃度)
(キアゲン社コントロールパネル)
- 計算項目 レベル2－レベル1(ブランク補正值)
- 採血～検査工程に関するアンケート調査

参考調査項目

- 標準液S1～S4吸光度(OD)
(キアゲン社コントロールパネル)

精度上の問題を明らかにするために

- 参考調査項目を利用した原因の追及

- ①検量線の確認

- ・・・全ての施設が品質管理をパスしていた。

- ②標準液(S2～S4)のODよりIFN- γ 量を算出(戻り値)

- 求めたIFN- γ 量と理論値の比較検討

- S4とレベル1のIFN- γ 量を比較検討

- S2IFN- γ 量とレベル2の相関検討

ELISA試験の品質管理

- 標準液(S1)のODは0.600以上
- 標準液S1、S2のODの変動係数は15%以下
- 標準液S3、S4のODはそれぞれのOD平均 ± 0.040 以内
- IFN- γ の標準曲線の相関係数は0.98以上
- 標準液S4の平均ODは0.150以下
- 標準液S1～3の平均ODを用いlog-log標準曲線を作成する(S4はOIU/mLのため除外)
- 回帰分析により最適な標準曲線を算出する。回帰式は $Y=aX+b$ で表す。

標準液のODを
試料として代入

Quantiferon®-TB Gold Plus (バージョン 2.81.0)

閉じる 新規検査 ファイルを開く 保存 配置図を開く 配置図を保存 印刷 結果をエクスポート O.D.をエクスポート お問い合わせ

測定詳細 生データ 標準曲線 検体の測定結果

Quantiferon®-TB Gold Plus

解析ソフトウェア

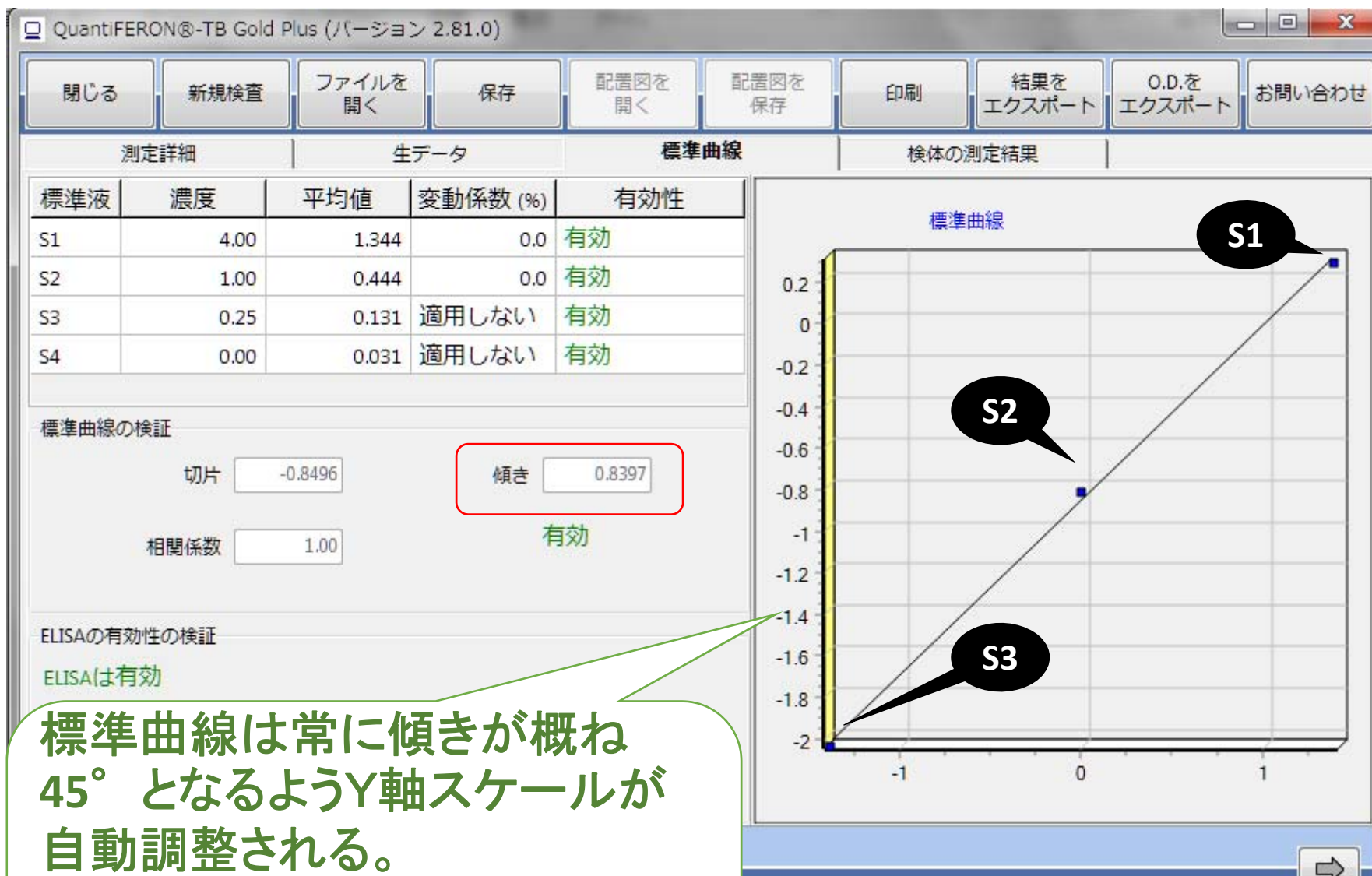
測定詳細

	1	2
A	S1 1.344	1N 1.334
B	S2 0.444	1TB1 0.444
C	S3 0.131	1TB2 0.131
D	S4 0.031	1M 0.031
E	S1 1.344	データなし
F	S2 0.444	データなし
G	S3 0.131	データなし
H	S4 0.031	データなし

生データ 付け 標準配置 データ入力 任意配置 検体ID確認 計算

標準液

QFT専用解析ソフトを利用し、標準液の結果を試料結果として代入することで、検量線の妥当性を確認する。



標準曲線は常に傾きが概ね
45° となるようY軸スケールが
自動調整される。
対数グラフのためS4ブランクは
標準曲線には反映されず、S1～
S3 の3点で算出される。

QuantIFERON®-TB Gold Plus (バージョン 2.81.0)

閉じる	新規検査	ファイルを開く	保存	配置図を開く	配置図を保存	印刷	結果をエクスポート	O.D.をエクスポート	お問い合わせ
測定詳細		生データ		標準曲線		検体の測定結果			
検体ID	Nil (IU/ml)	TB1 (IU/ml)	TB2 (IU/ml)	Mitogen (IU/ml)	TB1- Nil (IU/ml)	TB2- Nil (IU/ml)	Mitogen- Nil (IU/ml)	結果	
検体 1	3.88	1.05	0.24	0.04	-2.83	-3.64	-3.84	判定不可	

Nil=S1
0IU/mL

TB1=S2
0.25IU/mL

TB2=S3
0.25IU/mL

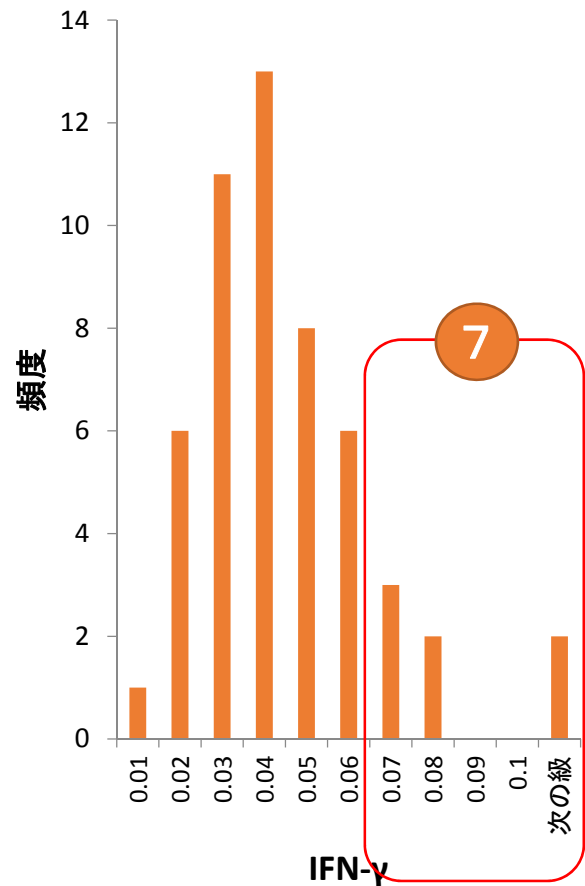
Mitogen=S4
0IU/mL

ブランク値の評価

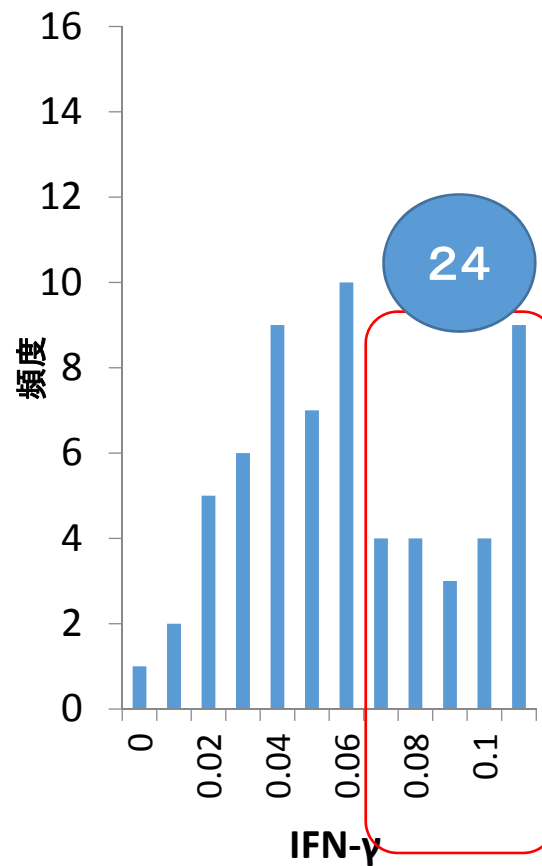
S4 ,レベル1 報告値からの検討

S4(IFN- γ :ブランク値)の年度推移

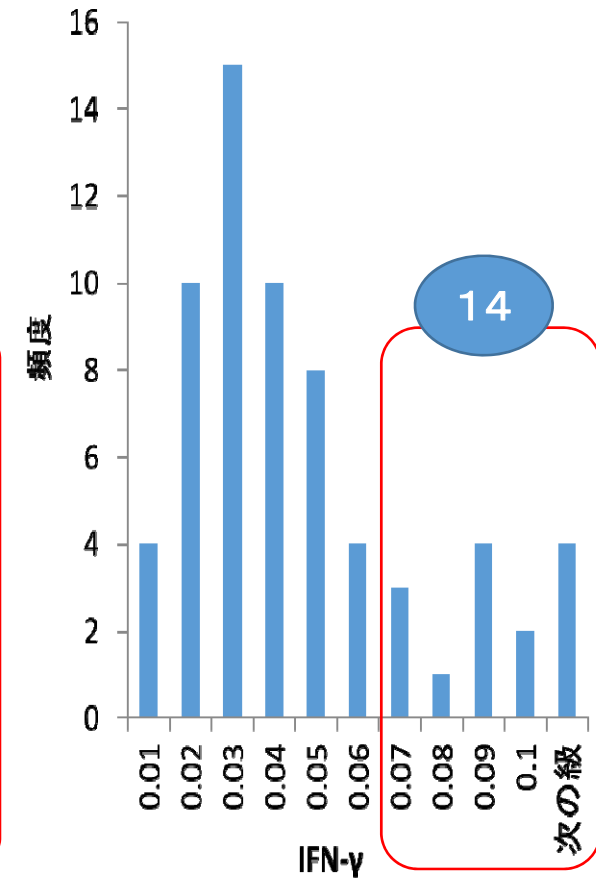
S4 IFN- γ (2019年度)



