

Realtime RT-PCR assays for the detection of pandemic (H1N1) 2009 virus, seasonal influenza viruses or avian (only group protocol No.2) influenza A viruses

Group protocol No.1²⁰

This protocol describes realtime RT-PCR procedures for the detection of:

1. Influenza type A viruses (M gene)
2. Pandemic (H1N1) 2009 virus (H1 gene)
3. Seasonal influenza A (H1N1) and A (H3N2) viruses (H1h, N1h, H3h, N2h genes)

This protocol is to be used in case of suspicion of human infection by the pandemic (H1N1) 2009 virus.

The following testing strategy is recommended:

- RNA extraction.
- Amplification in parallel of M, H1 pandemic and GAPDH (to assess quality of the specimen and extraction procedure) genes.
- In a separate set, amplification of the H1h, N1h, H3h and N2h genes.
- All the above genes are tested in a single plex and not in a multiplex format.

Materials required

- QIAamp Viral RNA (QIAGEN mini Kit 50) (Qiagen®, Cat. No. 52904)
- SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR System (Invitrogen, Cat. No. 11732-020)
- Superscript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR system (Invitrogen, Cat. No. 11732-088)
- Non acetyled BSA 10% (Invitrogen, Cat. No. P2046)
- LightCycler 1.5 or 2.0 (Capillaries)
- LightCycler 480
- 7500 Real-Time PCR System, Applied® Biosystems
- Smart Cycler® Cepheid

Nucleic acid extraction

RNA is extracted from specimens using the QIAamp Viral RNA kit (QIAGEN® Mini Kit 50 ref 52904). RNA extracted from 200 µl of the original sample is eluted in 60 µl of elution buffer.

All primers and probes described below were validated under the following conditions using the above equipment and reagents mentioned in the materials required section above.

Adjustments may be required for the use of other kits or other real-time PCR instruments.

Primers and probes for the detection of influenza A viruses (M gene), GAPDH and the influenza A (H1N1) pandemic 2009 virus (H1swl gene) were also validated under the following conditions:

RT-PCR Mix kit:

²⁰ Unité de Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires. Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux 75724, Paris Cedex 15, France. Email: grippe@pasteur.fr; <http://www.pasteur.fr>

- Invitrogen Superscript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR system (Cat. No.: 11732-088)

Real-time PCR equipments:

- 7500 Applied® Biosystems
- SmartCycler® Cepheid

Primers and probes

If the sample is positive for M and negative for H1sw, we suggest use of the H1N1h and H3N2h sets of primers.

Type/subtype	Gene	Name	Sequences	Bases	PCR Product size	Reference
Seasonal H1N1	HA	H1h-678Fw	CACCCAGAAATAGCCAAAA	20		1
Seasonal H1N1	HA	H1h-840Rv	TCCTGATCCAAAGCCTCTAC	20	163 bp	1
Seasonal H1N1	HA	H1h-715probe	5'-Fam-CAGGAAGGAAGAATCAACTA 3'-BHQ-1	20		1
Seasonal H3N2	HA	H3h-177Fw	GAGCTGGTTCAGAGTTCCTC	20		1
Seasonal H3N2	HA	H3h-388Rv	GTGACCTAAGGGAGGCATAATC	22	211 bp	1
Seasonal H3N2	HA	H3h-306Probe	5'-Fam-TTTTGTGAACGCAGCAAAG 3'-BHQ-1	20		1
Seasonal H3N2	NA	N2h-1150 Fw	GTCCAMACCTAAYTCAA	18		1
Seasonal H3N2	NA	N2h-1344 Rv	GCCACAAAACACAACAATAC	20	194 bp	1
Seasonal H3N2	NA	N2h-1290 probe	5'-Fam-CTTCCCCTTATCAACTCCACA-3'-BHQ-1	21		1
Seasonal H1N1	NA	N1h-1134 Fw	TGGATGGACAGATACCGACA	20		1
Seasonal H1N1	NA	N1h-1275 Rv	CTCAACCCAGAAGCAAGGTC	20	142 bp	1
Seasonal H1N1	NA	N1h-1206 probe	5'-Fam-CAGCGGAAGTTTCGTTCAACAT 3'-BHQ-1	22		1
Pandemic H1N1	HA	GRswH1-349Fw	GAGCTAAGAGAGCAATTGA	19		1
Pandemic H1N1	HA	GRswH1-601Rv	GTAGATGGATGGTGAATG	18	253bp	1
Pandemic H1N1	HA	GRswH1-538Probe(-)	Fam 5'-TTGCTGAGCTTTGGGTATGA -3'-BHQ-1	20		1
Influenza type A		GRAM/7Fw	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA	23		2
Influenza type A		GRAM/161Rv	GGTGACAGGATTGGCTTGCTTTA	25	202 bp	2
Influenza type A		GRAM probe/52/+	5'-Fam-TCAGGCCCTCAAAGCCGAG 3'-BHQ-1	21		2
Human internal control	GAPDH	GAPDH-6Fw	GAAGGTGAAGTCCGGAGT	18		3
Human internal control	GAPDH	GAPDH-231Rv	GAAGATGGTGATGGGATTC	20	226 bp	3
Human internal control	GAPDH	GAPDH-202Probe(-)	5'-Fam-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-3'-BHQ-1	20		3

1. National Influenza Center (Northern-France), Institut Pasteur, Paris.

2. Wong et al., 2005, J. Clin. Pathol. 58;276-280.

3. National Influenza Center (Southern-France), CHU, Lyon.

Procedure

LightCycler 1.5 or 2.0 (Capillaries) (ROCHE)

