

Urinalysis is not only a simple and low-cost test but is also useful for detecting severe renal injury; therefore the Infectious Diseases Society of America recommended urinalysis as a screening test for HIV-related renal disease.<sup>15</sup> However, urinalysis using a dipstick cannot detect urinary loss of low-molecular-weight protein, which is a typical finding in TDF-related tubular toxicity.<sup>25</sup> Although glucosuria can be observed in severe Fanconi's syndrome, it was not detected in mild tubular dysfunction. Renal tubular epithelial cells and granular casts are generally considered as a sensitive and specific marker for acute tubular necrosis. However, in this study, they were observed only three of five of the patients with severe TDF-associated renal toxicity. Additionally, they were sometimes observed nonspecifically in patients without acute or chronic renal dysfunction.

Progression of HIV infection causes chronic renal dysfunction, and a very low CD4 cell count (<50/ $\mu$ l) was reported to be a risk factor for TDF-associated renal toxicity.<sup>4</sup> However, this study suggested that a low CD4 cell count was not a risk factor for acute nephrotoxicity. A very low CD4 cell count (<50/ $\mu$ l) may be more frequently associated with renal damage than a moderately low CD4 cell count (<200/ $\mu$ l)<sup>26,27</sup>; in addition, nephrotoxic agents are frequently used in patients with very low CD4 cell counts, for example, NSAIDs, TMP-SMX, and amphotericin B.

In conclusion, prolonged treatment with TDF caused progressive proximal tubular dysfunction as well as a modest decline in GFR. A critical threshold of U-BMG or %TRP for discontinuing TDF was not determined, because this study was not designed to determine criteria guiding either the use of tenofovir or its discontinuation. However, if apparently abnormal tubular dysfunction, such as a persistent elevation of U-BMG >10,000  $\mu$ g/liter or a decline of %TRP (<80%), is observed, closer monitoring of GFR is necessary, and if possible, discontinuing TDF may be beneficial.

#### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

#### References

- Schooly RT, Ruane P, Myers RA, *et al.*, for the Study 902 Team: Tenofovir DF in antiretroviral-experienced patients: Results from a 48-week, randomized, double-blind study. *AIDS* 2002;16:1257-1263.
- Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, *et al.*, for the 903 Study Group: Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients. *JAMA* 2004;292:191-201.
- Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, *et al.*, for the Study 934 Group: Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N Engl J Med* 2006;354:251-260.
- Gallant JE, Parish MA, Keruly JC, *et al.*: Changes in renal function associated with tenofovir disoproxil fumarate treatment, compared with nucleoside reverse-transcriptase inhibitor treatment. *Clin Infect Dis* 2005;40:1194-1198.
- Fux CA, Simcock M, Wolbers M, *et al.*, for the Swiss HIV Cohort Study: Tenofovir use is associated with a reduction in calculated glomerular filtration rates in the Swiss HIV Cohort Study. *Antiviral Ther* 2007;12:1165-1173.
- Mocroft A, Kirk O, Gatell J, *et al.*, for the EuroSIDA Study Group: Chronic renal failure among HIV-1-infected patients. *AIDS* 2007;21:1119-1127.
- Julg BD, Bogner JR, Crispin A, *et al.*: Progression of renal impairment under therapy with tenofovir. *AIDS* 2005;19(12):1332.
- Verhelst D, Monge M, Meynard JL, *et al.*: Fanconi syndrome and renal failure induced by tenofovir: A first case report. *Am J Kidney Dis* 2002;40:1331-1333.
- Karras A, Lafaurie M, Furco A, *et al.*: Tenofovir-related nephrotoxicity in human immunodeficiency virus-infected patients: Three cases of renal failure, Fanconi syndrome, and nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Infect Dis* 2003;36:1070-1073.
- Peyriere H, Reynes J Rouanet I, Daniel N, de Boever, CM, Mauboussin JM, Leray H, Moachon L, Vincent D, and Salmon-Ceron D: Renal tubular dysfunction associated with tenofovir therapy: Report of 7 cases. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004;35:269-273.
- Zimmerman AE, Pizzoferrato T, Bedford J, Morris A, Hoffman, R, and Braden G: Tenofovir-associated acute and chronic kidney disease: A case of multiple drug interactions. *Clin Infect Dis* 2006;40:283-290.
- Cihlar T, Ho ES, Lin DC, and Mulato AS: Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. *Nucleoside Nucleotides Nucleic Acids* 2001;20:641-648.
- Izzedine H, Launay-Vacher V, and Deray G: Antiviral drug-induced nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 2005;45:804-817.
- Tanji N, Tanji K, Kambham N, Markowitz GS, Bell A, and D'aqati VD: Adefovir nephrotoxicity: Possible role of mitochondrial DNA depletion. *Hum Pathol* 2001;32:734-740.
- Gupta SK, Eustace JA, Winston JA, Boydston II, Ahuja TS, Rodriguez RA, Tashima KT, Roland M, Franceschini, N, Palella FJ, Lennox JL, Klotman PE, Nachman, SA, Hall SD, and Szczech LA: Guidelines for the management of chronic kidney disease in HIV-infected patients: Recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2005;40:1559-1585.
- Dube MP, Parker RA, Tebas P, Grinspoon SK, Zackin RA, Robbins GK, Roubenoff R, Shafer RW, Wininger DA, Meyer WA III, Snyder SW, and Mulligna K: Glucose metabolism, lipid, and body fat changes in antiretroviral-naïve subjects randomized to nelfinavir or efavirenz plus dual nucleosides. *AIDS* 2005;19:1807-1818.
- Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Teruya K, Genka I, Honda M, Tanuma J, Yazaki H, Ueda A, Kimura S, and Oka S: Urinary  $\beta_2$ -microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22(8):744-748.
- Papaleo A, Warszawski J, Salomon R, Jullien V, Veber F, Dechaux M, and Blanche S: Increased  $\beta$ -2 microglobulinuria in human immunodeficiency virus-1-infected children and adolescents treated with tenofovir. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(10):949-951.
- Vigano A, Zuccotti GV, Martelli L, Giacomet V, Cafarelli L, Borgonovo S, Beretta S, Rombola G, and Mora S: Renal safety of tenofovir in HIV-infected children: A prospective, 96-week longitudinal study. *Clin Drug Investig* 2007;27(8):573-581.
- Clinical practice guidelines of the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative of the National Kidney Foundation. Available at <http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines.cfm>.

21. Kinai E and Hanabusa H: Renal tubular toxicity associated with tenofovir assessed using urine-beta 2 microglobulin, percentage of tubular reabsorption of phosphate and alkaline phosphatase levels. *AIDS*. 2005;19(17):2031-2033.
22. Nelson MR, Katlama C, Montaner JS, Cooper DA, Gazzard B, Clotet B, Lazzarin A, Schewe K, Lange J, Wyatt C, Curtis S, Chen SS, Smith S, Bischofberger N, and Rooney JF, for the Tenofovir DF Expanded Access Team: The safety of tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HIV infection in adults: The first 4 years. *AIDS* 2007;21(10):1273-1281.
23. Gerard L, Chazallon C, Taburet AM, Girard PM, Aboulker JP, and Piketty C: Renal function in antiretroviral-experienced patients treated with tenofovir disoproxil fumarate associated with atazanavir/ritonavir. *Antiviral Ther* 2007;12:31-39.
24. Moore RD and Gallant JE: Renal function after use of tenofovir as part of the initial ART regimen. 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, October 25-28, 2008.
25. Kabanda A, Vandercam B, Bernard A, Lauwerys R, and van Ypersele de Strihou C: Low molecular weight proteinuria in human immunodeficiency virus-infected patients. *Am J Kidney Dis* 1996;27:803-808.
26. Earle KE, Seneviratne T, Shaker J, and Shoback D: Fanconi's syndrome in HIV<sup>+</sup> adults: Report of three cases and literature review. *J Bone Miner Res* 2004;19:714-721.
27. Kimmel PL, Barisoni L, and Kopp JB: Pathogenesis and treatment of HIV-associated renal diseases: Lessons from clinical and animal studies, molecular pathologic correlations, and genetic investigations. *Ann Intern Med* 2003;139:214-226.
28. Röling J, Schmid H, Fischereeder M, Draenert R, and Goebel FD: HIV-associated renal diseases and highly active antiretroviral therapy-induced nephropathy. *Clin Infect Dis* 2006;42:1488-1495.