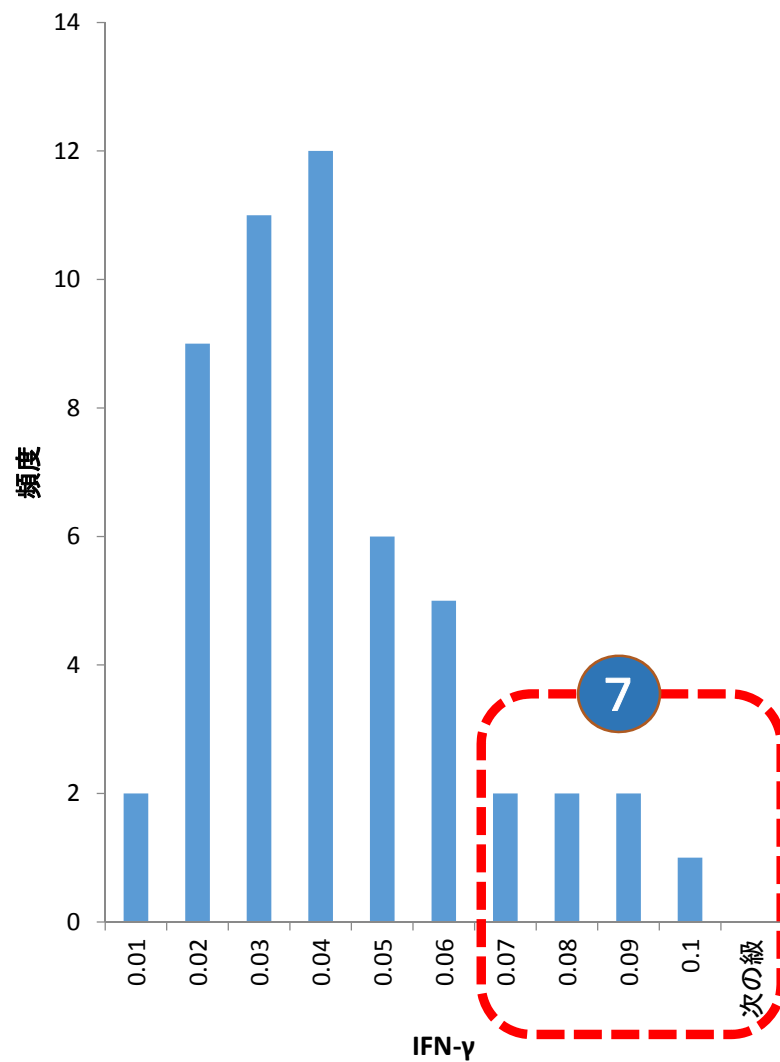
S4 IFN- γ (2018年度)



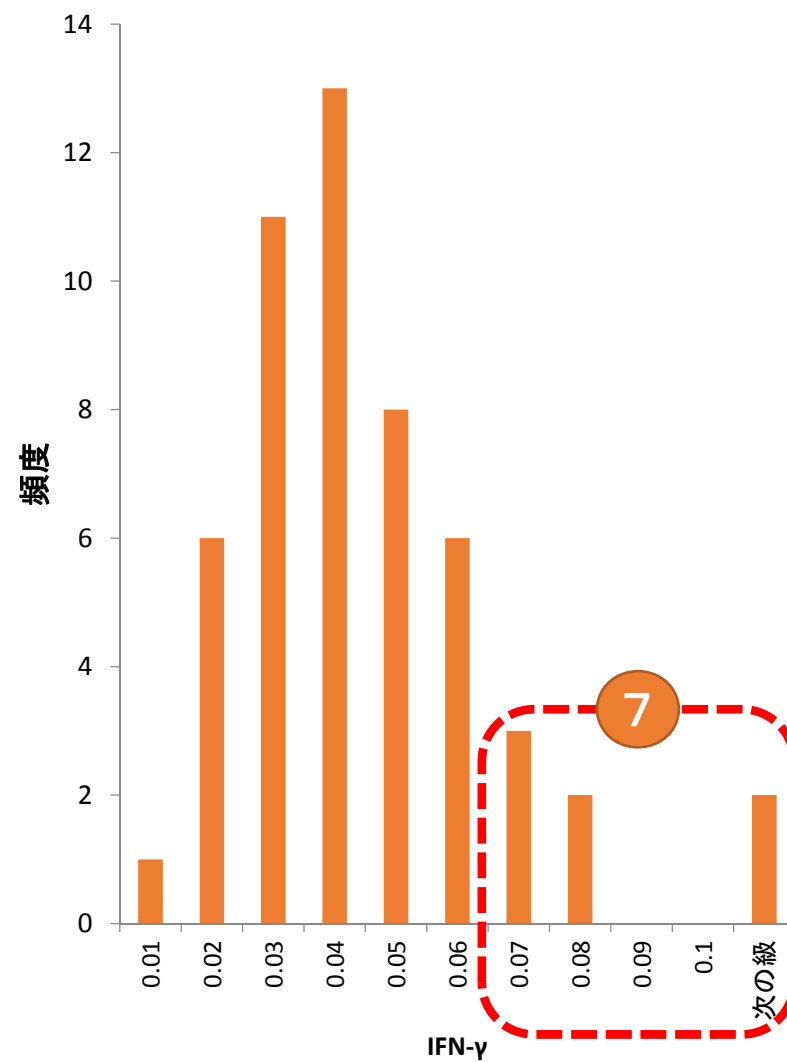
S4 IFN- γ (2017年度)



レベル1(2019年度)

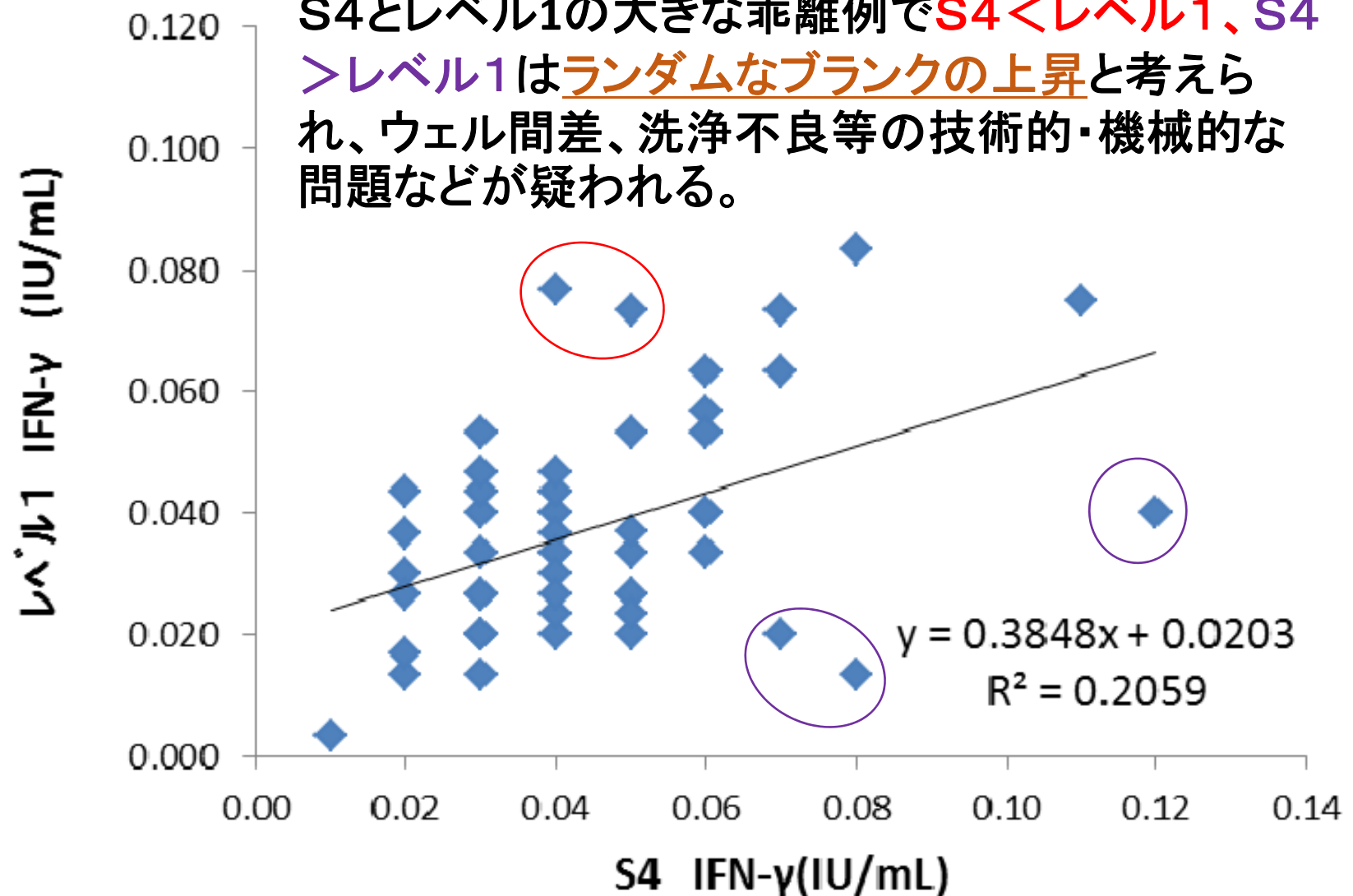


S4 IFN- γ (2019年度)