Reagent	Volume (μ l)	Final concentration
H ₂ O PPI	1.06	
Reaction mix 2x	10.0	3.0 mM Mg
MgSO ₄ (50mM)	0.24	0.6 mM Mg
Forward Primer (10 μ M)	1.0	0.5 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1.0	0.5 μ M
Probe (10 μ M)	0.4	0.2 μ M
BSA non acetylated (10mg/ml)	0.5	0.25 mg/ml
Superscript III RT/Platinum Taq Mix	0.8	
Total	15.0	

LightCycler 480 (96-well format) (ROCHE)

Reagent	Volume (μ l)	Final concentration
H ₂ O PPI	1.56	
Reaction mix 2x	10.0	3.0 mM Mg
MgSO ₄ (50mM)	0.24	0.6 mM Mg
Forward Primer (10 μ M)	1.0	0.5 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	1.0	0.5 μ M
Probe (10 μ M)	0.4	0.2 μ M
Superscript III RT/Platinum Taq Mix	0.8	
Total	15.0	

15 μ l of reaction mix + 5 μ l of RNA samples.

7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) or SmartCycler (Cepheid) Real-Time PCR machines

Reagent	Volume (μ l)	Final concentration
H ₂ O PPI	1.5	
Reaction mix 2x	12.5	3.0 mM Mg
Forward Primer (10 μ M)	2.0	0.8 μ M
Reverse Primer (10 μ M)	2.0	0.8 μ M
Probe (10 μ M)	1.0	0.2 μ M
ROX reference dye (diluted 1/10)	0.5	
Superscript III RT/Platinum Taq Mix	0.5	
Total	20.0	

20 μ l of reaction mix + 5 μ l of RNA samples

Controls

Each real-time RT-PCR assay includes additional unknown samples:

- Two negative samples bracketing unknown samples during RNA extraction (negative extraction controls);
- Positive controls (in duplicate); when using *in vitro* synthesized transcripts as controls include five quantification positive controls (in duplicate) including 10^4 , 10^3 and 10^2 copies of *in vitro* synthesized RNA transcripts; and
- One negative amplification control.

LightCycler System

Amplification cycles:	Temperature (°C)	Time (minute:second)	No. of cycles
Reverse transcription	45	15:00	1
Denaturation	95	3:00	1
Amplification	95	0:10	} 50
	55	0:10	
	72	0:20	
Cooling	40	0:30	1

7500 Applied or Smartcycler System

Amplification cycles:	Temperature (°C)	Time (minute:second)	No. of cycles
Reverse transcription	50	2:00	1
Denaturation	95	15:00	
Amplification	95	0:15	50
	60	0:40	

Sensitivity

For the M real-time RT-PCR

Sensitivity is about 100 copies of RNA genome equivalent per reaction (95% confidence level). This amount of target sequences is always detected, however, the probability to detect lower amounts of virus decreases accordingly. In our settings, samples containing 10 copies could be detected.

For the H1 pandemic real-time RT-PCR

Sensitivity is comparable to that of the M real-time RT-PCR and comparable to the sensitivity of the CDC kit (Cp <36 for all positive specimens tested so far).

For the H3h and N2h real-time RT-PCR

Sensitivity of the H3h real-time RT-PCR is equivalent to that of the M real-time PCR (Cp H3h ≈ Cp M) but the sensitivity of the N2h real-time RT-PCR is lower (Cp N2h ≈ Cp M + 5 Cp)

For the H1h and N1h real-time RT-PCR

Sensitivity of the N1h real-time RT-PCR is equivalent to that of the M real-time PCR (Cp N1h ≈ Cp M) but the sensitivity of the H1h real-time RT-PCR is lower (Cp H1h ≈ Cp M + 4 Cp).

Specificity

For the H1 pandemic real-time RT-PCR

So far, limited testing showed no detection for seasonal influenza viruses (influenza A(H1N1), A(H3N2), B) nor for specimens known to be positive for other respiratory viruses (influenza C, RSV A, B, hBoV, hPIV1,3, hMPV, HRV, enterovirus, adenovirus, CMV, HSV, VZV).

For swine influenza viruses, detection was positive for A/sw/England/117316/86 (classical swine lineage) and negative for A/sw/England/502321/94 (H3N2).

For pandemic (H1N1) 2009 viruses, detection was positive for A/California/4/2009, as well as for more than 10 specimens positive for the novel A(H1N1) pandemic virus.

NOTE: The H1 pandemic real-time RT-PCR does not detect the positive control from the CDC kit.

Positive control for M and GAPDH real-time RT-PCR

Positive control for M real-time RT-PCR is an *in vitro* transcribed RNA derived from strain A/Paris 650/06(H1N1). The transcript contains the Open Reading Frame of the M gene (from the ATG to nt 982) as negative standard. Each microtube contains 10^{11} copies of target sequences diluted in yeast tRNA and lyophilised.

Positive control for GAPDH real-time RT-PCR is an *in vitro* transcribed RNA. The transcript contains the Open Reading Frame of the M gene (from nt 6 (ATG = 1) to nt 231) as a negative strand. Each microtube contains 10^{11} copies of target sequences diluted in yeast tRNA and lyophilised.