Address reprint requests to:

*Ei Kinai*

*Department of Hematology*

*Ogikubo Hospital*

*Imagawa 3-1-24*

*Suginami-ku*

*Tokyo, Japan 167-8515*

*E-mail: ekinai@mui.biglobe.ne.jp*

## 妊娠と HIV 感染

佐野(嶋)貴子<sup>1)</sup>/山田里佳<sup>2)</sup>/谷口晴記<sup>3)</sup>/近藤真規子<sup>1)</sup>/  
今井光信<sup>1)</sup>/塚原優己<sup>4)</sup>

**(KEYWORDS)** HIV, 妊婦 HIV スクリーニング検査, 偽陽性, 母子感染

### 1. はじめに

日本の HIV 感染者は年々増加し続けており、2004 年以降は年間 1,000 件を超える HIV 感染者およびエイズ患者数が報告されている。現時点においては、HIV 感染者は男性が 9 割以上を占めており、女性の割合は 1 割に満たないが、母子感染予防の点から多くの妊婦が妊娠初期検査の一環として HIV 検査を受検している。本稿では、妊婦における HIV 検査の実態および実施上の問題点、HIV 感染妊娠と母子感染の現状などについて概説したい。

### 2. 妊婦における HIV 検査

日本における年間の出生数は 2005 年において 1,062,530 件<sup>1)</sup>、妊婦の HIV 検査の実施率は 94.6% と報告されており<sup>2)</sup>、現在では年間約 100 万人の妊婦の HIV 検査が実施されている。このうち 2005 年に報告された妊婦の HIV 陽性例は 40 例であり、母子感染例は 1 例である<sup>3)</sup>。HIV 母子感染は適切な予防対策〔HAART (highly active anti-retroviral therapy: 多剤併用療法)・帝王切開術・断乳など〕でその感染率を 0.5% 未満に低下させることが可能となっており<sup>3)</sup>、感染予防対策は妊婦が HIV に感染していることが確認されて初めて施行されることから、妊婦における HIV 検査は母親自身にとっても、産まれてくる

子どもにとっても非常に重要な検査となっている。しかし一方で、スクリーニング検査は偽陽性反応が出現するため<sup>4)</sup>、HIV 感染率が低い妊婦集団では、HIV スクリーニング検査の陽性例は偽陽性が多いことが指摘されている<sup>5-7)</sup>。

#### 1) スクリーニング検査の偽陽性率、陽性的中率

HIV スクリーニング検査試薬の偽陽性率は検査法によって異なり、通常の PA 法や EIA 法では約 0.3%、迅速抗体検査試薬 (IC 法) では約 1.0% となっている<sup>8)</sup>。スクリーニング検査で陽性となった人の中の何 % が真の陽性者であったかを示す「陽性的中率」は、検査試薬の偽陽性率と検査集団の HIV 陽性率とが関係する。日本における検査機関・集団別の HIV 感染者の割合は、東京都の特別検査機関で約 1.0%、保健所の全国平均で約 0.3%、妊婦集団で約 0.01%、献血集団で約 0.002% である。例えば、各集団において 10,000 名のスクリーニング検査を偽陽性率 0.3% の検査試薬を用いて行った場合、HIV 感染者の割合が 1.0% の検査機関においては、真の陽性者は 100 名、スクリーニング検査の偽陽性者は 30 名、合わせて 130 名がスクリーニング検査陽性となり、その陽性的中率は 77% (100/130) となる (表)。同様に、HIV 感染者の割合が 0.3% の検査機関では、真の陽性者は 30 名、スクリーニング検査の偽陽性者は 30 名となり、合わせて 60 名がスクリーニング検査で陽性となり、陽性的中率は 50%

1) SHIMA-SANO Takako, KONDO Makiko, IMAI Mitsunobu 神奈川県衛生研究所微生物部

2) YAMADA Rika 石川県立中央病院いしかわ総合母子医療センター産婦人科

3) TANIGUCHI Haruki 三重県立総合医療センター産婦人科

4) TSUKAHARA Yuki 国立成育医療センター周産期治療部産科

表 検査集団別のスクリーニング検査の陽性的中率

| 偽陽性率 0.3% のスクリーニング検査試薬で 10,000 人を検査すると… |              |          |              |               |                 |
|---|--------------|----------|--------------|---------------|-----------------|
| HIV 感染率(検査集団)                           |              | HIV 感染者数 | スクリーニング 偽陽性者 | スクリーニング 陽性者合計 | 陽性的中率           |
| 1%                                      | (東京都特別 検査機関) | 100      | 30           | 130           | 77% (100/130)   |
| 0.3%                                    | (保健所全国 平均)   | 30       | 30           | 60            | 50% (30/60)     |
| 0.01%                                   | (妊婦健診)       | 1        | 30           | 31            | 3.2% (1/31)     |
| 0.002%                                  | (献血)         | 0.2      | 30           | 30.2          | 0.7% (0.2/30.2) |

(30/60)となる。妊婦集団で同様に検査を実施すると、真の陽性者は1名、スクリーニング検査の偽陽性者は30名となり、合わせて31名がスクリーニング検査で陽性となり、陽性的中率は3.2% (1/31)となる。このことから、感染率が低い集団ほど陽性的中率は低下することがわかるとともに、妊婦集団においてはスクリーニング検査で陽性となった者の約97%が確認検査で陰性という結果になりうる事が推測される。

## 2) 妊婦集団における HIV 検査結果の現状

全国のエイズ拠点病院 314 施設および年間分娩件数 1,000 件以上の一般産科施設 43 施設に対して、妊婦 HIV スクリーニング検査に関するアンケート調査を実施したところ、HIV 陽性率は拠点病院で 0.01%、一般病院で 0.003%、偽陽性率は拠点病院で 0.1%、一般病院で 0.08% であり、陽性的中率は拠点病院で 10.3%、一般病院で 3.8% と非常に低率であることがわかった<sup>9)</sup>。また、前方視的調査として、産婦人科病院 2 施設および民間検査センターとの共同研究により、妊婦健診時の HIV スクリーニング検査が陽性であった検体について確認検査を実施し、その検査結果から偽陽性率を調査した。HIV 検査数 4,424 件のうちスクリーニング検査陽性数は 13 件であり、これらの検体について確認検査を実施したところ、1 例が HIV 陽性、残りの 12 例が HIV 陰性であることが確認された。調査した妊婦集団での HIV 陽性率は 0.02%、スクリーニング検査の偽陽性率は 0.29%、陽性的中率は 7.7% となった<sup>10)</sup>。これらの調査において妊婦集団におけるスクリーニング検査の陽性的中率は極めて低いことが実証された。

## 3) 妊婦へのスクリーニング検査の施行、結果の伝え方について

妊婦は HIV の感染リスクは持つものの、日本ではまだ女性への感染の広がりが少ないため、妊婦へのスクリーニング検査の施行およびスクリーニング検査の結果の伝え方については十分な注意が必要である。日本では年間約 100 万件の妊婦 HIV スクリーニング検査が実施されており、前述の前方視的調査の数値を用いて推定すると、約 3,100 件のスクリーニング検査陽性例が発生していると思われる。これらの検体について確認検査を実施すると約 100 例は HIV 陽性で、約 3,000 例は偽陽性と判明することになるが、現状ではスクリーニング検査は確認検査よりも感度が高いことから、これらすべての例において確認検査として HIV-1、HIV-2 の WB 法と HIV-1 の NAT(核酸増幅検査)が必要となる。さらに厳密に言えば、これらの検査が陰性であっても HIV-2 の感染初期の可能性は否定できないため、さらに 1 か月後の再検査が必要となる。したがって、たまたまスクリーニング検査において偽陽性反応で陽性となった受検者は、最終的に陰性と判断されるのに 1 か月近くにわたり、2 度の確認検査を受けて、最終的に HIV 陰性と確認されることになる。スクリーニング検査で陽性という結果を妊婦に通知することは、確認検査の結果待ちの間、HIV に感染しているかもしれないという多大な不安を与えたとともに、パートナーへの不信感を募らせる者や中絶を考える者もあり、また、十分な説明なしに HIV 陽性であるかのように結果を妊婦に伝えることにより、確認検査で HIV 陰性と判明した

厚生労働省健康局  
疾病対策課長発出 通知文  
平成19年6月29日付

健康発第0629001号  
平成19年6月29日

各 { 都道府県  
政令市  
特別区 } 衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省健康局疾病対策課長 印



## 「妊婦に対するHIV検査について」

自治体  
医師会  
産婦人科学会  
産婦人科医会 宛に送付

- ◇HIV検査の適切な説明
- ◇妊婦HIV検査のスクリーニング検査  
陽性例に対するカウンセリングの  
充実

### 妊婦に対するHIV検査について(通知)

妊婦に対するHIV検査については、平成5年7月13日健医感発第78号厚生省保健医療局エイズ結核感染症課長通知「HIV検査の実施について(通知)」により指針をお願いしてきたところであるが、近時、HIV検査において妊婦に対するカウンセリングが十分に行われていないことが指摘されており、特にHIVスクリーニング検査における陽性症例に対し、確認検査の結果が出る以前に、適切な説明やカウンセリングを行わず陽性告知し、妊婦の健康等に支障を及ぼしている事例が報告されている。