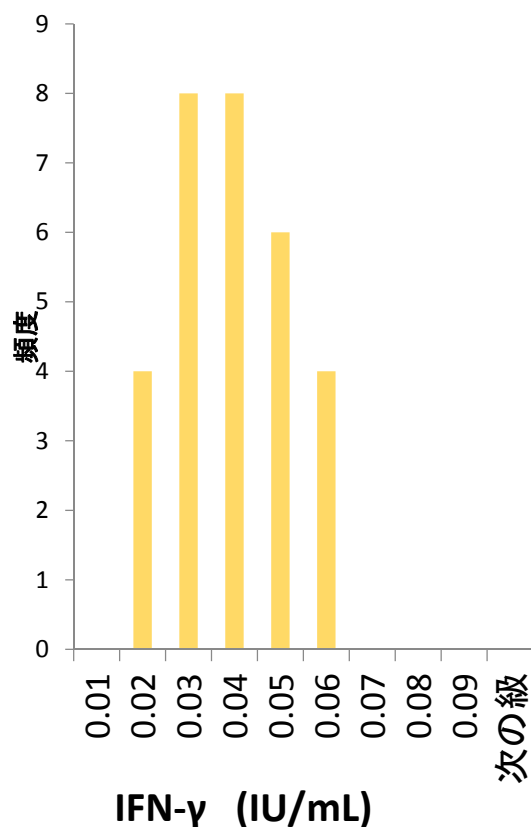
レベル1とS4の相関

S4とレベル1の大きな乖離例で**S4<レベル1**、**S4>レベル1**はランダムなブランクの上昇と考えられ、ウェル間差、洗浄不良等の技術的・機械的な問題などが疑われる。

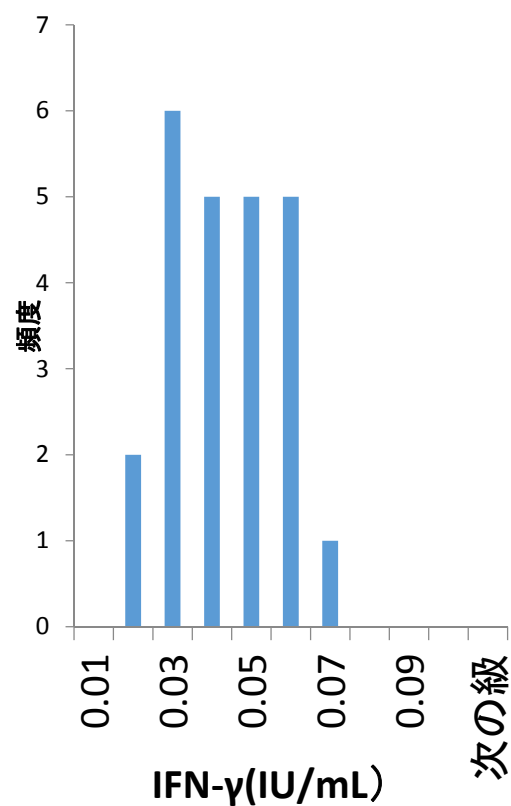


A評価32施設のS4(IFN- γ)を元に2SD反復切断後(臼井法)のヒストグラムにより基準範囲を設定した。

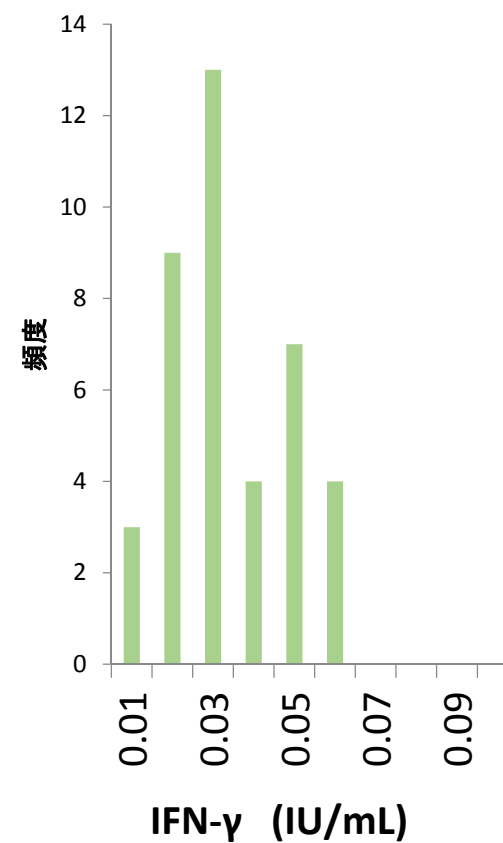
2019年



2018年



2017年



S4基準値

0.06以下

0.07以下

0.06以下

S4,レベル1に関するまとめ

- S4の評価より、一部でブランク高値が見られるものの前年度に比べ改善が進んだ。
- S4とレベル1との乖離が数施設見られ、ランダムなブランクの上昇と考えられた。
- S4 ODより求めたIFN- γ 値は0.06IU/mL以下が適切と考えられた。

バックグラウンドが高い

考えられる原因	解決方法
プレートの不十分な洗浄	プレートの洗浄は400 μ L/ウェルで最低 6 回行うこと。使用する洗浄機によっては、6 回以上の洗浄サイクルが必要な場合もある。各サイクル間の浸漬時間を 5 秒以上にする。
反応温度が高い	ELISA法における反応は、 $22\pm 5^{\circ}\text{C}$ で行う。
試薬の期限切れ	本品は使用期限内に使用する。溶解したIFN - γ 標準及び標識抗体濃縮液は、溶解日から 3 ヶ月以内に使用する。
酵素基質液の汚染	基質が青色になっていたら廃棄する。汚染のない試薬を用いる。

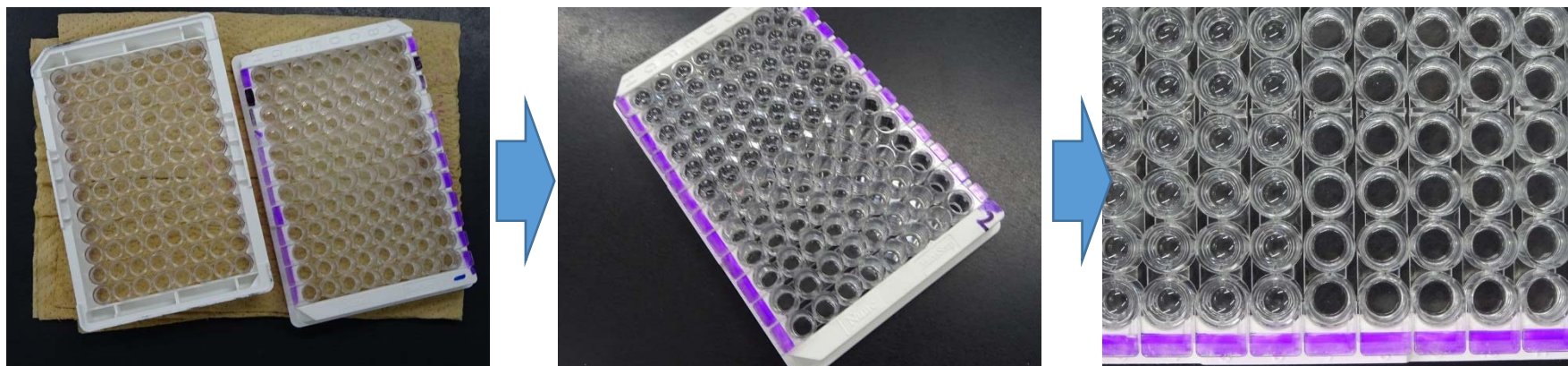
その他の注意事項

- 洗浄装置の吐出・吸引状況の点検（使用時）
- 使用器具（ピペット）の定量点検
- 試料分注時の検体確認（フィブリンの有無）
- 試薬の確認
- 比色計の適切な使用（光量の安定化など）
- 試薬分注に使用する試薬容器の適切な洗浄
- 測定後のS2、S4による検量線確認とOD確認

プレート洗浄後の残渣確認

●機器の始業時点検

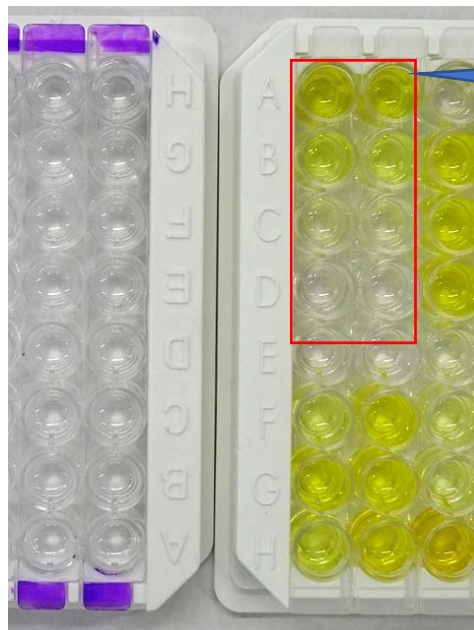
- ①QFT検査で使用済みプレートを洗浄・乾燥させたものを準備。
- ②使用済みプレートを用いて洗浄工程のみ実施させる。
- ③プレートの各ウェルに残る残渣を目視で確認する。



プレート洗浄後の残渣確認

●検査後のブランク確認

- ①QFT検査で使用済みプレートを洗浄・乾燥させたものを準備。
- ②反応停止液または精製水をウェルに150 μ L分注(対照)。
- ③測定後プレートの下に白紙を敷き、S4ウェルと対照プレートのウェルを比較し、着色の有無を確認する。