Reconstitution of transcribed RNA

- Add 100 μ l of distilled water to obtain a solution at a concentration of 10^9 copies/ μ l. Store at -80°C .
- Dilute in H_2O to prepare a master bank at 2×10^6 copies/ μ l. Store at -80°C .
- From this, prepare a working bank of reagent at 2×10^4 copies/ μ l in order to avoid freeze/thaw cycles. Working tubes may be stored at -20°C for less than one week.
- Positive controls are available upon request at grippe@pasteur.fr.

Interpretation of results

GAPDH reactions should give a $C_p < 35$; if higher and otherwise negative results are obtained this may result from:

- Poor quality of the specimen with insufficient number of cells; obtain a new specimen for the same patient.
- Presence of inhibitors; repeat the procedure with dilutions of the extracted RNA (e.g. 1:10, 1:100) and/or repeat RNA extraction.

Positive reactions for M and H1 pandemic and negative reactions for H1h, N1h, H3h, N2h: confirmed case for pandemic (H1N1) 2009 virus.

Positive reaction for M and negative for H1 pandemic and for H1h, N1h, H3h, N2h (usually seen for low virus load in specimen), repeat reactions and/or repeat RNA extraction.

Positive reaction for M and either N1h or H3h but negative for H1 pandemic and for H1h and N2h (usually seen for low virus load in specimen) may indicate an infection with seasonal virus; in this case, repeat reactions and/or repeat RNA extraction to determine subtypes.

Positive reaction for M and H1 pandemic virus and positive reaction for either N1h, H3h may reflect a cross-contamination or a possible co-infection with both the pandemic (H1N1) 2009 virus and a seasonal virus; repeat RNA extraction and repeat reactions with all necessary precautions to avoid cross-contamination.

Group protocol No. 2²¹

This protocol describes realtime RT-PCR procedures for the detection of:

1. Influenza type A viruses (M gene)
2. Pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus (N1 gene)
3. Pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus (HA gene)
4. Seasonal influenza A (H1N1) and A (H3N2) viruses (H1h, H3h, genes)
5. Avian influenza A (H5) viruses, including highly pathogenic H5N1 viruses
6. Avian influenza A (H7) viruses
7. Influenza type B viruses

Materials required

1. ABI7500 machine
2. TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents kit (Applied Biosystems, Cat. No. N8080236)
3. Amplification and detection is performed on ABI7500 machine with the TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents kit (Applied Biosystems), Using 20 µl of RNA extract in an end volume of 50 µl

Test validation

All tests have been optimized and validated to work in the platform described above. They have not been optimized for other platforms and other reagents. For instance, some of these tests do not work well with other reagents (e.g. Ampli-Taq Gold).

The influenza B virus test, the influenza A virus M-gene test, the human influenza A/H1 virus test, and the human influenza A/H3 virus test have been used successfully for several years in a diagnostic virology laboratory with human specimens. The influenza A virus M-gene test, the influenza A/H5 virus tests and the influenza A/H7 test have been used successfully for several years in a diagnostic virology laboratory with human and animal specimens.

The seasonal influenza A/H1 test does not detect the pandemic H1N1 2009 virus H1 sequences, only seasonal influenza A (H1N1) virus H1 sequences. The pandemic H1N1 2009 NA and HA tests do not detect seasonal influenza A (H1N1) NA or HA sequences, only N1 and H1 of the pandemic H1N1 2009 virus sequences. This has been validated using sets of numerous recent human H1N1 viruses and swine and the pandemic H1N1 viruses. In addition, the tests have proven successful in detecting sporadic cases of the pandemic H1N1 2009 viruses in The Netherlands.

²¹ Dept Virology, Erasmus MC Rotterdam, Netherlands. (www.virology.nl)

Reaction mixture (EZ RT-PCR)

Reagent	Volume (µl)
DEPC water	4.5 µl
5x Taqman EZ buffer	10.0 µl
Manganese acetate (25 mM)	6.0 µl
dNTP's	6.0 µl
Primer/probe mix (1 µl/reaction)	1.0 µl
rTth DNA Polymerase (2,5U/µl)	2.0 µl
Amperase UNG (1U/µl)	0.5 µl
Total mix volume	30.0
Input RNA	20.0 µl
Total volume	50.0

Thermal Cycling conditions

Temperature (°C)	Time (minute:second)	No. of cycles
50	02:00	1
60	30:00	1
95	05:00	1
94	00:20	40[a]
62	01:00	

[a] For pandemic (H1N1) 2009 NA and HA gene specific test, 45 cycles are used.