ついでには妊娠にもかかわらず、費管下医療機関に対し、妊婦に対してHIV検査を実施する場合には、HIVスクリーニング検査では一定の割合で偽陽性が生じることがふまえ、確認検査の結果が出ていない段階での説明方法について、十分工夫するとともに、検査前および検査後のカウンセリングを十分に行うこととプライバシーの保護に十分配慮するよう周知徹底願いたい。

(参考)

平成18年度厚生労働科学研究調査によれば、HIVスクリーニング検査の結果陽性と判定された妊婦のうち、確認検査にて陰性と判定された偽陽性率が9割以上(陽性的中7.7%)であった。

図1 厚生労働省通知文「妊婦に対するHIV検査について(通知)」

後に医療への不信感を募らせ、トラブルとなることもある<sup>10)</sup>。

以上のことから、厚生労働省では2007年6月29日付の厚生労働省健康局疾病対策課長発出「妊婦に対するHIV検査について(通知)」において、『HIV検査において妊婦に対するカウンセリングが十分に行われていないことが指摘されており、特にHIVスクリーニング検査における偽陽性例に対し確認検査の結果が出る以前に、適切な説明やカウンセリングを行わず陽性告知し、妊婦の健康などに支障を及ぼしている事例が報告されている。(中略)妊婦に対してHIV検査を実施する場合は、HIVスクリーニング検査では一定の割合で偽陽性が生じうることをふまえ、確認検査の結果が出ていない段階での説明方法について、十分工夫するとともに、検査前および検査後のカウンセリングを十分に行うこととプライバシーの保護に十分配慮するよう周知徹底願いたい』(一部抜粋)との通達を行っている(図1)。したがって、妊婦へのHIV検査の施行に際しては、HIV検査実施前の説明の充実、スクリーニング検査が陽性であった場合には確認検査の必要性や偽陽性の可能性も含めた説明の実施、またスクリーニング検査に用いた血液検体で確認検査を行い、確認

検査判明後に結果を通知するなどの工夫が必要であると思われる。

なお、われわれはスクリーニング検査の偽陽性の問題を解決するために、二種類のスクリーニング検査試薬を組み合わせる検査を行う方法を検討している。この方法が使用可能となれば、スクリーニング検査の段階において偽陽性を除外することができるようになり、受検者にとっても医療従事者にとっても有益な方法となりうると考えている(図2)。

### 3. HIV感染妊婦と母子感染の現状

日本におけるHIV感染妊婦は1984年に初めて報告されて以来、毎年40例程度の報告がされており、2005年末では全468例が報告されている<sup>3)</sup>。うち日本国籍は179例、タイ国籍が143例であり、以前はタイ国籍の報告が多かったが、1999年以降、日本国籍がタイ国籍を上回っている。

HIV感染妊婦における分娩率は2006年において63%であり、うち分娩様式は約90%が選択的帝王切開であり、緊急帝王切開、経膈分娩は年に1,2例程度となっている。母子感染率は、選択的帝王切開では194例中1例(0.5%)、緊急帝王切開では17例中1例(5.9%)、経膈分娩では24例中

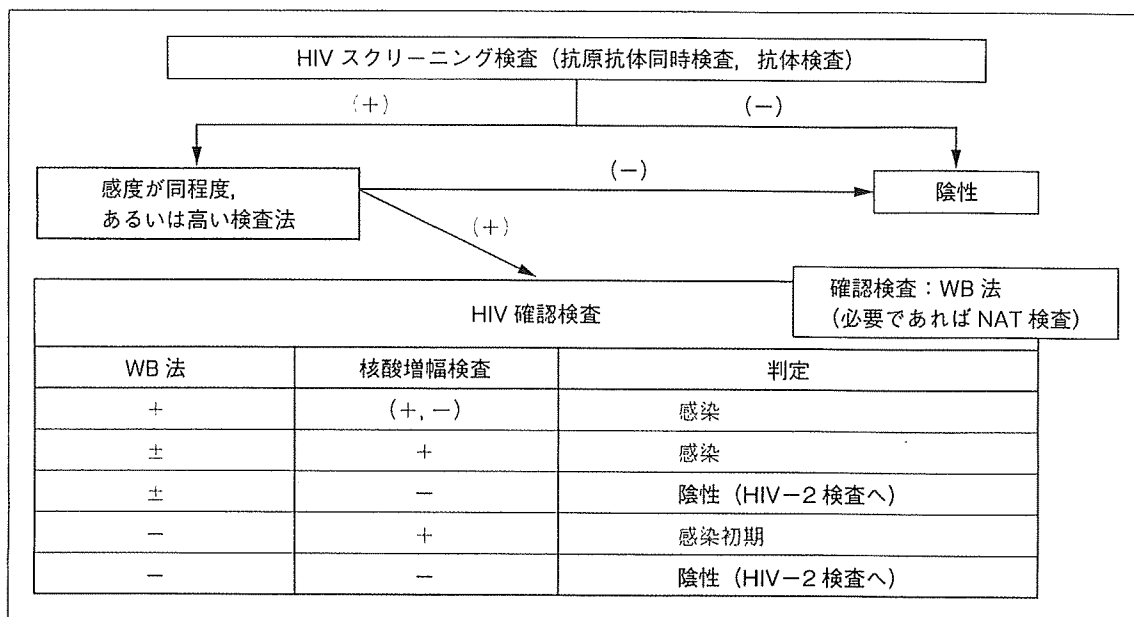


図2 HIV検査フローチャート(偽陽性の大部分を除外するための検査法)

5例(20.8%)となっており、①妊娠初期のHIV検査実施による感染診断、②妊娠中の抗HIV療法(HAART)、③陣痛発来前の選択的帝王切開術、④帝王切開時のAZT点滴投与、⑤出生児へのAZTシロップ予防投与、⑥出生児への人工乳哺育、などの適切な母子感染予防対策を実施することにより、母子感染率を0.5%未満にまで低下させることが可能となっている。

母子感染例はこれまでに42例が報告されており、近年では2005年に1例、2006年に1例報告されている。

#### 4. 出生児へのHIV検査

出生児へのHIV感染の有無を診断するためのHIV検査は、母子感染予防対策として生後6週まで抗HIV薬の投与を行うのと並行して、核酸増幅検査(HIV-1 RNA定量、HIV DNAの検出)およびHIV非感染を確定するための抗体検査を実施する<sup>12)</sup>。核酸増幅検査の実施時期としては、生後48時間以内、生後14日、生後1~2か月、生後3~6か月の計4回行う。2回の異なる時期の採血において核酸増幅検査が陽性となった場合(ただし臍帯血を除く、検査結果が陽性であった場合は、直ちに新たな検体で再検し結果を確定する)はHIV感染と診断する。生後48時間以内の検体での陽性は胎内感染を示唆する。生後1か月以降と生後4か月以降の2回以上のPCRが陰性

であればHIV感染はほぼ否定できる。抗体検査は母親からの移行抗体の存在のため、生後15~18か月までは診断に用いるのは難しいが、抗体価が低下する経過を観察できるとともに、生後18か月の時点においてHIV抗体が陰性であることを確認できれば、HIV感染を完全に否定することができる。

#### 5. おわりに

HIV感染妊娠はもはや外国籍女性に限らず、一般の日本人女性の問題となっており、妊婦におけるHIV検査は母子感染予防として非常に重要な検査となっている。しかし、妊婦へのHIV検査の普及につれ偽陽性の問題も表面化しており、特にスクリーニング検査で陽性となった場合にはその結果の取り扱いについて十分な配慮が必要である。さらに充実した妊婦へのHIV検査体制に向けて、その体制整備が急がれる。

#### 文献

- 1) 母子保健の主なる統計。母子保健事業団：pp 22-23, 2008
- 2) 和田裕一、林公一、吉野直人、他：妊婦HIV検査実施率の全国調査。平成18年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療におけるHIV感染対策に関する集学的研究」班 平成18年度研究報告書、6-25, 2007
- 3) 喜多恒和、井上孝美、岩田みさ子、他：HIV感染妊婦の実態調査とその解析およびHIV感染妊婦と

その出生児に関するデータベースの構築. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班 平成 18 年度研究報告書, 46-79, 2007

- 4) Grimes DA, Schulz KF: Uses and abuses of screening tests. *Lancet* 359: 881-884, 2002
- 5) Magee LA, Murphy KE, von Dadelszen P: False-positive results in antenatal HIV screening. *CMAJ* 160: 1285, 1999
- 6) Doran TI, Parra E: False-positive and indeterminate human immunodeficiency virus test results in pregnant women. *Arch Fam Med* 9: 924-929, 2000
- 7) Zacharias NM, Athanassaki ID, Sangi-Haghpeykar H, et. al: High false-positive rate of human immunodeficiency virus rapid serum screening in a predominantly hispanic prenatal population. *J Perinatol* 24: 743-747, 2004
- 8) 今井光信, 嶋貴子: HIV 感染の診断法. 治療 88: 2865-2870, 2006