標準液 上からS1,2,3,4



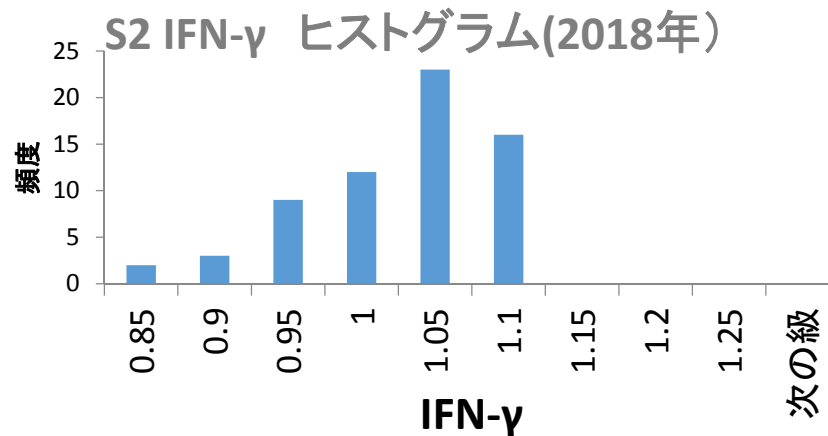
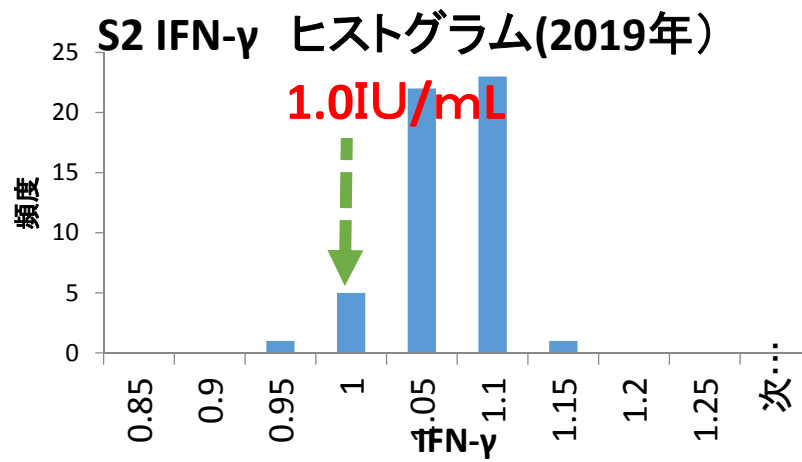
対照

S4

S2とレベル2

に関する考察

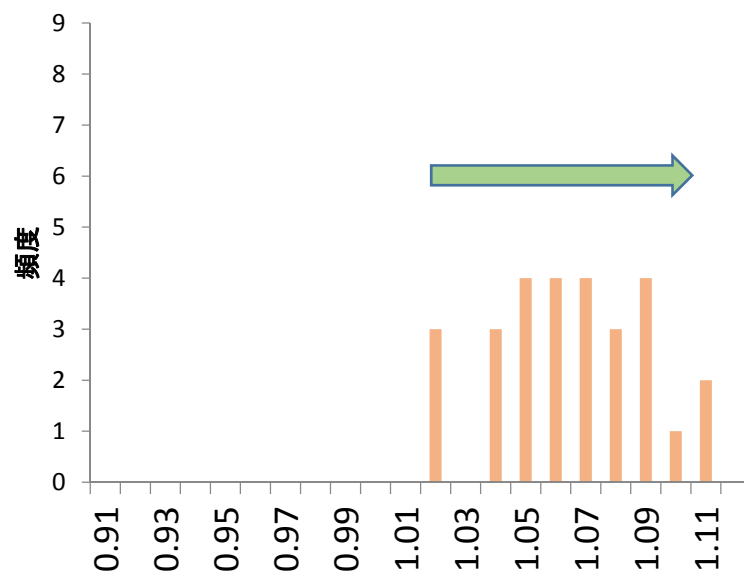
S2 (1.0IU/mL)はカットオフ0.35IU/mLに対する検量線の影響を反映するため、52施設のS2戻り値について分布状況を確認した。



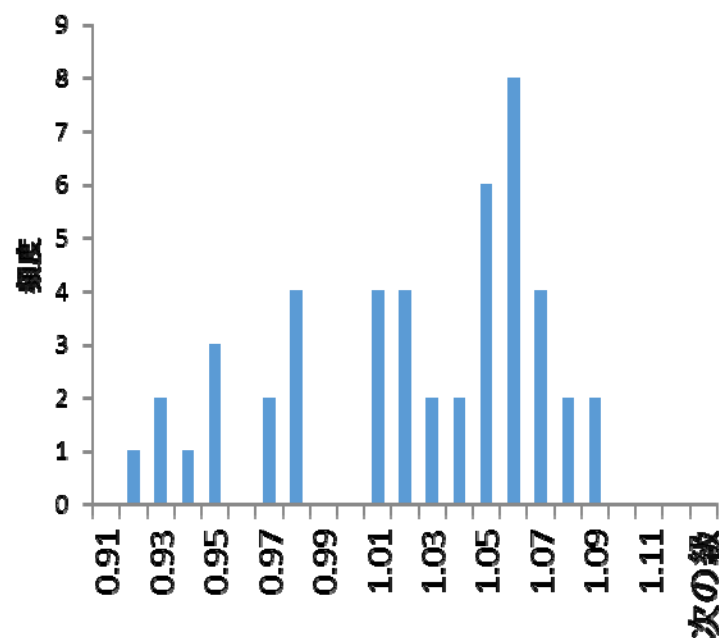
S2戻り値は0.95～1.11IU/mLの範囲で分布しており、前年の0.76～1.09IU/mLと比較し改善が見られたが、5～10%高い傾向は継続していた。

A評価32施設のS2 (IFN- γ)を元に2SD反復切断後(臼井法)のヒストグラムにより基準範囲を設定した。

S2 IFN- γ (2019年)



S2 IFN- γ (2018年)



S2基準値

IFN- γ (IU/mL)
1.02~1.11

IFN- γ (IU/mL)
0.92~1.09

前年に比べS2ヒストグラムは理論値1.0IU/mLよりも右寄りにシフト

- S2、S4のIFN- γ 量としての戻り値を算出し、

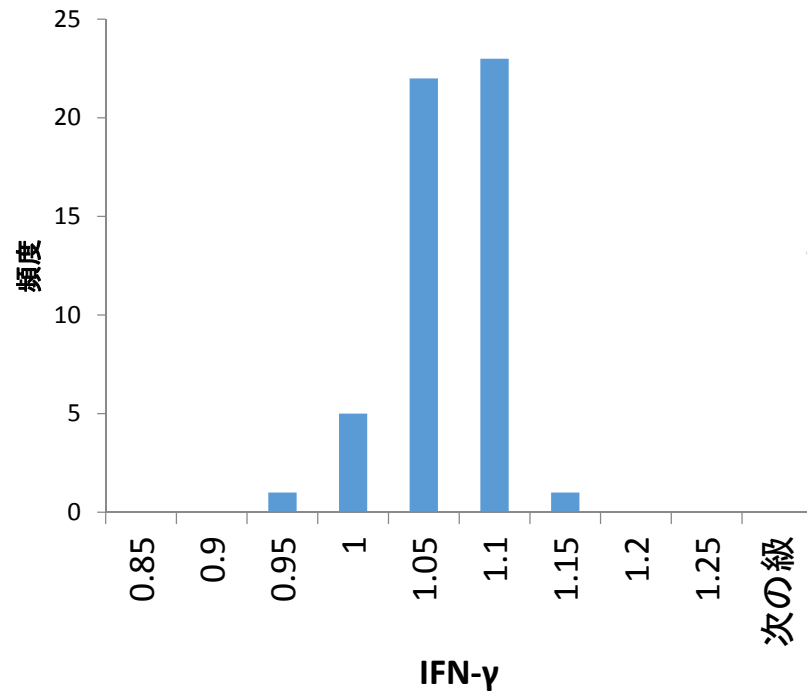
①S4戻り値 ≤ 0.06 (ブランクの確認)

②S2戻り値 1.02~1.11

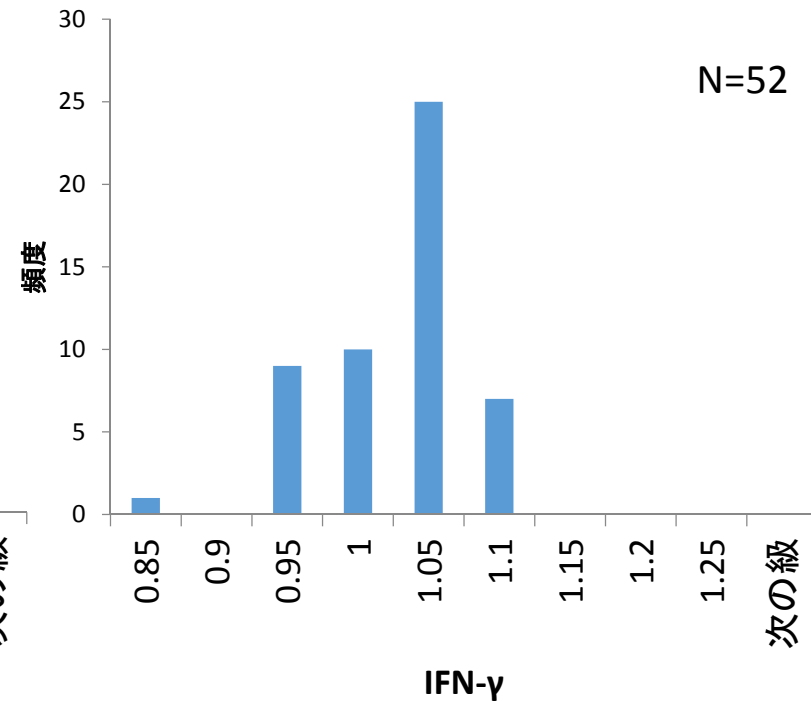
を確認することで検量線のセルフチェックが可能？

S2戻り値は以前より高い？

S2 IFN- γ ヒストグラム(2019年)