Primers and probes

Type/subtype	Primer/probe ²²	Gene fragment	Oligonucleotide sequence	Quantity/reaction (pmol)
Flu B	Primer 1	M	GAGACACAATTGCCTACCTGCTT	10
Flu B	Primer 2	M	TTCTTCCCACCGAACCAAC	40
Flu B	Probe	M	AGAAGATGGAGAAGGCAAAGCAGAAGCTAGC	5
Flu type A	Primer 1	M	AAGACCAATCCTGTACCTCTGA	40
Flu type A	Primer 2	M	CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC	30
Flu type A	Probe	M	TTGTGTTCACGCTCACCGTGCC	5
Flu A (H1N1) seasonal	Primer 1	HA	GAATAGCCCCACTACAATTGGGTAA	10
Flu A (H1N1) seasonal	Primer 2	HA	GTAATTCGCATTCTGGGTTTCCT	10
Flu A (H1N1) seasonal	Probe	HA	AAGATCCATCCGGCAACGCTGCA	10
Flu A (H3) seasonal	Primer 1	HA	GATGTGTACAGAGATGAAGCATTAAACA	40
Flu A (H3) seasonal	Primer 2	HA	TAGGATCCAATCTTTGTATCCTGACTT	15
Flu A (H3) seasonal	Probe 1	HA	AGCTCAACACCTTTGATCTGGAACCGG	10
Flu A (H3) seasonal	Probe 2	HA	AGCTCAACGCCTTTGATCTGGAACCGG	10
Flu A (H5N1) HPAI, Set 1	Primer 1	HA	GAGAGGAAATAAGTGGAGTAAATGGGA	30
Flu A (H5N1) HPAI, Set 1	Primer 2	HA	AAGATAGACCAGCTACCATGATTGC	2.5
Flu A (H5N1) HPAI, Set 1	Probe	HA	TTTATTCAACAGTGCGGAGTCCCTAGCACT	10
Flu A (H5N1) HPAI, Set 2	Primer 1	HA	GGAACCTACCAAATACTGTCAATTTATTCA	40
Flu A (H5N1) HPAI, Set 2	Primer 2	HA	CCATAAAGATAGACCAGCTACCATGA	2.5
Flu A (H5N1) HPAI, Set 2	Probe	HA	TTGCCAGTGCTAGGGAACCTGCCAC	10
Flu A (H7) AI viruses	Primer 1	HA	GGCAACAGGAATGAAGAATGTTCC	40
Flu A (H7) AI viruses	Primer 2	HA	AATCAGACCTTCCCATCCATTTTC	15
Flu A (H7) AI viruses	Probe	HA	AGAGGCCTATTTGGTGCTATAGCGGGTTTCA	10
Pandemic 2009 virus*	Primer 1	HA	GGAAAGAAATGCTGGATCTGGTA	30
Pandemic 2009 virus*	Primer 2	HA	ATGGGAGGCTGGTGTATTATAGC	30
Pandemic 2009 virus*	Probe	HA	TGCAATACAACCTGTCAGACACCCAAGGG	10
Pandemic 2009 virus	Primer 1	NA	ACATGTGTGTGCAGGGATAACTG	30
Pandemic 2009 virus	Primer 2	NA	TCCGAAAATCCCACTGCATAT	30
Pandemic 2009 virus	Probe	NA	ATCGACCGTGGGTGCTTTCAACCA	10

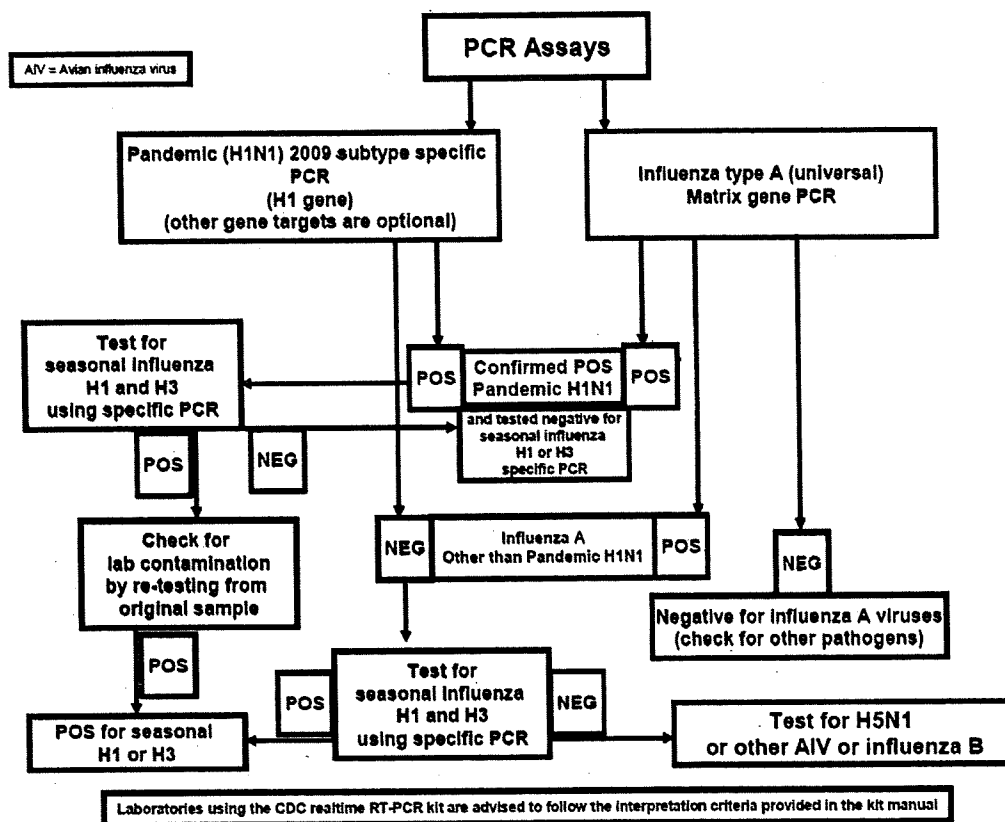
* A new protocol which did not exist in the 18 August 2009 version of this document.