- 9) 山田里佳, 嶋貴子, 塚原優己, 他: 妊婦 HIV スクリーニング検査の偽陽性に関する検討. 日性感染症会誌 19: 122-126, 2008
- 10) 塚原優己, 山田里佳, 嶋貴子, 他: 妊婦 HIV スクリーニング検査における偽陽性発生率の検討および陽性例への対応. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班 平成 18 年度研究報告書, 105-107, 2007
- 11) 和田裕一, 矢永由里子, 辻麻理子, 他: 妊婦スクリーニング検査の実施と課題. 平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班 平成 18 年度研究報告書, 27-45, 2007
- 12) HIV 母子感染予防対策マニュアル第 5 版. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「周産期・小児・生殖医療における HIV 感染対策に関する集学的研究」班 分担研究「わが国独自の HIV 母子感染予防対策マニュアルの作成・改訂に関わる研究」班編, 2008

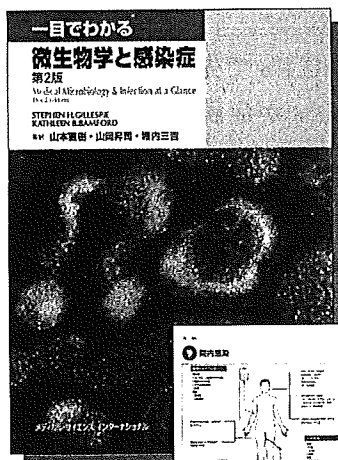
新刊

内容一新、さらに充実! しかも図解をフルカラーに!

# 一目でわかる 微生物学と感染症

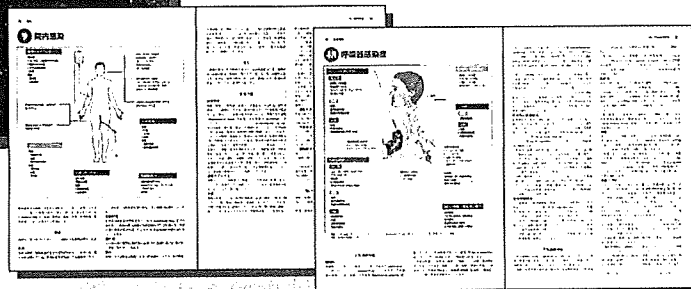
第2版

Medical Microbiology & Infection at a Glance, 3rd Edition



監訳: 山本直樹 国立感染症研究所エイズ研究センター長/東京医科歯科大学名誉教授・客員教授  
 山岡昇司 東京医科歯科大学大学院・医学部ウイルス制御学講座教授  
 堀内三吉 東京医科歯科大学大学院・医学部ウイルス制御学講座非常勤講師

環境・薬剤の変化や医学の進歩に伴い、急速な変貌を遂げている微生物学と感染症の必須知識を、全55章(教程)にまとめた入門テキスト。各章は、見開き2頁の中にフルカラーの図版と簡明な解説が配置され、容易に要点をつかむことができる。最初に基本的な概念、次に寄生体別に細菌、ウイルス、真菌、寄生虫による感染、最後に全身感染を取り上げ、巻末には症例検討を収載。医学生、研修医、看護師、コメディカルのはじめの1冊に最適。



定価3,990円  
 (本体3,800円+税5%)  
 ●A4変 ●頁144  
 ●図55 ●2009年  
 ●全55章(教程)  
 ●ISBN978-4-89592-580-8

MEDSI

メディカル・サイエンス・インターナショナル  
 113-0033 東京都文京区本郷 1-28-36 鳳明ビル

TEL 03-5804-6051 <http://www.medsico.jp>  
 FAX 03-5804-6055 E-mail [info@medsico.jp](mailto:info@medsico.jp)

## 第9回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

# 保健所等 HIV 検査機関における HIV 即日検査の試みとその効果の 検証およびホームページ「HIV 検査・相談マップ」による HIV 検査の最新情報の提供

## Evaluation of Rapid HIV Testing Services at Voluntary Counseling and Testing Sites, and Provision of the Latest HIV Testing Information through Internet Website

佐野(嶋) 貴子

Takako SHIMA-SANO

神奈川県衛生研究所微生物部

Division of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health

### はじめに

今回、ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞した研究内容は、(1) 保健所等 HIV 無料匿名検査機関(以下、保健所等検査機関と略)や民間クリニック等において HIV 即日検査(以下、即日検査と略)を試験的に実施し、受検者数の増加等の効果を検証したこと、(2) HIV 検査情報を提供するホームページ「HIV 検査・相談マップ」を作成し、HIV 検査の最新情報を紹介することを通じて HIV 検査数の増加等に寄与できたこと、の二つからなる。これらの成果は上記の二つの取り組みのどちらが欠けても得られなかったものであり、二つの取り組みの相乗効果により、近年の保健所等検査機関の受検者数と陽性判明者数の増加に寄与できたものと思われる。本稿では、これら研究の実施の経過を中心に報告する。

なお、本研究は厚生労働科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)「HIV 検査相談機会の拡大と質の充実に関する研究」班(以下、HIV 検査体制研究班と略)の研究事業の一環として実施したものである。

### 研究の背景

本研究を開始した 2000 年当時、HIV 感染は日本において年々確実にその広がりを拡大しつつある一方で、マスコミ等による報道機会の減少により、人々の「HIV/エイズ」

に対する関心が低くなり、自らのリスクや感染そのものに気付かない人の増加についても懸念されていた。実際に、厚生労働省エイズ発生動向調査での HIV/AIDS 報告数<sup>1)</sup>、献血および保健所等検査機関での HIV 陽性数はいずれも増加傾向を示し、保健所等検査機関で判明する陽性数の増加率も高くなっていたが、保健所等検査機関での HIV 検査数は 1992 年のピーク時の半数以下と低迷し、HIV 陽性者が多く判明する検査機関は、夜間や土日に検査を実施している利便性の高い検査機関に集中していた<sup>2,3)</sup>。全国の保健所において、HIV 検査は 1993 年より無料・匿名で実施されたが、多くの保健所は平日の昼間に検査を実施しており、検査希望者は検査と結果を聞くための二度の来所が必要で、平日に休みを取り難い人にとって大きな障壁となっている可能性が考えられた。また、夜間土日検査は、利便性は高いが、職員や場所の確保等が困難なため、限られた保健所や特設検査機関でしか実施されていないのが実情であった。

HIV 感染者の増加の一方で、保健所等検査機関の検査体制は検査希望者のニーズに十分応えられているとは言い難く、HIV 感染者の早期発見・早期治療、また、感染拡大の防止のためには、検査の受けやすい環境が必要であり、保健所での HIV 検査相談体制の見直しや民間クリニックでの検査希望者への HIV 検査の提供、また、HIV 検査情報の提供方法に関して新たな工夫が必要となっていた。そこで、新しい HIV 検査体制の一つとして、HIV 迅速抗体検査試薬を用いた即日検査の可能性およびそれらの HIV 検査機関を紹介するホームページ「HIV 検査・相談マップ」による検査情報の提供について検討を行った。

著者連絡先：〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋 1-3-1 神奈川県衛生研究所微生物部

Fax : 0467-83-4457

2009 年 7 月 30 日受付



## 即日検査の実施の試み

1999年に初めて日本で薬事承認された、15分でスクリーニング検査結果が判明する HIV 迅速抗体検査試薬を用いて、受検者に検査を受けた当日にスクリーニング検査結果を通知する「即日検査」の HIV 検査・相談の実施体制の整備を行った。最初に迅速検査キットの性能を検討し、十分な性能を有していることを確認した。次に、民間クリニックおよび保健所の HIV 検査に試験的に導入し、即日検査導入の効果や影響、その実施の際の問題点等を検討した。

### 1. HIV 迅速抗体検査試薬の性能検討

HIV 迅速抗体検査試薬は、「ダイナスクリン・HIV-1/2」(インバネス・メディカルジャパン社、以下ダイナスクリンと略)を使用した。この試薬の原理はイムノクロマト法(IC法)で、血清・血漿または全血を検体滴下部に50 $\mu$ l滴下(全血の場合はさらに展開液を一滴追加)後静置し、15分後に判定を行う。コントロールラインと判定ラインの2本の赤い線が観察された場合には陽性、コントロールライン1本のみが観察された場合には陰性と判定する。即日検査導入研究にあたり、HIV 検査を依頼された検体582件の血漿(HIV 確認検査法で陽性と判定された血漿100例、通常のHIV 検査法(PA法)で陰性と判定された血漿482例)について本試薬で測定を行い、感度・特異性の検討を行った。