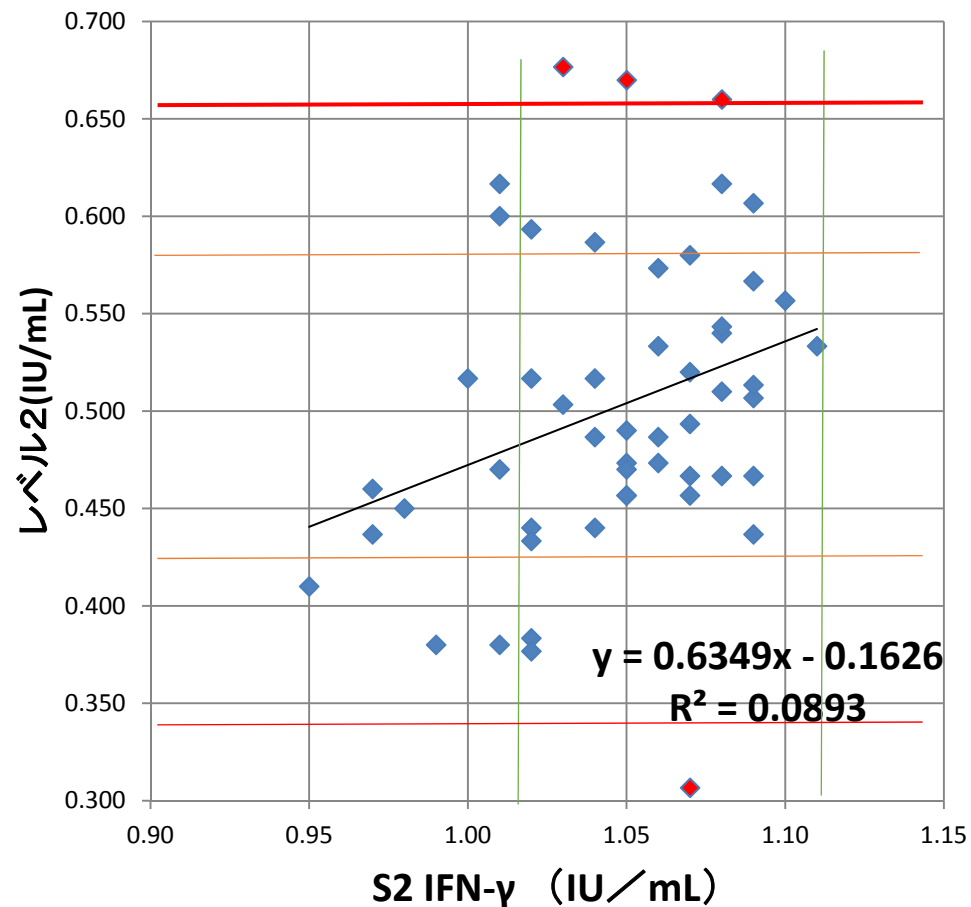


S2ーS4 ヒストグラム(2019年)



S2よりS4のIFN- γ 値を差し引くことでブランク補正を試みた結果、5%程度の高値傾向は見られた。
この傾向は母集団をA評価群に限定しても同様であった。

S2とレベル2の相関



S2戻り値とレベル2のIFN- γ 量との相関は認められず、精度不良要因は検量線以外にも存在する可能性が示唆された。

◆ レベル2:A, B評価

◆ レベル2:C評価

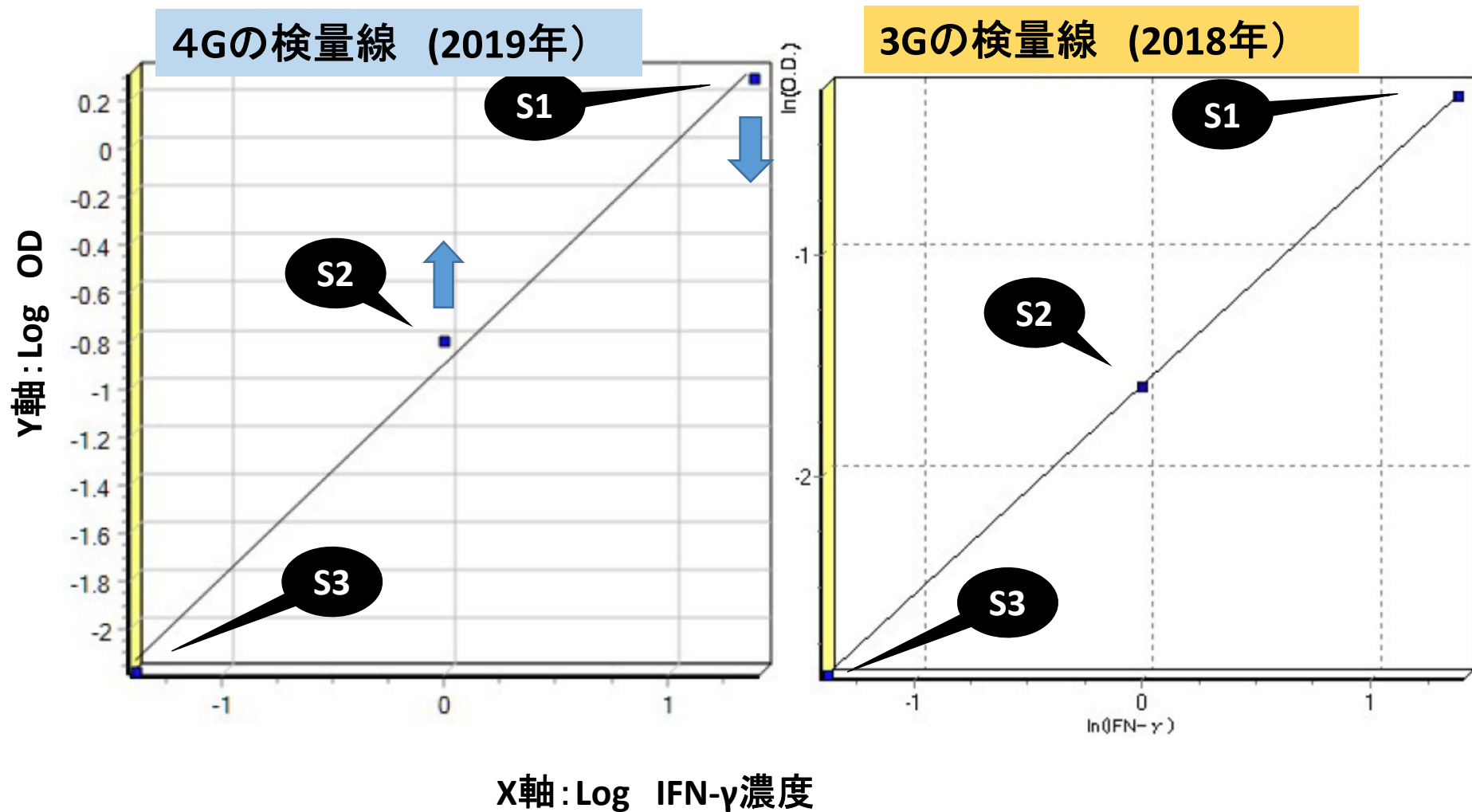
レベル2評価基準

1SD	0.423
	0.581
2SD	0.344
	0.660

S2基準値 1.02~1.11

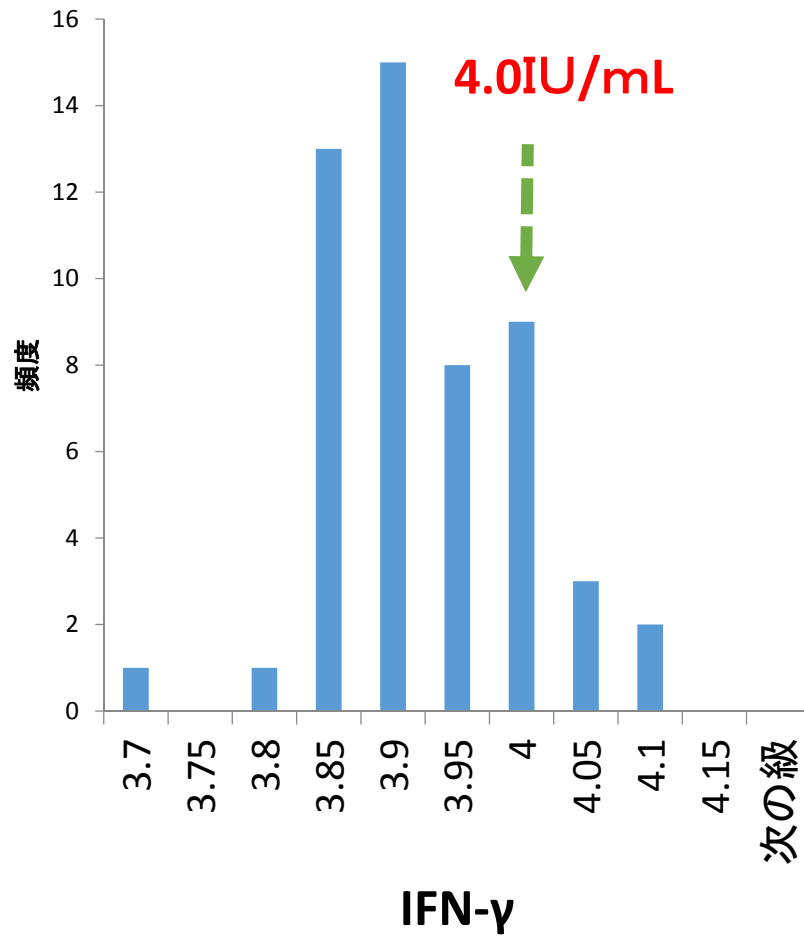
4GのS2は検量線の上側に、S1は下側にプロットされた施設が多い。

3Gでは概ね検量線上にS1,2ともプロットされていた。

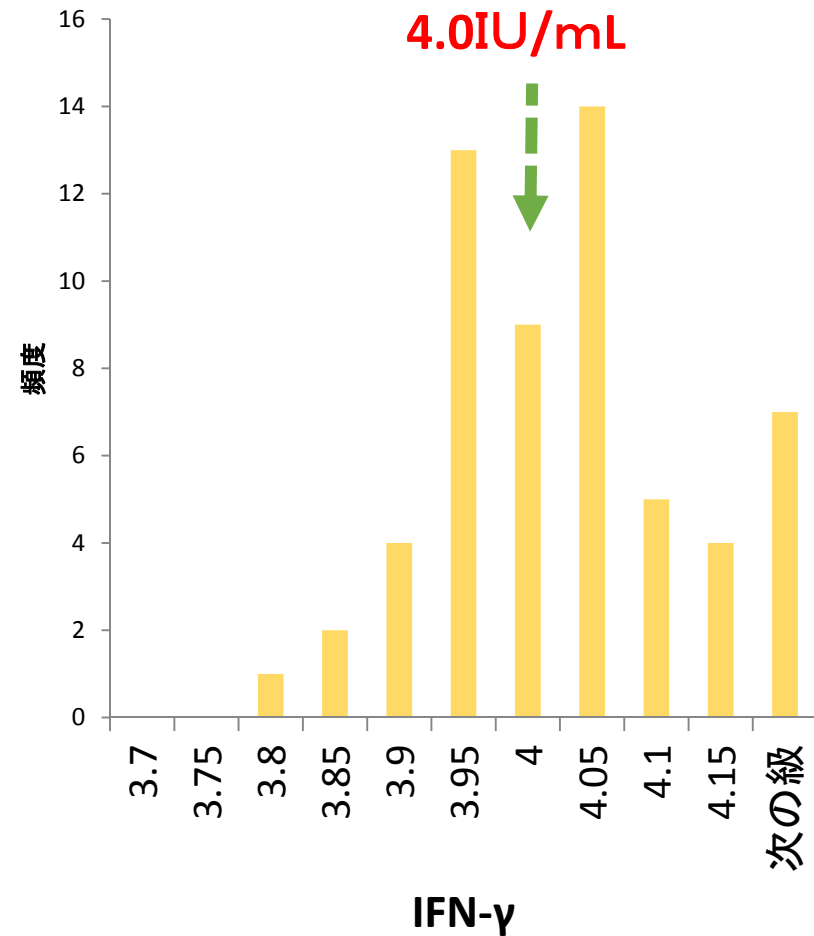


S1 IFN- γ 戻り値の年度比較

S1 IFN- γ (2019年・4G)