Test result interpretation

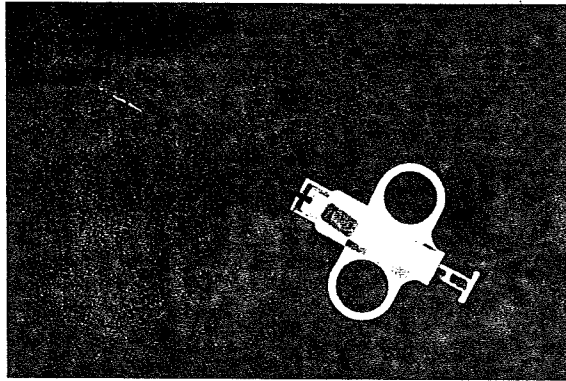
M gene pos, seasonal H1 pos, pandemic 2009 H1 and N1 neg: Human seasonal H1 influenza

M gene pos, seasonal H1 neg, pandemic 2009 H1 or N1 pos: pandemic (H1N1) 2009 virus

Annex 3:
PCR testing algorithm and results interpretation



In the event that consent for a full autopsy is not forthcoming, the attending physicians should consider a para-mortem needle biopsy approach. In Hong Kong, during the SARS outbreak in 2003, this was used in 24 of the 39 post-mortem cases. These biopsies can be obtained percutaneously and apart from minor puncture wounds there is no disfigurement to the body and infectious risk to autopsy personnel is low.



Trucut biopsy needle that can be used for needle sampling of organs.

LUNG

The area of the lung chosen for Trucut ideally should correspond to radiological signs of pneumonia. For negative control, a biopsy from a radiological normal area is also advised.

A minimum of four cores of tissue should be sampled, five if liquid nitrogen is available. It should be noted that samples involving fixation should be performed last so as to avoid potential cross contamination of specimen bottles.

Biopsy 1 (fresh): Half is put into viral transport medium, the other half is placed in OCT embedding media and frozen in liquid nitrogen, if it is available.

Biopsy 2 (fresh): *Placed in RNAlater Tissue Protect Tube (Qiagen®, Cat. No. 76163) ,if it is available.

Biopsy 3 – 70% Ethanol: Ethanol is a superior fixative to formalin for RNA extraction but is inferior for morphology. This fixative can be used if the tissue needs to be transported over

Annex 4:
Collection of autopsy tissues in resource-limited settings

This document should be read as a supplement to existing autopsy guidelines recommended by the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for submission procedures (see: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/tissuesubmission.htm>) and safety requirements (see: http://www.cdc.gov/h1n1flu/post_mortem.htm.)

The information below specifically supplements the above CDC information when rapid freezing and storage methods such as dry ice are not readily available, and also, if consent has only been given for a limited or para-mortem examination.

If consent has been given for a full autopsy/postmortem, then the relevant tissues should be ideally divided to be placed in appropriate containers for each of the following: (1) frozen tissue, (2) fixed in 70% alcohol (this gives better preservation of RNA than formalin), (3) placed in RNAlater Tissue Protect Tube (Qiagen®, Cat. No. 76163) for RNA preservation (see below), (4) virus transport medium for virus isolation and (5) 10% neutral buffered formalin.

For long term storage and transport, RNAlater (Ambion) Tissue Protect Tubes provide pre-measured volumes of RNAlater RNA Stabilization Reagent in re-closable tubes for convenient handling and sample storage. The reagent is **not** a fixative, but rather preserves RNA for up to one day at 37°C, seven days at 18–25°C, or four weeks at 2–8°C, allowing processing, transportation, storage, and shipping of samples without liquid nitrogen or dry ice. Alternatively, the samples can also be placed at –20°C or –80°C for archival storage. Morphological analysis, however, will be very difficult to interpret from tissues placed in this reagent.

Tissues to be sampled:

- Lung: all lobes, including affected areas
- Proximal and distal trachea
- Liver
- Brain
- Kidneys
- Nasopharynx (this is best done from a supratentorial approach with removal en bloc).

distance and liquid nitrogen is not available. (If the same Trucut needle is used for all biopsies fixation in ethanol should be done first as even a small amount of formalin in ethanol will impair RNA extraction).

Biopsy 4 and 5 – 10% neutral buffered formalin: This will allow good morphology to determine the extent of lung damage, secondary bacterial infection, etc. It will also enable immunohistochemistry to be performed for viral antibodies and co-localization studies to determine the cells infected with the infectious agent. Formalin fixed tissue can be used for RNA extraction but is less optimal as a fixative in this respect than alcohol. One of the biopsy samples should be processed for paraffin embedding; the other will remain in formalin for future extraction of RNA/DNA or electron microscope examination. It should be recognized that the RNA that is from formalin fixed tissue extracted will be degraded and one should not aim at amplifying fragments larger than 60-120 bp. If freshly prepared, 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M sodium cacodylate-HCl buffer pH 7.4) is available; a 1-2 mm sample from the core can be placed directly into this fixative for electron microscope examination.

OTHER ORGANS

Sampling of other organs, especially the spleen, bone marrow and liver, would be important (at least for standard histology), and for detecting the presence of virus (by culture, RT-PCR and viral antigen by immunohistology), and to look for haemophagocytosis or changes in these organs. To avoid possible PCR carryover contamination a new needle should be used for each organ. This is also important for determining the extent of disease dissemination.