検討の結果、HIV 陽性血漿100例はすべて陽性、HIV 陰性血漿482例では477例が陰性、5例が陽性を示した。この陽性5例について確認試験を実施したところ、すべて陰性となり、5例はダイナスクリンの偽陽性反応であることが判明した。この検討においては、ダイナスクリンの感度は100%(100/100)、特異性は99.0%(477/482)、偽陽性率は1.0%であることが分かった。なお、同キットの添付文書には、感度100%、特異性99.8%と記載されており、測定データは会社の検討データと比べて特異性が低いことが分かった。また、偽陽性率はPA法やELISA法等のスクリーニング検査試薬(偽陽性率:約0.3%<sup>4-6)</sup>)に比べ高かった。ダイナスクリンは目視判定キットであるため、検査者の判定による偽陽性率の差も出現すると考えられた。したがって、この試薬を用いて即日検査を実施する際には、検査希望者に即日検査の結果返却までの流れを説明するとともに、偽陽性が100人に1人の割合で出現するため、即日検査で陽性の場合には必ず確認検査が必要であることを十分に説明し、理解してもらうことが重要と考えた。また、スクリーニング検査結果が陽性であった受検者には、確認検査の結果が判明するまでの間の感染不安に対するサポート体制の整備等が必要と思われた。

### 2. 民間クリニックにおける即日検査導入の試みとその効果

上記の性能検討によって、迅速抗体検査試薬の特性や注意すべき点がみえてきたことから、その問題点をできるかぎり回避できる実施体制を確立するため、先ず民間クリニックへの即日検査の試験的導入を検討した。協力の得られた民間クリニック(STDクリニック、産婦人科等)において、迅速抗体検査試薬の使用法、特性、注意点、確認検査の必要性等の講習を医師およびスタッフに実施し、2001年5月からHIV 即日検査をスタートした。HIV 検査は有料(5,000円~10,000円)で実施し、検査希望者には、即日検査の流れや注意点(使用している迅速抗体検査試薬は偽陽性率が1%と高いこと、即日検査で判定保留となった場合には、確認検査結果を再度聞きにくる必要があること)等を記載した説明書を渡し、医師の説明の上で受検希望の確認を行った。即日検査の受検者にはHIV 検査に関する任意の自記式のアンケート調査を実施した。迅速抗体検査試薬で陽性となった場合には、研究班に確認検査を依頼してもらい、受検者には確認検査結果を約一週間後に通知した。また、即日検査の開始に合わせ、HIV 検査体制研究班で運営しているホームページ「HIV 検査・相談マップ」(<http://www.hivkensa.com>)に情報を掲載した。

2001年は全国3か所で開始し、検査数は759件、陽性数は4件であり、2002年は9か所に増設したことで、検査数は4,553件、陽性数は27件となった<sup>7)</sup>。陽性率は0.5-0.6%と保健所等無料検査の平均である0.3%よりも若干高く、偽陽性率は0.8-1.1%と、試薬の性能検討の結果と同様の傾向を示した。迅速抗体検査試薬の使用法や受検者へ結果を伝える際に問題やトラブル等は特に見られなかった。受検者に行ったアンケート調査では、「即日検査は結果がすぐに分かって良い」との回答は92%、反対に「即日検査を受けるのは不安」との回答は7%と、圧倒的に即日検査の有用性を支持していた。また、「保健所でも迅速検査を行ってほしい」との意見も57%で見られた。即日検査の実施を知った媒体は、ホームページ「HIV 検査・相談マップ」が77%を占めており、HIV 検査機関を紹介する継続的な情報提供媒体の必要性も示唆された。

これらの結果から、さらに協力研究クリニックを増設し、即日検査の有用性についての検討を継続することとなった。2008年末時点で、協力研究クリニックは全国25か所にまで拡大し(図1)、2008年の検査数は22,261件、確認検査数208例、陽性数は104件(陽性率0.5%) (図2)、2001年から2008年までの総検査数は89,518件、陽性数は402件(陽性率0.4%)となった。陽性率は即日検査を開始した2001年からほぼ同割合で推移しているが、クリニックの標榜科、利便性によっては3%の陽性率を示している機関もある。

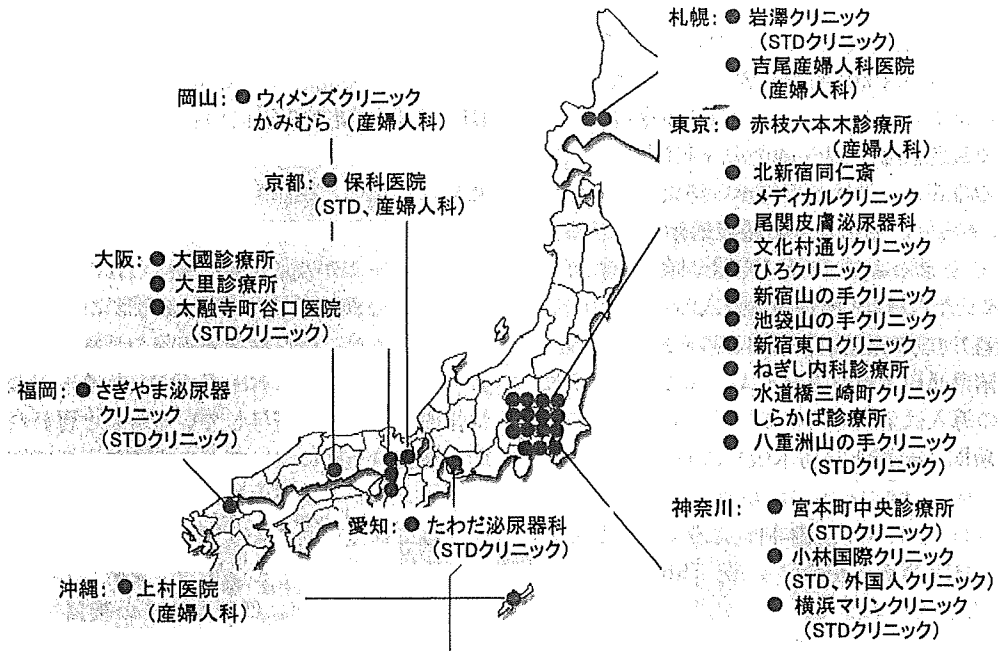


図 1 HIV 即日検査 研究協力民間クリニック (2008 年末現在)

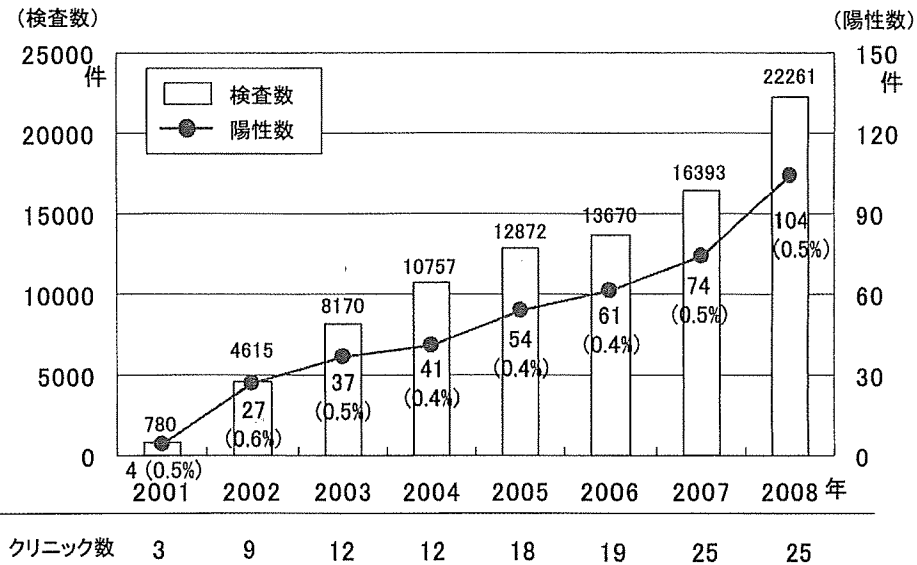


図 2 民間クリニックにおける HIV 即日検査実施数と確認検査陽性数の推移 (2001~2008 年)

民間クリニックは有料にも関わらず多くの受検者が即日検査を受けており、医療機関であることの安心感や場所・受付時間帯の利便性等から、検査希望者にとって検査を受けやすい機関の一つであると考えられる。また、他の性感染症に罹患している人や感染リスクが高い人も来院することから、民間クリニックでの即日検査の提供は非常に効果的であることが分かった。

### 3. 保健所における即日検査導入の試みとその効果

民間クリニックにおいて、即日検査の導入が受検者増に極めて効果的であることが分かったことから、保健所の HIV 検査についてもその可能性を検討することとなった。保健所での新規検査体制の実施にはかなりの困難が伴い、研究協力機関探しは難航したが、栃木県南健康福祉センターの元所長である潮見重毅先生のご協力により即日検査の試験的導入が可能となり、2003 年 1 月から実施された。