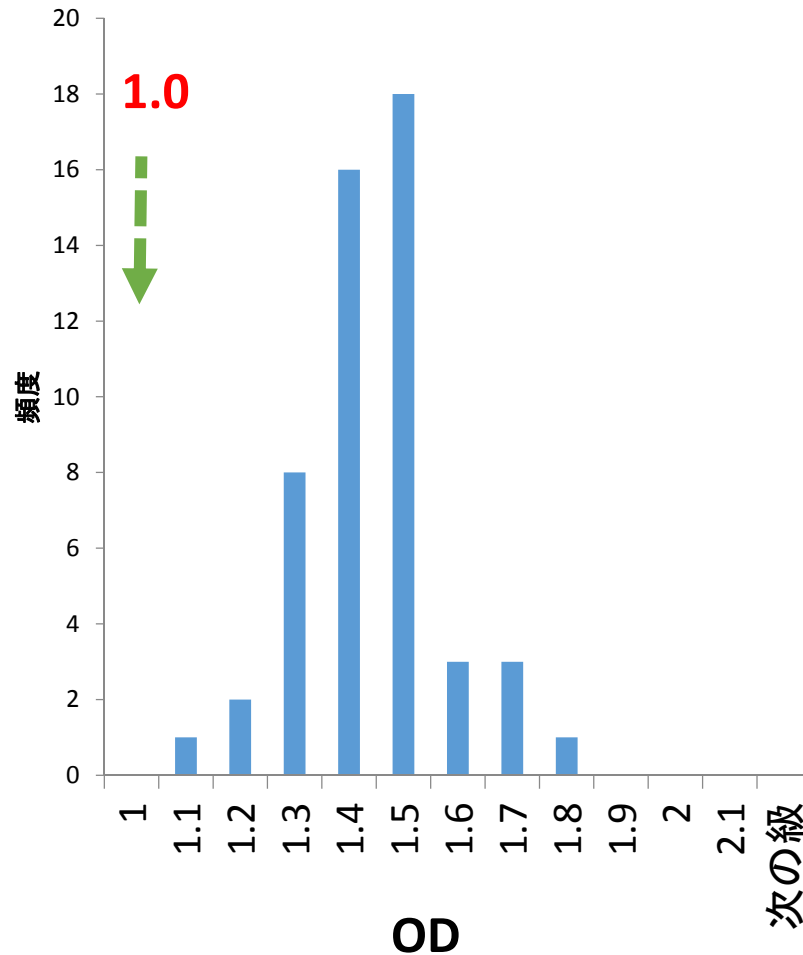


S1 IFN- γ (2018年・3G)

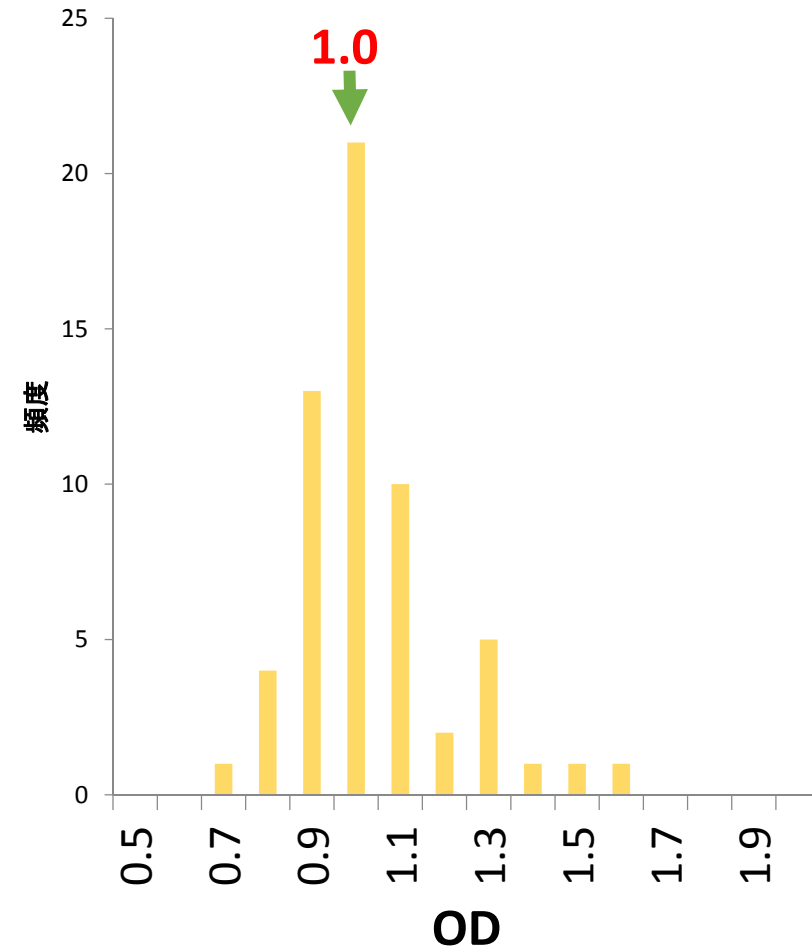


S1 OD値の年度比較

S1 OD (2019年・4G)

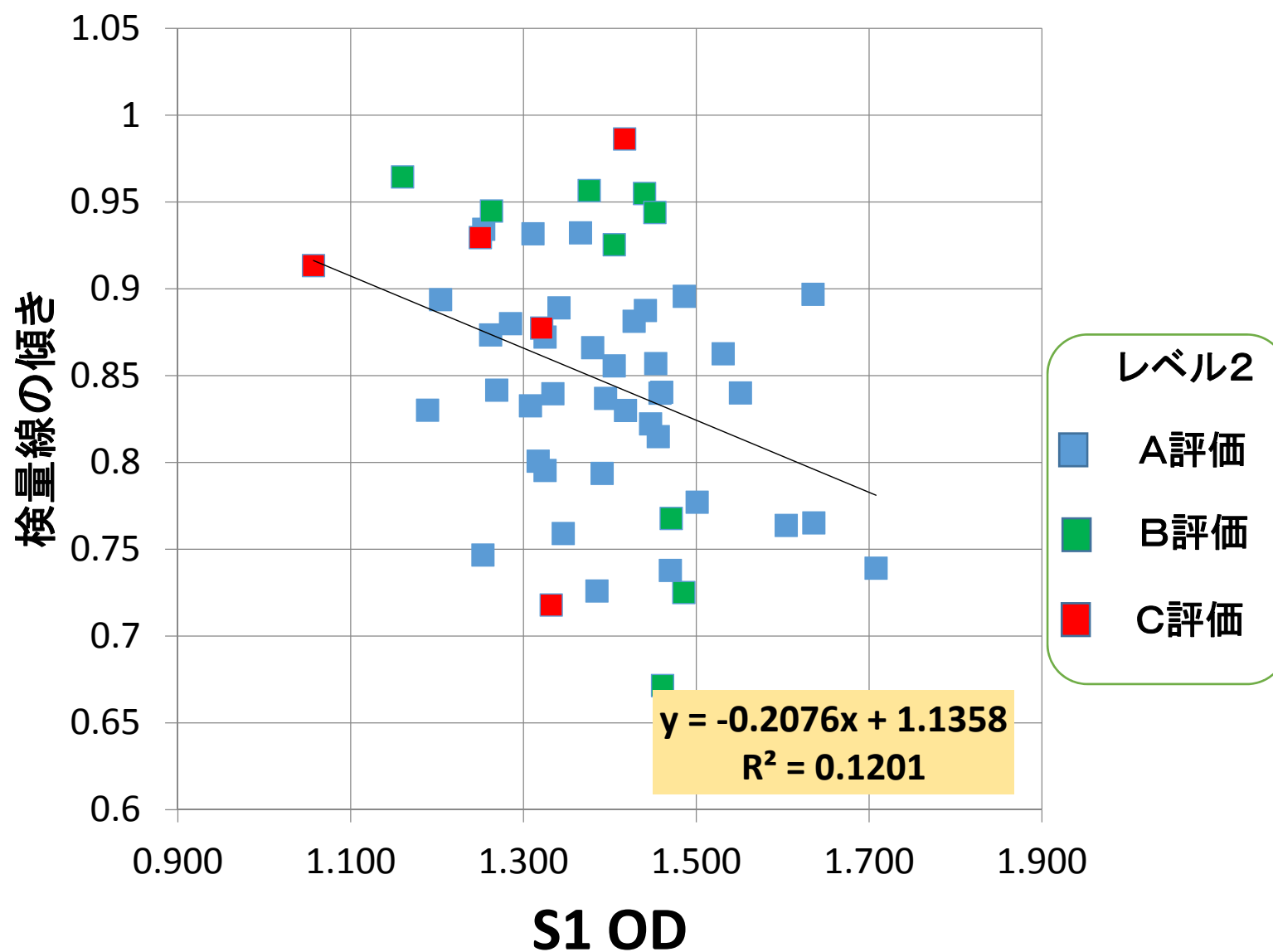


S1 OD(2018年・3G)