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

「薬剤耐性新型インフルエンザウイルスの調査および
医療従事者コホートにおける新型インフルエンザ感染に関する研究」

分担研究者：押谷 仁（東北大学医学系研究科 微生物学分野 教授）

協力研究者：島袋梢、小田切崇、貫和奈緒、古瀬祐気、鈴木陽（東北大学医学系研究科）

研究要旨

研究 1：仙台市内で流行した新型インフルエンザウイルスおよびからオセルタミビル、ナザミビル投与後の患者から分離されたウイルスより両薬剤耐性ウイルスの検出を試みたが、NA 遺伝子の同定および薬剤耐性試験において確認できず、耐性株の流行は確認できなかった。

研究 2：仙台市内の小児科外来医療施設に勤務する 140 名の医療従事者を対象としたコホート研究にて、約 3 割が流行初期の段階で不顕性感染していると考えられた。

研究 1：「仙台市内における薬剤耐性インフルエンザ A(H1N1) ウイルスの 発生動向調査」

【背景】

2009 年 4 月にメキシコで報告されたブタ由来のインフルエンザ A(H1N1) ウイルス（以後 A(H1N1)pdm）の人への感染は、瞬く間に世界中に拡大した¹。分離株の解析より、M2 タンパク阻害薬であるアマンタジンに対して耐性をもっているが、幸いな事にノイラミニター阻害薬であるオセルタミビルおよびナザミビルに対して感受性を持っている事が確認された²。しかし、投薬された患者から散発的に薬剤耐性ウイルスの検出が報告されるようになった³。季節性 A(H1N1) ウイルスにおいては、2007/2008 シーズンでは日本国内数%であった耐性ウイルスの出現頻度が、2008/2009 シーズンではほぼ 100%になるなど、非常に速いスピードで耐性ウイルスへ移行しており⁴、今後 A(H1N1)pdm 薬剤耐性株の流行が懸念されている。

【目的】

仙台市におけるオセルタミビルおよびナザミビル耐性 A(H1N1)pdm の発生動向を調査する。

【方法】

2009 年 8 月 1 日から 12 月 31 日までに、仙台市内の 2 つの小児科外来施設において、インフルエンザ様症状を呈し迅速診断キット陽性であった患者より検体を採取し、MDCK 細胞によるウイルス分離を行った。細胞変性効果が確認され、赤血球凝集試験陽性であった培養上清から RNA を抽出し、complementary DNA を作成し、全 HA 遺伝子、NA 部分遺伝子を増幅し⁵、同部位の塩基配列を同定した。また、一部検体については、我々が考案したオセルタミビルの耐性遺伝子マーカーである H275Y を検出する Restriction Fragment Length Polymorphism（現在投稿中）をもちいた耐性株のスクリーニングを行った。また、同 2 施設において、タミフルもしくはナザミビル服用後患者より分離された 10 株について、前述の方法でのスクリーニングおよび、Oseltamivir および Zanamivir に対する薬剤感受性試験(IC50 測定)を行った。

【結果】

仙台市では、定点あたりのインフルエンザ報告数のピークは第 35 週から 39 週、42 週から 53 週ま

での二つが確認された⁶。研究期間中に分離された213株のうち、無作為抽出した116株を対象としHA遺伝子の全塩基配列を同定した。Nelson等が提唱した参照株と比較したところ、仙台市内の株はClade7に属しており⁷、時間の経過とともに変異が蓄積されていることが確認された。無作為抽出した32検体において、NA遺伝子の全塩基配列を同定したが、他の薬剤耐性マーカー⁸も含め確認できなかった。RFLPを用いた大量スクリーニングでは、検討133検体すべてがH275とオセルタミビルの耐性遺伝子変異を持っていなかった。ノイラミナーゼ阻害薬服用後の患者から分離した10株は、耐性遺伝子マーカーは陰性で、かつ両ノイラミナーゼ阻害薬のIC50も感受性のパターンであった。

【考察】

生産される抗インフルエンザ薬の約70%を使う本邦では、新型インフルエンザ流行に伴い薬剤耐性ウイルスの流行が危惧されている。2009年12月現在の流行中期までのデータでは、日本国内でのオセルタミビル耐性インフルエンザの検出頻度は1.6%と低い⁹。今回の仙台市内での流行全期間で行った調査においても同耐性ウイルスが1例も確認されなかった。また、オセルタミビルの小児への投与が行われていない現状を踏まえ、ザナミビル耐性株にも注目したが、すべて感受性であった。低い検出頻度を想定し、投薬患者からの耐性ウイルスの検出も試みたが、すべて感受性であった。インフルエンザにおいては、quasi-species^{8,10}も充分考慮する必要があるが、今回の検出方法ではクローニングをまでおこなっておらず、その可能性を十分検討しきれていない。今後はモニタリングと同時に、発生機序についても検討していく。

