

衛生微生物技術協議会第39回研究会 滋賀県大津市

2018年7月5日(木)

国立感染症研究所 ウイルス第1部

イム チャンガン
世話人 林 昌 宏

アルボウイルスレファレンスセンター

担当ブロック	機関	担当部・課
世話人	国立感染症研究所	ウイルス第1部第2室 林 昌宏
北海道・東北ブロック	宮城県保健環境センター	微生物部
関東・甲信越ブロック	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科
東海・北陸ブロック	名古屋市衛生研究所	微生物部
	三重県保健環境研究所	微生物研究課
近畿ブロック	大阪健康安全基盤研究所	微生物部ウイルス課
	神戸市環境保健研究所	感染症部
中国・四国ブロック	広島県立総合技術研究所保健環境センター	保健研究部
九州ブロック	熊本県保健環境科学研究所	微生物科学部

H29年度レファレンス活動報告

- 近年の日本脳炎の流行状況について情報提供
- フラビウイルス・アルファウイルスに対する実験室診断の実施
- フラビウイルス遺伝子検査用プライマープローブセットの情報更新
- デングウイルス遺伝子検査用陽性コントロールの配布

当室におけるリアルタイムRT-PCR法によるアルボウイルス遺伝子検出法

患者検体(血液、血清、血漿、尿、唾液等)



RNA抽出

(Roche社 High Pure Viral RNA kit)



ワンステップ
リアルタイム
RT-PCR

48°C (RT reaction)	5 min	1 cycle
95°C	20 sec	1 cycle
95°C	3 sec	40 cycles
57°C	30 sec	

Thermo Fisher社
・StepOnePlus
・Quantistudio5
を使用

必要に応じて通常のRT-PCR法によりウイルス遺伝子を増幅後、塩基配列を決定し、遺伝子解析を行っている

当室で使用しているJEVおよびWNV用リアルタイムPCRプライマープローブセット

Geno-type	Primer	Sequence	Probe	Sequence	
GI,III	JEen562s-585	CTG GAY TGT GAR CCA AGG A	JEen585pb	FAM-ACT RAA CAC TGA AGC GT-MGB	GI,III共通
	JEen623c-585	GAH CCC ACG GTC ATG A			
GI	JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE1en1082pb	FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB	GI特異的
	JE1en1119c-1082	GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA			
GIII	JE1&3en1052s-1082	ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE3en1082pb	FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB	GIII特異的
	JE3en1119c-1082	AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA			
JEV GI,III,V (WNV)	JENS5s269	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	JENS5p294	FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	実際は3'NCR (10500付近) WNVにも反応
	JENS5r330.2	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG			
I,III,V	JE(I,III,V)E819f	GTA YTC DAG CTC AGT GAA GTT	JEVGV.F843fM	FAM-TTC TGG YCA CCT CA-MGB	GV特異的
	JE(I,III,V)E927r	VGA GAA YTT YTC TGT RCA CAT	JEVG13c.F871fM	FAM-ATG GAC AAA CTG GCT C-MGB	感度低い
WNV com	WNVcommon.3451f:	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNV3538p	FAM-ATG ATT GAY CCT TTT CAG YTG GGC CTT CTG-TAMRA	WNV特異的であるが、非常に弱くJEVが増幅することがある
	WNVcommon.3590r:	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC			

赤が第一選択。3セットすべてを使用することにより、JEVとWNVの両方に対応可能。

3セットすべてを使用することにより、JEVとWNVの両方に対応可能なリアルタイムPCRプライマープローブセット

	Name	Sequence	
Primer	JEen562s-585	CTG GAY TGT GAR CCA AGG A	GI,III共通
	JEen623c-585	GAH CCC ACG GTC ATG A	
Probe	JEen585pb	FAM-ACT RAA CAC TGA AGC GT-MGB	
Primer	JENS5s269	GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	GI,III,V WNV共通
	JENS5r330.2	TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG	
Probe	JENS5p294	FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	
Primer	WNVcommon. 3451f:	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNV
	WNVcommon. 3590r:	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	
Probe	WNV3538p	FAM-ATG ATT GAY CCT TTT CAG YTG GGC CTT CTG-TAMRA	

当室で使用しているダニ媒介脳炎ウイルス用リアルタイムPCR プライマープローブセット

	Name	Sequence
Primer	F-TBE1	GGG CGG TTC TTG TTC TCC
	R-TBE1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT
Probe	TBE-Probe-WT	FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA

Schwaigar et al. JCV 27:136-145, 2003

当室で使用している黄熱ウイルス用リアルタイムPCR プライマープローブセット

Set B

	Name	Sequence
Primer	YF-4769F	TTGATTCCATCTTGGGCTTC
	YF-4862C	GGACCTCTTCCTCTCCATCC
Probe	YF-4804FAM	FAM-TGTCGCCTATGGTGGCTCATGGAAG-TAMRA

Set D (set Bを改変)

	Name	Sequence
Primer	YFcom-4769F	TTGRTTCCATCYTGGGCTTC
	YFcom-4862C	GGACCTCYTCYTCHCCATCC
Probe	YFcom-4803FAM	FAM-TKGTBGCCTATGGTGGCTCATGGAAGCTG-TAMRA

両方とも使用することにより、より広範な黄熱ウイルスに対応可能。

尿や全血からの日本脳炎ウイルス(ゲノム)の検出例

Open Forum Infect Dis. 2017 Sep 27;4(4):ofx203. doi: 10.1093/ofid/ofx203.

Prolonged Detection of Japanese Encephalitis Virus in Urine and Whole Blood in a Returned Short-term Traveler.

Huang GKL, Tio SY, Caly L, Nicholson S, Thevarajan I, Papadakis G, Catton M, Tong SYC, Druce J.

Abstract

We describe a fatal case of Japanese encephalitis virus infection following short-term travel to Thailand. Viral RNA was detected in urine and whole blood out to 26 and 28 days, respectively, after the onset of symptoms. Live virus was isolated from a urine specimen from day 14.

しかし、否定的な報告もある。

Clin Infect Dis. 2013 Jul;57(1):157-8.

Japanese encephalitis virus RNA **not detected in urine.**

Zhao H, Wang YG, Deng YQ, Song KY, Li XF, Wang HJ, Zhu CM, Qin ED, Qin CF.

H30年度レファレンス活動報告

- これまでのジカウイルス輸入症例について情報提供
- フラビウイルス・アルファウイルスに対する実験室診断の実施
- フラビウイルス遺伝子検査用プライマープローブセットの情報更新
- ダニ媒介脳炎ウイルス遺伝子検査用陽性コントロールの配布

本年度もアルボウイルスサーベイランス
についてご協力をお願いします