S1 ODは前年度と比較し明らかに高値傾向を呈していた。

S1 ODと検量線の傾きとの相関



S1、S2、レベル2に関する考察

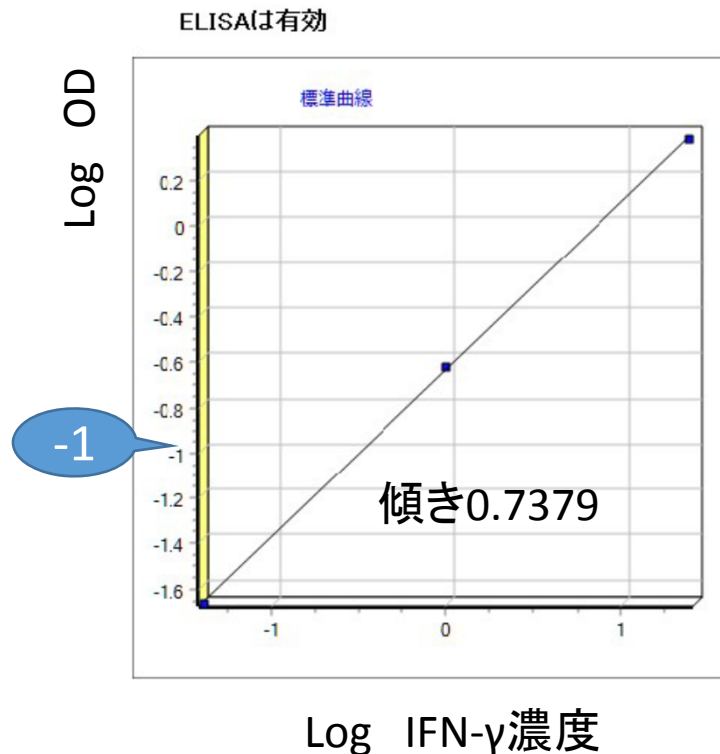
- 2019年度調査においてS2戻り値はやや高値傾向となり検量線の評価に使えるのか？
- 2019年度では検量線上でS2は高値、S1は低値側にプロットされるものが多く、その原因の一つとしてS1 OD値が前年度(3G)に比べて高くなっていることが疑われた。
- レベル2のC評価は高値3施設、低値1施設であったが原因については不明であった。
- S1OD値と検量線の傾きには弱い相関がありそうだが、レベル2不良との因果関係は不明である。

事例紹介

1

Case 1 全自動分析装置

	S1 (4IU/mL)	S2 (1IU/mL)	S3 (0.25IU/mL)	S4 (0IU/mL)
OD	1.470	0.538	0.190	↑ 0.073
IFN- γ (IU/mL)	3.97	1.02	0.25	↑ 0.07



報告値

	IFN- γ (IU/mL)
レベル1	0.063 ↑
レベル2 (平均)	0.383 ↓

考えられる要因

- ・レベル1が高いため、洗浄不良？
- ・自動分析装置の問題
- ・スプリット間差
- ・使用器具・手技を含め、調査が必要

検体配置例

列	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1N	3N	5N	7N	9N	S1	S1	13N
B	1TB1	3TB1	5TB1	7TB1	9TB1	S2	S2	13TB1
C	1TB2	3TB2	5TB2	7TB2	9TB2	S3	S3	13TB2
D	1M	3M	5M	7M	9M	S4	S4	13M
E	2N	4N	6N	8N	10N	11N	12N	14N
F	2TB1	4TB1	6TB1	8TB1	10TB1	11TB1	12TB1	14TB1
G	2TB2	4TB2	6TB2	8TB2	10TB2	11TB2	12TB2	14TB2
H	2M	4M	6M	8M	10M	11M	12M	14M

プレートの中央2スプリットに標準液を配置し、スプリット間差などを吸収出来る配置。用手法で検体配置の自由度が高い場合に採用。

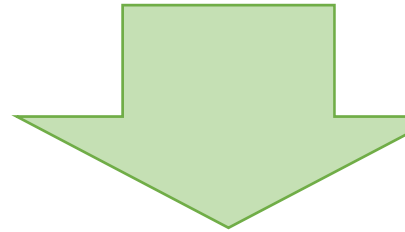
自動分析装置で採用されている検体配置例

列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	3N	5N	7N	9N	11N	12N	13N	15N	17N	19N	21N
B	S2	3TB1	5TB1	7TB1	9TB1	11TB1	12TB1	13TB1	15TB1	17TB1	19TB1	21TB1
C	S3	3TB2	5TB2	7TB2	9TB2	11TB2	12TB2	13TB2	15TB2	17TB2	19TB2	21TB2
D	S4	3M	5M	7M	9M	11M	12M	13M	15M	17M	19M	21M
E	S1	4N	6N	8N	10N	12N	14N	16N	18N	20N	22N	24N
F	S2	4TB1	6TB1	8TB1	10TB1	12TB1	14TB1	16TB1	18TB1	20TB1	22TB1	24TB1
G	S3	4TB2	6TB2	8TB2	10TB2	12TB2	14TB2	16TB2	18TB2	20TB2	22TB2	24TB2
H	S4	4M	6M	8M	10M	12M	14M	16M	18M	20M	22M	24M

プレートの左端第一スプリットに標準液を配置し、スプリット間差が吸収出来ない。検体配置の自由度が低く、毎回固定配置となる場合に採用されている。

提案

従来の検体配置図で標準液を別スプリットで測定するなどし、スプリット間差がある程度大きい事が確認された場合



列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	3N	5N	S1	9N	S1	S1	13N	S1	17N	S1	21N
B	S2	3TB1	5TB1	S2	9TB1	S2	S2	13TB1	S2	17TB1	S2	21TB1
C	S3	3TB2	5TB2	S3	9TB2	S3	S3	13TB2	S3	17TB2	S3	21TB2
D	S4	3M	5M	S4	9M	S4	S4	13M	S4	17M	S4	21M
E	S1	4N	6N	8N	10N	11N	12N	14N	16N	18N	20N	22N
F	S2	4TB1	6TB1	8TB1	10TB1	11TB1	12TB1	14TB1	16TB1	18TB1	20TB1	22TB1
G	S3	4TB2	6TB2	8TB2	10TB2	11TB2	12TB2	14TB2	16TB2	18TB2	20TB2	22TB2
H	S4	4M	6M	8M	10M	11M	12M	14M	16M	18M	20M	22M

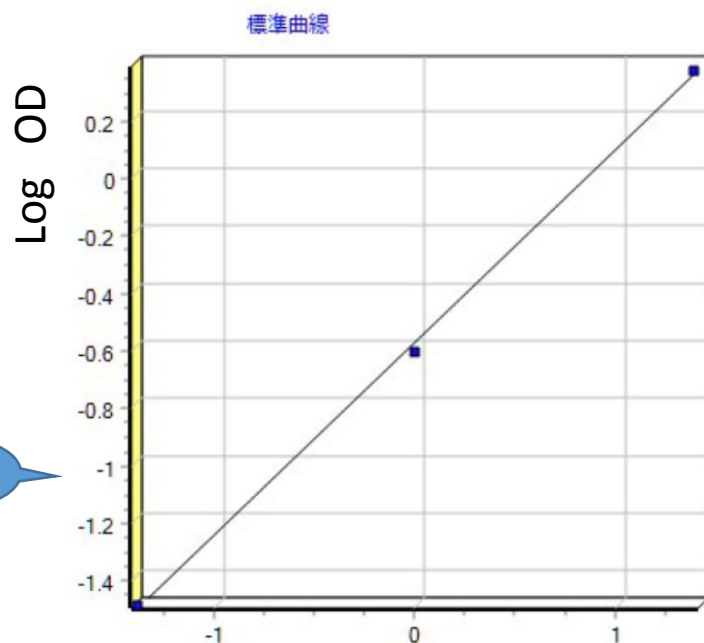
列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	S1	5N									21N
B	1TB1	S2	5TB1									21TB1
C	1TB2	S3	5TB2									21TB2
D	1M	S4	5M									21M
E	2N	4N										22N
F	2TB1	4TB1	6TB1									22TB1
G	2TB2	4TB2	6TB2									22TB2
H	2M	4M	6M	8M	10M	11M	12M	14M	16M	18M	20M	22M

プレートの左端第一，第二スプリットに分けて標準液を配置し、スプリット間差を吸収出来る配置に変更する。

49

Case2 用手法

	S1 (4IU/mL)	S2 (1IU/mL)	S3 (0.25IU/mL)	S4 (0IU/mL)
OD	1.461	0.548	0.227	↑ 0.136
IFN- γ (IU/mL)	4.10	0.95	0.26	↑ 0.12



報告値

	IFN- γ (IU/mL)
レベル1	0.04
レベル2(平均)	0.41

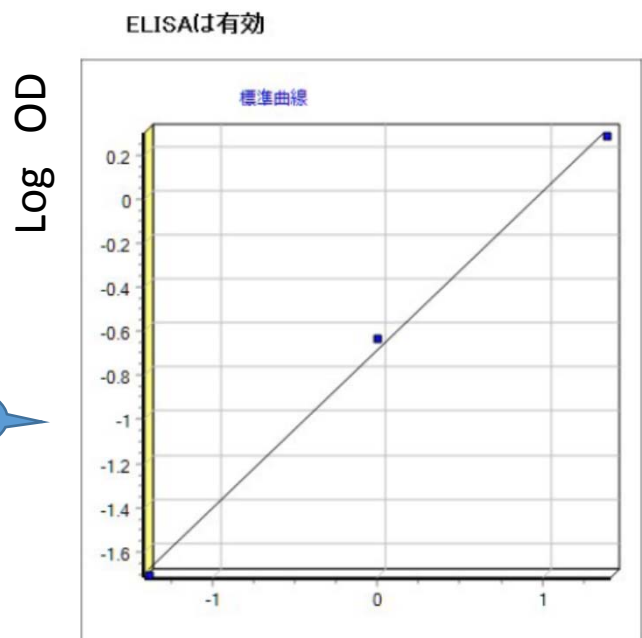
考えられる要因

・S4ODのみ高いため、試料の取り扱い、洗浄不良や事務的な問題がなかったか確認が必要です

41

Case3 用手法

	S1 (4IU/mL)	S2 (1IU/mL)	S3 (0.25IU/mL)	S4 (0IU/mL)
OD	1.332	0.532	0.182	0.054
IFN- γ (IU/mL)	3.86	1.07	0.24	0.04



報告値

	IFN- γ (IU/mL)
レベル1	0.020
レベル2(平均)	↓ 0.307

考えられる要因

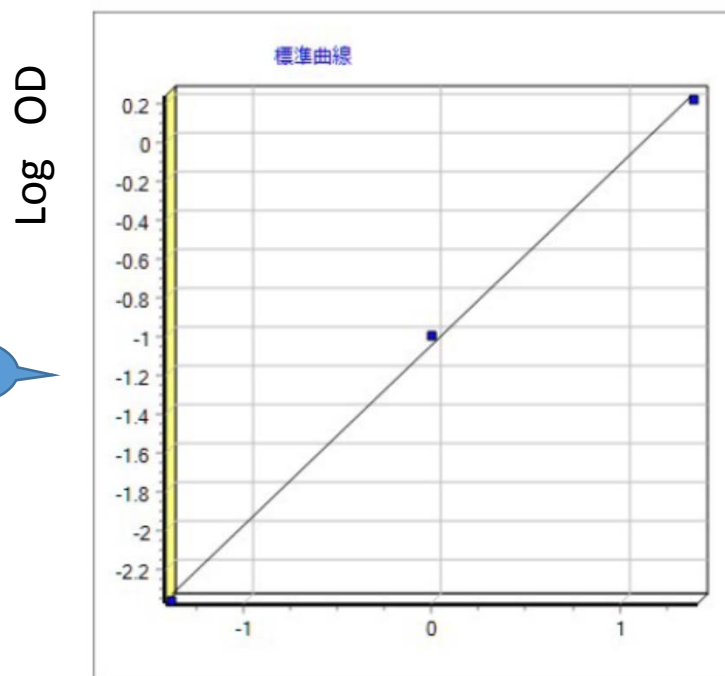
・レベル2のみ低いため、試料の取り扱い、スプリット間差の影響、ピペットの不良などがなかったか確認が必要です