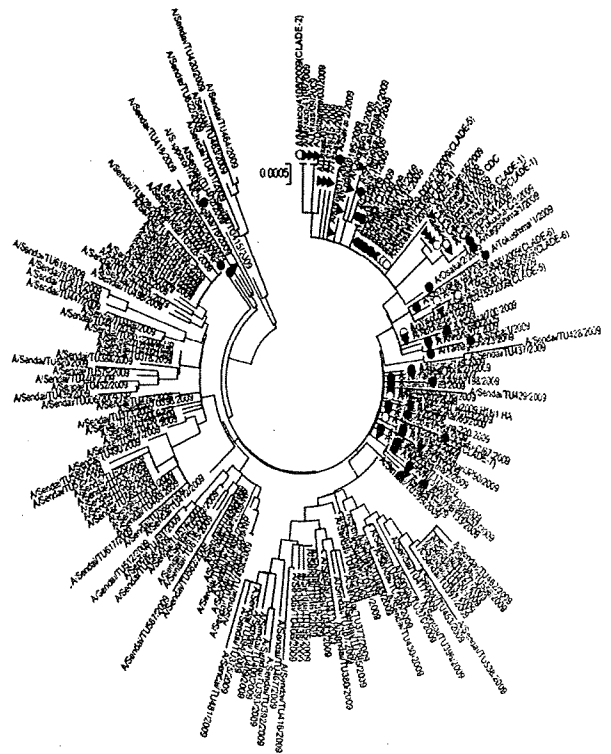


図1 仙台市内で分離されたA(H1N1)pdm

HA全遺伝子を用いた系統樹

● 国内参照株、▼ 海外参照株

研究 2 : 「医療従事者コホートにおける新型インフルエンザの感染に関する調査」

【背景】

感染症の伝播において、不顕再感染者の存在が注目されている¹¹。特に医療施設においては、医療従事者の不顕再感染が院内感染症対策の観点からも重要である。本邦においても新型インフルエンザ A(H1N1)pdm 対策の一環として、医療従事者へのワクチン接種が実施された。流行初期の報告において、医療従事者の職場での感染が報告されており¹²、感染の危険がある集団である事は事実である。しかし、A(H1N1)pdm の医療従事者における発症率の報告は現時点でない。

【目的】

日本における医療従事者の A(H1N1)pdm への罹患状況を調査し、その対方策を検討する。

【方法】

仙台市内の 18 の外来小児科医療施設に勤務している 140 名の医療従事者を対象としたコホート調査を、2009 年 10 月より開始した。咽頭拭い液を、医師から毎週、その他からは隔週で採取し、MDCK 細胞を用いたウイルス分離、PCR およびシーケンスによる A(H1N1)pdm 同定を行った。また、血清を医師から月二回、その他からは月一回で採取し、A(H1N1)pdm に対する抗体値を赤血球凝集阻止 (HI) 試験および中和試験 (NT) にて確認した。更に、参加者全員に健康調査票を連日記載してもらい、インフルエンザ様症状等の症状の有無を確認した。

【結果】

2009 年 10 月 16 日から 12 月 31 日までの期間、632 検体の咽頭拭い液、662 検体の血清を採取した。

=アンケート結果=

参加 140 名中、3 名が研究開始前にインフルエンザ様症状を訴えるかもしくは迅速診断キットで A 型インフルエンザが陽性と、新型インフルエンザに罹患している可能性が示唆された。経過観察中、7 名が感染を疑わせる何らかの症状を呈した。

=ウイルス分離=

咽頭から A(H1N1)pdm が分離されたのは、合計 7 名であった。そのうち、1 名は症状が無く、不顕性感染が疑われた。

=血清学的診断=

研究開始時の抗体調査で、HI 値が 1:40 以上となったのが 123 人中 35 人 (28%) であり、そのうち 1 名のみが感染を疑う症状があったと申告した。現在、中和試験との相関を検討中である。

表 1 新型インフルエンザに対する抗体価*

抗体価		
1:10 未満	33 人	27%
1:10	39 人	32%
1:20	16 人	13%
1:40	18 人	15%
1:80	11 人	9%
1:160	4 人	3%
1:320	2 人	1%
合計	123 人	

*赤血球凝集阻止試験による測定

【考察】

パンデミック発生時、小児科外来施設に勤務する医療従事者は、A(H1N1)pdm に暴露する可能性が非常に高い。本研究では、仙台における流行初期で 28% の医療従事者が抗体を有しており、かつそのほとんどが不顕性感染であった。感染者に占める不顕性感染の割合は、季節性インフルエンザで約 3 割だとする報告¹¹よりはるかに高い値になった。しかし、今回参加した施設の 9 割では勤務時にマスクを着用する等、感染対策をとっていることより、一般の方々の A(H1N1)pdm 不顕性感染より過小評価されている可能性も十分考えられる。また、職場で感染した事を証明する為にも、感染ルートの確認¹³を追加の聞き取り調査で行う。医療従事者の不顕性感染は、院内感染対策としても非常に

重要視すべき課題であり、ウイルス学的、免疫学的な解析を行っていく予定である。また、期間中に約4割の参加者がワクチンを接種しているため、抗体情報、ウイルス分離結果をふまえ、ワクチン効果の評価も行っていく。

【参考論文】

1. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58, 467-470 (2009).
2. Update: drug susceptibility of swine-origin influenza A (H1N1) viruses, April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 58, 433-435 (2009).
3. Baz, M., et al. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med* 361, 2296-2297 (2009).
4. Lackenby, A., et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill* 13(2008).
5. NITE/NIID. NITE/NIID Protocol for Sequencing Influenza A (H1N1) SWL Viral Genome Segments version 1.2 (30 May 2009). (2009).
6. 仙台市衛生研究所. 仙台市インフルエンザ等流行情報. (2009).
7. Nelson, M., et al. The early diversification of influenza A/H1N1pdm. *PLoS Curr Influenza*, RRN1126 (2009).
8. Hurt, A.C., Holien, J.K., Parker, M., Kelso, A. & Barr, I.G. Zanamivir-Resistant Influenza Viruses with a Novel Neuraminidase Mutation. *J Virol* (2009).
9. 国立感染症研究所感染症情報センター. <速報> 新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第1報]. (2009).
10. Chen, H., et al. Oseltamivir-resistant influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus, Hong Kong, China. *Emerg Infect Dis* 15, 1970-1972 (2009).
11. Hsu, S.B. & Hsieh, Y.H. On the role of asymptomatic infection in transmission dynamics of infectious diseases. *Bull Math Biol* 70, 134-155 (2008).
12. Cheng, V.C., et al. Prevention of nosocomial transmission of swine-origin pandemic influenza virus A/H1N1 by infection control bundle. *J Hosp Infect* (2010).
13. Williams, C.J., et al. Seasonal influenza risk in hospital healthcare workers is more strongly associated with household than occupational exposures: results from a prospective cohort study in Berlin, Germany, 2006/07. *BMC Infect Dis* 10, 8 (2010).