栃木県南健康福祉センターは栃木県南部に位置し、最寄りの小山駅から徒歩 25 分の場所にある。HIV 即日検査は、通常検査と並行して行い、受検者の希望により、通常検査か即日検査あるいはその両方を行った。HIV 検査日時は、通常検査と同様の毎週水曜日 13~14 時の 1 時間の受付で、即日検査に要する時間は、受検者受付から結果通知終了まで通常約 40 分であった。通常検査の結果通知および即日検査の確認検査結果通知は 10 日後（翌週金曜日）に行った。検査実施に要した人員は、即日検査導入前は問診 1 名、採血 1 名の計 2 名であったが、導入後は問診 2 名、採血 1 名、検査 1 名、結果通知 2 名の計 6 名であった。保健所における即日検査の導入は全国で初めての試みであるため、新聞各紙（下野新聞、読売新聞栃木版）において 2003 年 1 月に即日検査の導入に関する記事が報道された。また即日検査の開始に合わせ、HIV 検査体制研究班で運営しているホームページ「HIV 検査・相談マップ」（<http://www.hivkensa.com>）に情報を掲載した。

即日検査の導入効果としては、導入前（2002 年）は HIV 検査数が 130 件であったのに対し、即日検査導入後（2003 年）は 455 件と、導入前に比べ 3.5 倍増加した<sup>8)</sup>。また、即日検査受検者の 404 名中、5 名がスクリーニング検査陽性となり、1 名が HIV 陽性、4 名が偽陽性となった（偽陽性率 1%）。この 5 名は結果返却日に来所し、確実に確認検査結果を通知することができた。

HIV 検査受検者へのアンケート調査の結果では、受検した HIV 検査の種類とその理由については、95.4% が「即日検査」を受検したと答え、その理由としては、「できるだけ早く結果を知りたい」が 86.5% を占めた。また即日検査陽性時には確認検査が必要となることを知っているかを聞いたところ、「前から知っていた」が 44.4%、「今回の保健所の検査で知った」が 45.3% と、合わせて 89.7% の人が即日検査陽性時の確認検査の必要性を理解していた。この保健所

が HIV 即日検査を実施していることを知った手段に関しては、「ホームページ「HIV 検査・相談マップ」」が 61.7%、「メディア（新聞、テレビ等）」が 14.7% となった。今後の HIV 検査体制の希望については、「土曜・日曜検査」が 56.8%、「即日検査」、「夜間検査」がそれぞれ 45.7% となった。

以上の結果から、即日検査は HIV 検査希望者にとって非常にニーズが高く、保健所の HIV 検査をより受けやすくする上で即日検査の導入は非常に有効であることが分かった。また、即日検査導入後の受検者の増加には、新聞による報道とホームページ「HIV 検査・相談マップ」への情報掲載が大きく寄与しているものと思われた。実際に、即日検査の実施についてどのような方法で知ったかについてのアンケート調査の結果からは、新聞報道のあった 1 月と 2 月には受検者のおよそ 40% が新聞報道により即日検査を実施していることを知って受検していたが、3 月以降はその割合は急速に低下し、その後は「HIV 検査・相談マップ」を見て受検している受検者の割合が 60%~80% とそのかなりの部分を占めていた（図 3）。これらの結果から、新聞報道の影響は大きい、その持続期間は 1~2 ヶ月程度であり、「HIV 検査・相談マップ」による情報提供は持続的効果があることが分かった。ニーズの高い検査を提供したとしてもその対象にその情報を伝えることが出来なければその効果は限定的となる。今回の結果から、HIV 即日検査の情報提供手段として、新聞等のマスコミによる広報は短期間で一時的に多くの人々に情報を提供する手段として有効であること、また「HIV 検査・相談マップ」による広報は継続的情報提供手段として有効であることが確認された。

栃木県南健康福祉センターの受検者数は、導入後 2 年目（2004 年）には 814 件と 6.3 倍にまで増加し、周辺地域に即日検査導入機関が増加しても検査数はほとんど減少す

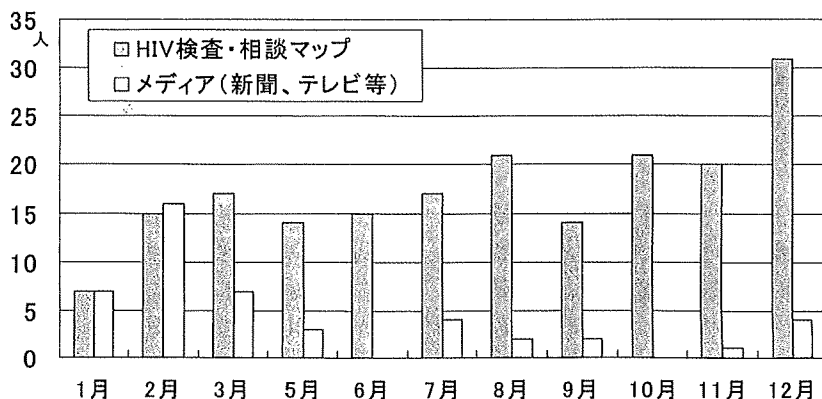


図 3 栃木県南健康福祉センターでの HIV 受検者へのアンケート調査結果  
「この保健所が HIV 即日検査を実施していることをどこで知りましたか？」

ることなく維持している(図4)。即日検査機関が増えることは、検査希望者の受け皿が大きくなることであり、新たな受検者の増加につながる事が分かった。

4. 即日検査導入のその後の展開と効果

即日検査の民間クリニックおよび保健所への試験的導入の成果に基づき、2004年3月には「保健所等におけるHIV即日検査のガイドライン」<sup>9)</sup>が研究班によって作成され、自治体、保健所等の1,155機関に配布された。保健所等検査機関での即日検査の導入は、2003年は試験的実施の1保健所であったのが、2004年は15自治体51保健所等検査機

関、2005年では44自治体144保健所等検査機関(2005年度全国保健所549か所)にまで増加し、2008年にはHIV検査を実施している59%の保健所で即日検査が実施されるようになった。

また、保健所等無料検査機関では即日検査の導入に伴い受検者数が急激に増加しており、エイズ動向委員会の調査では、2008年の保健所等無料検査機関での検査数は17.7万件、陽性数は501件と、即日検査導入前の2002年と比べて、検査数は2.9倍、陽性数は2.2倍の増加となっている(図5)。即日検査を含めた保健所等無料検査機関のHIV検査体制の強化が、HIV検査希望者の受検機会を増やし、結