35

Case4 用手法

	S1 (4IU/mL)	S2 (1IU/mL)	S3 (0.25IU/mL)	S4 (0IU/mL)
OD	1.250	0.371	0.095	0.016
IFN- γ (IU/mL)	3.90	1.05	0.24	0.04

ELISAは有効



報告値

	IFN- γ (IU/mL)
レベル1	0.033
レベル2(平均)	↑ 0.670

考えられる要因

・レベル2のみ高いため、試料の取り扱い、スプリット間差の影響、ピペットの不良などがなかったか確認が必要です

残された課題

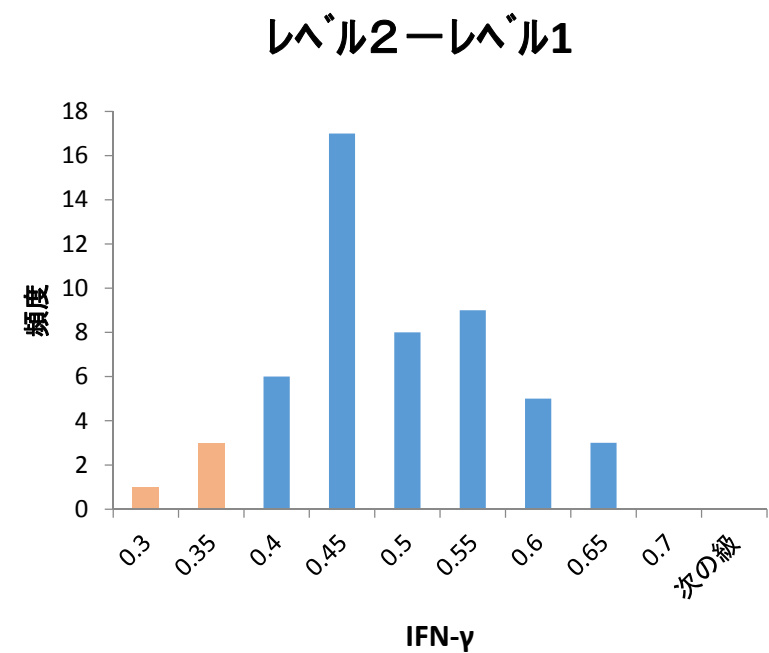
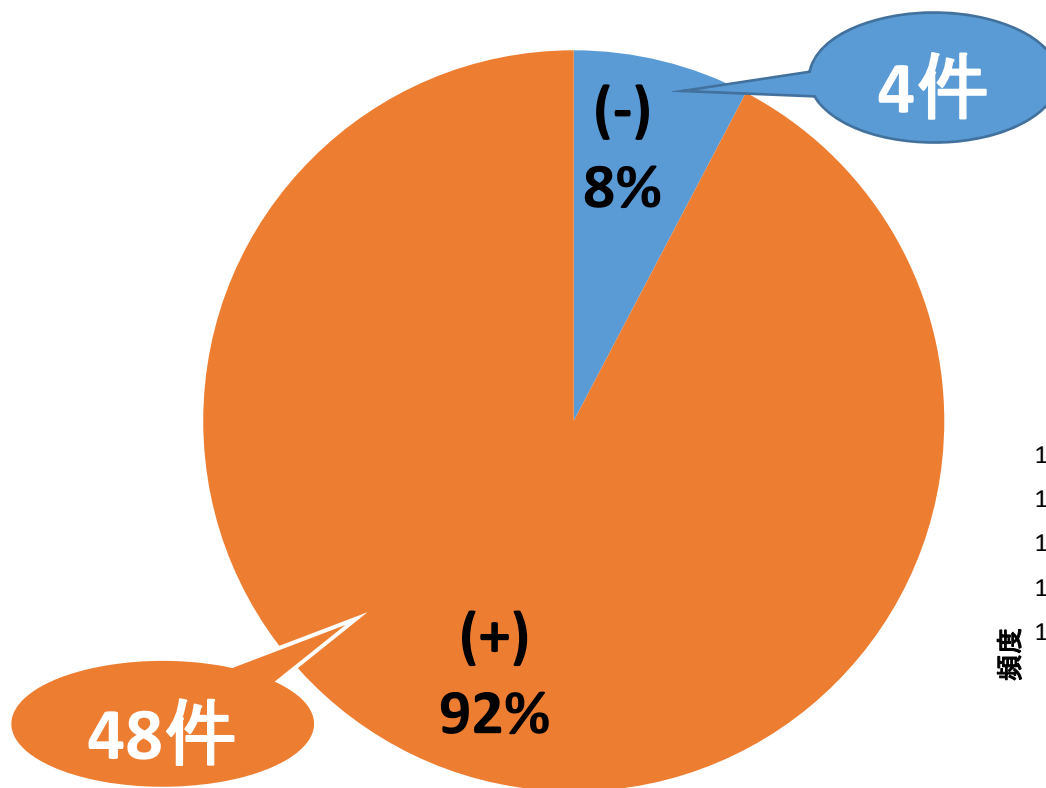
- S1 OD高値の影響は？
- QFT検査におけるLot間差は？
- QFT検査におけるスプリット間差は？
- QFT検査は定性検査だがIFN- γ 値の施設間差は検査の性能上において許容出来るのか？

QFT－4G判定基準

Nil値 (IU/mL)	TB1値 (IU/mL)	TB2値 (IU/mL)	Mitogen値 (IU/mL) *1	結果	解釈
8.0 以下	0.35以上 かつNil値 の25%以上	不問	不問	陽性	結核感染を 疑う
	不問	0.35以上 かつNil値 の25%以上			
	0.35未満、あるいは 0.35 以上かつNil値の25%未満		0.5以上	陰性	結核感染し ていない
			0.5未満	判定 不可	結核感染の 有無につい て判定でき ない
8.0を 超える	不問				

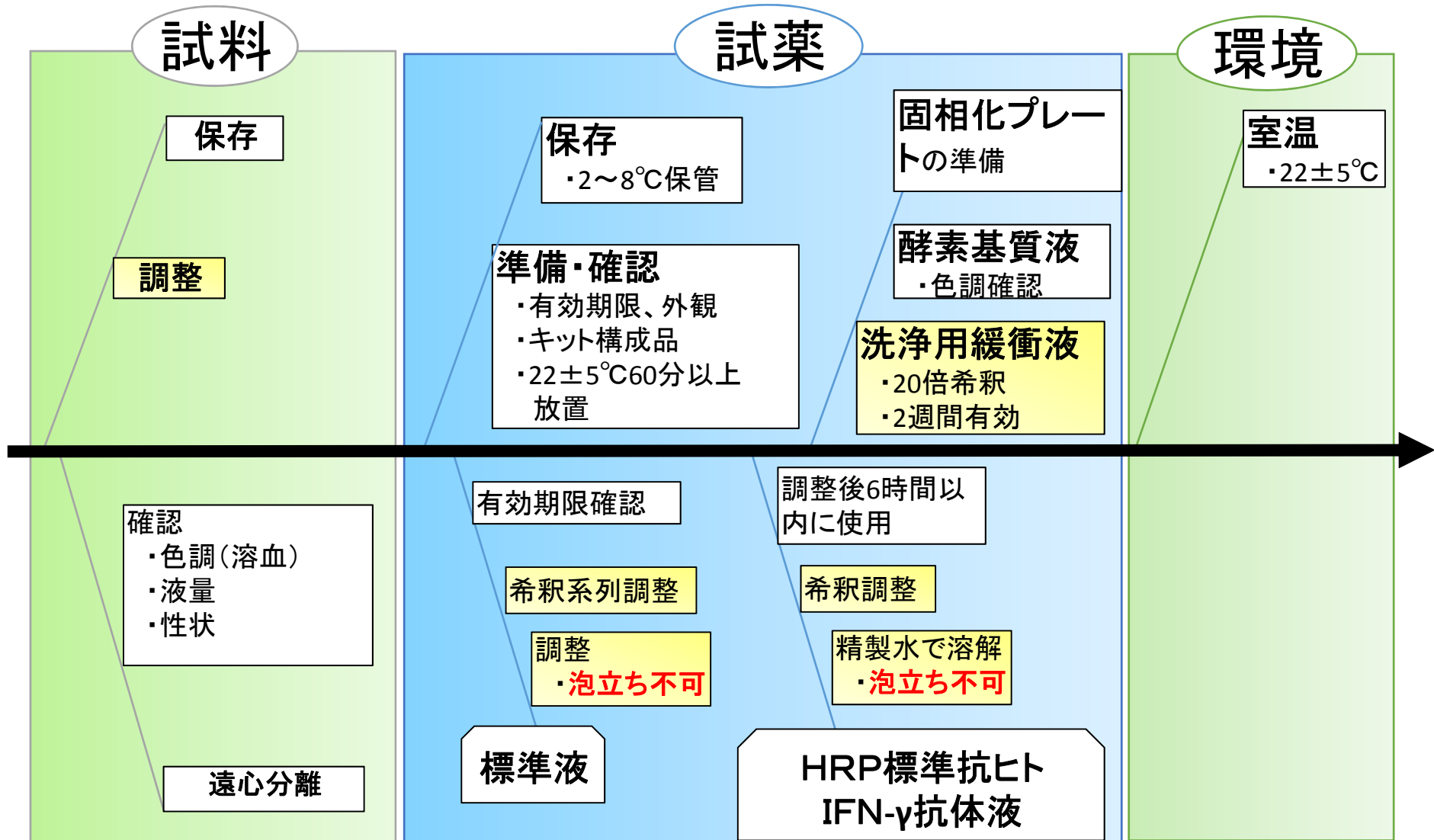
QFT－4GよりIFN－ γ は8IU/mLまでデータを担保する必要がある。
しかし、S1 ODが高い試薬で8IU/mLまで直線性が得られるの
か？ 比色計の性能を超えていないか？

(レベル2－レベル1)値を定性変換した場合の判定のばらつき



終了

ELISA測定 準備



ELISA測定