研究発表

1. 論文発表

【英文】

Furuse Y, et al. Reversion of Influenza A(H3N2) from Amantadine-resistant to Amantadine-sensitive by Further reassortment in Japan during the 2006-2007 Influenza Season. *Journal of Clinical Microbiology* 2009, vol.47, No3, p841-844

Furuse Y, et al. Large-Scale Sequence Analysis of M Gene of Influenza A Viruses from Different Species: Mechanisms for Emergence and Spread of Amantadine Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009 ;53(10):4457-63

Furuse Y, et al. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis. *Virology Journal* 2009 29;6:67

Furuse Y, et al. Reassortment between Swine Influenza A Viruses Increased their Adaptation to Humans in Pandemic H1N1/09. *Infection, Genetics & Evolution* (In Press)

【和文】

なし

2. 学会発表

【国際学会】

Mixed infection of influenza A viruses is common, 14th International Congress on Infectious Disease, March 2010, Miami, Florida

【国内学会】

古瀬祐気、「アマンタジン耐性株の進化様式への考察」第23回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム

古瀬祐気、「季節性インフルエンザウイルス A(H1N1)薬剤耐性遺伝子と リアソートメント」第63回日本細菌学会東北支部総会

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

鳥型からヒト型への変化に関する分子基盤および抗インフルエンザ創薬

研究分担者 鈴木康夫 中部大学生命健康科学部 教授

研究要旨 1) イムノクロマトを用いる簡便かつ高感度な鳥およびヒトインフルエンザウイルス(H5N1) レセプター認識特異性監視キットのプロトタイプ技術を構築した。2) 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1) の宿主動物(ネコ、イヌなど) 肺における N 結合型シアロ糖鎖レセプターの詳細な化学構造を明らかにした。3) ポビドン-ヨード(PVP-I) の抗インフルエンザウイルス活性およびその阻害機構を調べ、PVP-I のウイルスヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ機能の抑制、感染性の阻害機構を明らかにした。4) 様々な化学合成シアロ糖鎖につき、抗インフルエンザウイルス活性を調べ、いくつかの新規ウイルスシアリダーゼ活性阻害剤を見出した。

A. 研究目的

高病原性トリインフルエンザウイルスが変異してヒト-ヒト間伝播が可能となる変異を事前に予知する技術を開発するとともに、新型インフルエンザウイルスにも適応可能な抗インフルエンザ剤を創製する

B. 研究方法

合成シアロ糖鎖ポリマー、抗 H5 モノクローナル抗体およびイムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖結合特異性監視法を様々な条件で構築した。N 型-シアロ糖鎖の精密構造は、高速液体クロマト-質量分析により調べた。様々な天然、化学合成化合物につき、インフルエンザウイルス感染阻害、ヘマグルチニン、シアリダーゼ活性阻害評価を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

1. 合成シアロ糖鎖ポリマー、抗 H5 モノクローナル抗体およびイムノクロマト技術によるヒトおよび鳥インフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖認識 (Neu5Ac α 2-3Gal or 2-6) を簡便かつ迅速に測定するキットのプロトタイプ

を開発した。今後さらに高度化かつ適用範囲の拡大を目指す。

2. タイで分離された古典的ブタインフルエンザウイルス(H1) を発育鶏卵または MDCK で培養、その時における変異を調べた。発育鶏卵で培養した場合、ヘマグルチニン分子内アミノ酸置換 D190V/N または D225G 変異はマウスおよびヒツジ赤血球の凝集性を上げたがウサギ赤血球の凝集性を低下させた。さらに、鶏卵で分離された D225G 変異株はニワトリ赤血球の凝集性も高めた。シアログリコポリマー用いたレセプター結合特異性アッセイで、鶏卵培養ウイルスは、MDCK 培養株に対して Neu5Ac2-3Gal への結合性を高めることを確認した。以上から古典的ブタウイルスは発育鶏卵培養によりヘマグルチニンに変異が起こりレセプター結合特異性が異なってくる変異が起こることがわかった。
3. 鳥インフルエンザウイルスとヒトインフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖認識の相違を、X 線結晶解析の結果などを含めて物理化学 3 次元的視点から解明した。
4. トリ型ウイルスがなぜヒト型ウイルスへ変異するのか。その機構を明らかにするため、インフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖受容体 (N 結合型糖鎖) 構造を解析した。その結果、トリウイルスが増殖しやすいニワトリ発育鶏卵しょう尿膜細胞にはトリウイルス受容体 (Neu5Ac2-3Gal) が多く、ヒトウイルスが増殖しやすい羊膜細胞にはヒトウイルスレセプター (Neu5Ac2-6Gal) が多い事を見出した。また、ヒトウイルスはしょう尿膜細胞では増えにくい、これに繰り返し培養することでヒトウイルスがトリ型に変異することを確認した。
5. Povidone-iodine (PVP-I) は、1.56mg/ml の濃度でヒト (8株) および鳥インフルエンザウイ