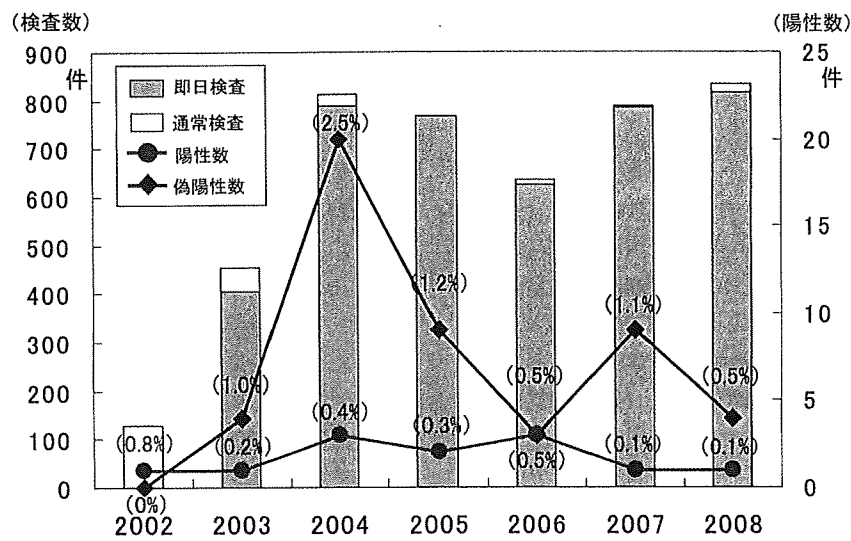


図4 栃木県南健康福祉センターでのHIV検査実施件数の年次推移

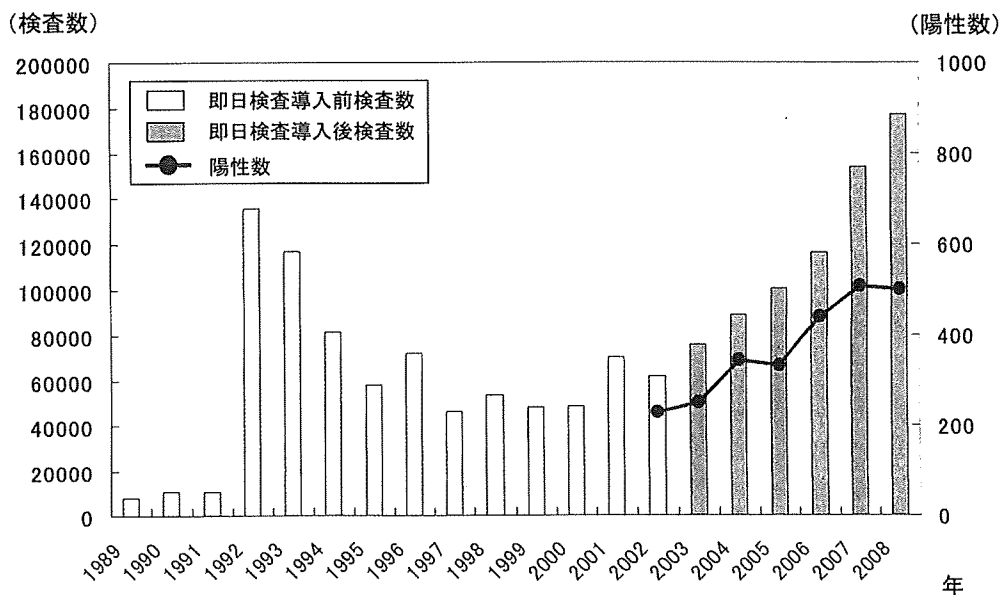


図5 保健所等無料HIV検査機関におけるHIV検査数および陽性数

果として自発検査での HIV 陽性判明数の増加にも結びついたと考える。

### ホームページ「HIV 検査・相談マップ」の作成

ホームページ「HIV 検査・相談マップ」(http://www.hivkensa.com)は、HIV 検査機関の情報や HIV 検査に関する知識の普及および即日検査の試験の実施機関を紹介することを目的に、HIV 検査体制研究班において PC 版サイトおよび携帯電話版サイトを開設した。PC 版サイトは 2001 年 9 月から、携帯電話版サイトは 2003 年 4 月から i-mode 版、2004 年 3 月からはすべての携帯電話からアクセスを可能とした。サイトの閲覧アクセス数や掲載している検査機関別のアクセス数をモニタリングすることにより、メディア等による HIV/エイズ報道の HIV 検査への影響等や HIV 検査の地域特性についても解析をおこなった。

その結果、サイトの閲覧アクセス数は、PC 版サイトでは、2008 年は 87 万件、1 日平均アクセス数は約 2,400 件であり、2009 年 3 月末における総アクセス数は 500 万件に達した(図 6 (a))<sup>10)</sup>。携帯電話版サイトでは、2008 年は 56 万件、1 日平均アクセス数は約 1,540 件、2009 年 3 月末までの総アクセス数は 170 万件に達した(図 6 (b))。

PC 版トップページにある 5 つの検索カテゴリー(保健所無料検査、夜間・土日検査、即日検査、NAT 検査、性感染症検査)の検索アクセス数では、検査種別では「即日検査」、「夜間・土日検査」および「NAT 検査」へのアクセス数が多く、検査機関の個別ページでは、「即日検査」、「夜間・土日検査」、「東京」、「大阪」のいずれかの条件に当てはまっている機関にアクセス数が多かった。これらのこと

から、即日検査等の受検者にとって利便性の高い検査機関に関心の高いことが分かり、検査の提供側はさらに検査希望者が受検しやすい検査体制を設定していく必要があると思われた。

PC 版サイトの 2008 年の日別アクセス数解析では、1 月の血液事業部会の報道で 20,249 件、8 月のエイズ動向委員会の報道で 21,927 件と、アクセス数が 20,000 件を超えた日が 2 日あった(図 7)。特に、Yahoo! ニュースにリンクされることでアクセス数が急激に増加することが分かった。また、一日平均アクセス数の 2 倍(約 4,800 件)を超えた日が 8 日あり、エイズ動向委員会での発表や 6 月の検査普及週間、12 月の世界エイズデーの関連報道等で件数が増加していた。当サイトは HIV/エイズに関する報道の反響をモニタリングする方法の一つとしても有効であることが分かった。

地域ごとのアクセス数解析では、2008 年では、東京が 532,003 件(保健所 339,488 件、他無料検査 48,258 件、有料 144,257 件)、大阪が 218,174 件(保健所 94,297 件、他無料検査 72,120 件、有料 51,757 件)、神奈川が 192,532 件(保健所 121,299 件、他無料検査 50,663 件、有料 20,570 件)、愛知が 93,158 件(保健所 76,283 件、他無料検査 10,591 件、有料 6,284 件)であった(図 8)。東京のアクセス数は大阪と比べ 2 倍以上の差があり、また、大阪の検査機関全体のアクセス数は東京に次いで多かったが、保健所検査へのアクセス数は神奈川よりも少なかった。その理由として、大阪の保健所では即日検査を実施している機関が一か所も無いことが影響していると思われた。愛知県では他の無料検査施設へのアクセス数が少なく、理由として検査施設が日

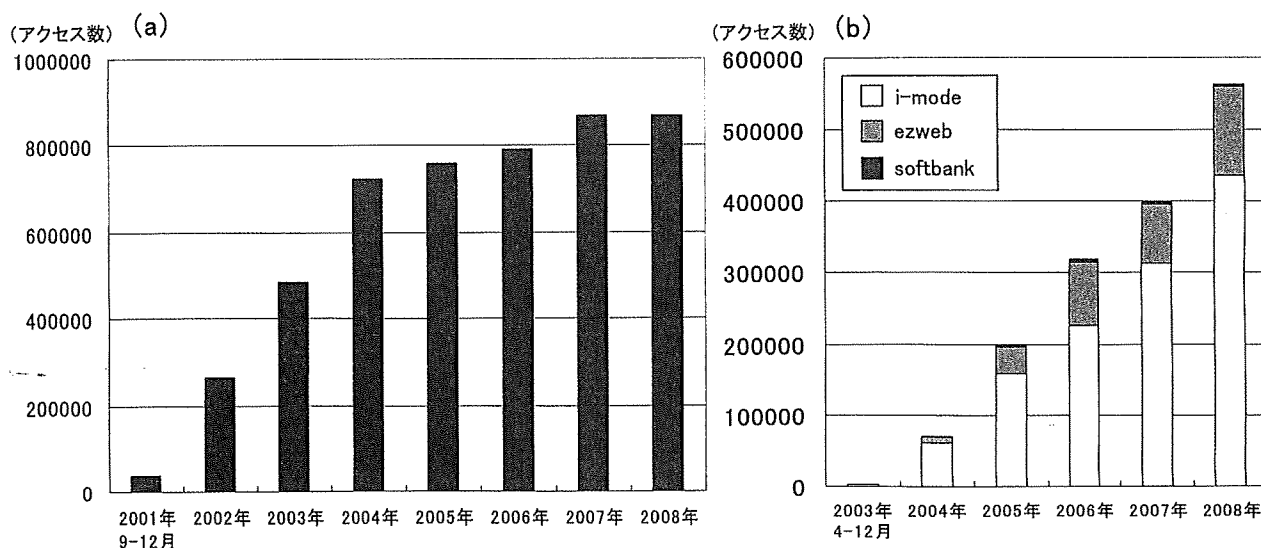


図 6 「HIV 検査・相談マップ」アクセス数年次推移  
(a) PC 版サイト (b) 携帯電話版サイト

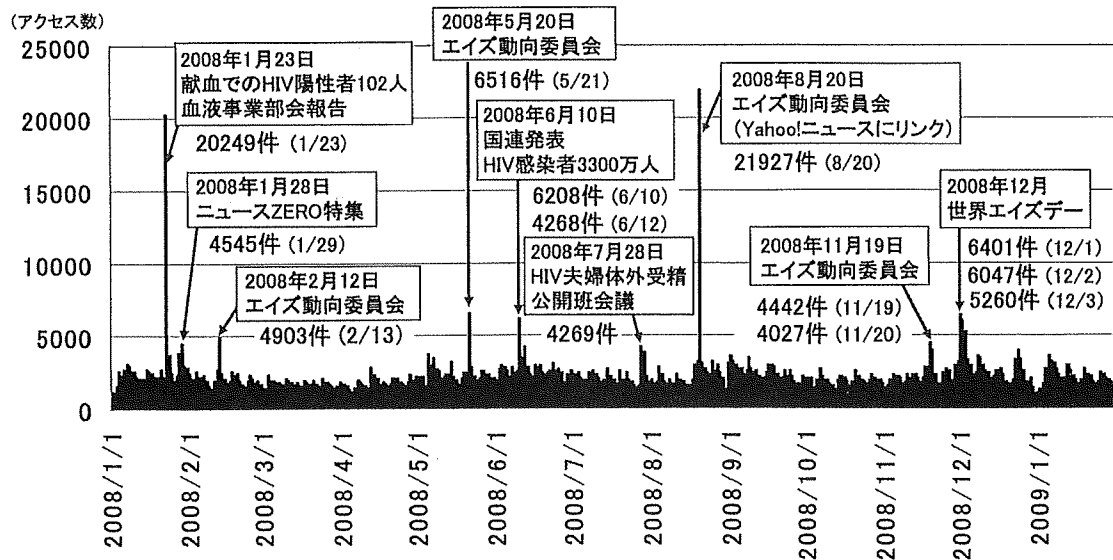
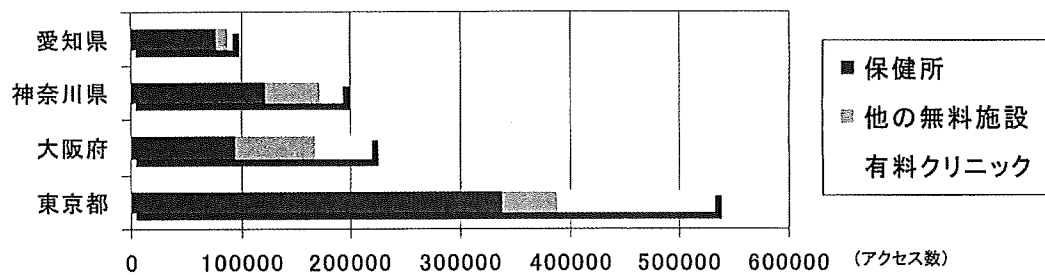


図 7 「HIV 検査・相談マップ」アクセス数日別推移 (2008年1月1日～2009年1月31日)



| 即日検査実施機関数/全機関数 | 東京    | 大阪   | 神奈川  | 愛知   |
|----------------|-------|------|------|------|
| ■ 保健所          | 10/32 | 0/30 | 8/37 | 7/31 |
| ■ 他の無料施設       | 0/1   | 1/5  | 3/6  | 1/1  |
| ■ 有料クリニック      | 10/10 | 3/3  | 3/3  | 1/1  |

図 8 「HIV 検査・相談マップ」地域別アクセス数および検査機関数 (2008年:東京,大阪,神奈川,愛知)

曜即日検査のみであることが影響していると思われる。2008年のHIV感染者/AIDS患者報告数は、東京541件、大阪232件、神奈川80件、愛知109件であり、それに対し、大阪および愛知のアクセス数は少ないように思われる。アクセス数は利便性の高い保健所等検査機関数に反映されており、また、大阪、愛知はそれぞれ西日本地区、中部地区の中心的都市であることから、両都市の保健所等検査機関の検査体制のさらなる整備が必要と思われた。

ホームページは継続して、より多くの人に情報を提供する手段として非常に有効である。HIV相談検査事業の情報提供、HIV検査に関する知識の普及のために、「HIV検査・

相談マップ」はHIV検査について網羅した、より実用性の高いホームページとなるよう、今後も情報提供を継続していきたい。

おわりに

近年、HIV感染者報告数において、保健所等検査機関での判明割合は5割を占めるまでになった。しかし、これまで保健所等検査機関での検査数は右肩上がりの増加してきたが、現在、即日検査や夜間土日検査等の検査機関は受け入れ数の飽和状態にあり、さらなる体制整備が進まなければ、今後は頭打ちの状態となることが予測される。HIV感

染拡大が懸念されている日本において、HIV/性感染症の感染リスクを持つ人が受検しやすい検査機関の整備・充実が緊急の課題であると考えられる。特に、感染者が多い都市部においては、保健所等検査機関の検査日の増加や即日検査、土日検査、夜間検査機関等の増設が必要である。また、HIV検査機関としての民間クリニックの活用、性感染症やHIV感染が疑われる症状の有症者に対しての医療者側からの積極的なHIV検査の提供も必要と思われる。日本におけるHIV検査体制がさらに充実したものとなることでHIV感染者の早期発見・早期ケアと感染拡大の防止につながる事が期待される。

謝辞：この度は第9回ECC山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞させていただき本当にありがとうございました。本賞の選考にあられました選考委員会の先生方、並びにご指導下さいました神奈川県衛生研究所の今井光信先生、民間クリニックにおいていち早く即日検査を実施し、研究に協力して下さいました、北新宿同仁斎メディカルクリニック元院長の西大條文一先生、他24か所の民間クリニックの先生方、保健所における即日検査の実施の可能性を開いて下さいました、栃木県南健康福祉センター元所長の潮見重毅先生、栃木県南健康福祉センターの塚田三夫先生、栃木県東健康福祉センターの一色ミユキ先生、ホームページ「HIV検査・相談マップ」の立ち上げおよび発展に大きなお力添えを頂きましたライフ・エイズ・プロジェクトの清水茂徳先生、その他本研究にご協力いただきました多くの先生方に心より御礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) 厚生労働省エイズ動向委員会：2003（平成15）年エイズ発生動向年報。2004年4月。
- 2) 国立感染症研究所，厚生労働省健康局結核感染症課：特集HIV/AIDS。病原微生物検出情報25（7）：1-12，2004。
- 3) 今井光信：HIV検査体制の構築に関する研究，総括研究報告。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV検査体制の構築に関する研究」平成15年度研究報告書：1-33，2004。
- 4) 嶋貴子，近藤真規子，今井光信：マイクロプレート法によるHIV-1抗体，HIV-2抗体およびHIVp24抗原検出用キット（HIV抗原抗体同時検出キット）の検討。感染症学雑誌75（12）：1014-1024，2001。
- 5) 今井光信，嶋貴子，須藤弘二，近藤真規子：HIV感染症に対する迅速診断法の進歩と課題。臨床とウイルス33（3）：131-136，2005。
- 6) 嶋貴子，須藤弘二，近藤真規子，倉井華子，相楽裕子，今井光信：蛍光酵素免疫測定法による新しいHIV抗原抗体同時検査試薬（第4世代）の検討。感染症学雑誌81（5）：562-572，2007。
- 7) 嶋貴子：HIV即日検査の導入等の効果と今後の課題。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIVの検査法と検査体制を確立するための研究」平成14年度研究報告書：66-105，2003。
- 8) 嶋貴子，一色ミユキ，近藤真規子，塚田三夫，潮見重毅，今井光信：保健所におけるHIV即日検査導入の試みとその効果。日本公衆衛生雑誌53（3）：167-177，2006。
- 9) HIV検査体制の構築に関する研究班：保健所等におけるHIV即日検査のガイドライン。2004年3月。
- 10) 佐野（嶋）貴子：ホームページ「HIV検査・相談マップ」を用いたHIV検査相談機関の情報提供とメディア等の広報効果のモニタリング。厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIV検査相談機会の拡大と質的充実に関する研究」平成20年度研究報告書：45-50，2009。

# Molecular Characterization of Rotaviruses, Noroviruses, Sapovirus, and Adenoviruses in Patients With Acute Gastroenteritis in Thailand

Leera Kittigul,<sup>1\*</sup> Kannika Pombubpa,<sup>1</sup> Yuthana Taweekate,<sup>1</sup> Thanapat Yeepho,<sup>2</sup> Pattara Khamrin,<sup>3</sup> and Hiroshi Ushijima<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Public Health, Department of Microbiology, Mahidol University, Bangkok, Thailand

<sup>2</sup>Medical Pathology Department, Lopburi Hospital, Lopburi Province, Thailand

<sup>3</sup>Aino Health Science Center, Aino University, Tokyo, Japan

Outbreaks of viral gastroenteritis occur worldwide including Thailand. Unfortunately, there is limited information since etiologic agents have not been identified in several outbreaks of non-bacterial gastroenteritis. The genotype of enteric viruses causing acute gastroenteritis in Thailand was determined using reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction and DNA sequencing. From January 2006 to February 2007, stool samples were collected from patients with acute gastroenteritis of all age groups attending a hospital in Thailand, and patients with non-bacterial acute gastroenteritis (262 patients) were tested for enteric viruses. The overall positive detection rate of enteric viruses was 14.9%; group A rotaviruses (6.1%), noroviruses (6.5%): GI (0.8%) and GII (5.7%), adenoviruses (1.5%), and sapoviruses (0.8%) were found. Group B and C rotaviruses, and astroviruses were not detected in the enrolled patients. Viral acute gastroenteritis occurred in children less than 15 years of age (25.2%, 33/131) with higher frequency than in adults (4.6%, 6/131), *P*-value <0.001. Rotavirus G1 was the most predominant genotype, followed by G3, and G9. Among noroviruses, GI-2 was identified; whereas, GII was predominant with a high frequency of GII-4 observed, followed by GII-16, GII-2, GII-3, and GII-12. Sapovirus GII-3 and human adenoviruses were identified. This study suggests that enteric viruses play an essential role in patients with acute gastroenteritis attending hospital and mainly in children who have a higher prevalence of group A rotaviruses and noroviruses. The genetic analyses provide molecular epidemiological data for viruses important to public health. *J. Med. Virol.* 81: 345–353, 2009. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** rotaviruses; noroviruses; sapoviruses; adenoviruses; acute gastroenteritis; Thailand

## INTRODUCTION

Acute gastroenteritis or acute diarrhea is one of the most significant diseases causing morbidity and mortality worldwide [Clark and McKendrick, 2004]. In Thailand, acute diarrhea is the primary cause of morbidity among diseases documented in the annual report of epidemiological surveillance [<http://epid.moph.go.th>]. Based on routine bacterial cultures of stool samples, only a few patients have been identified in the past with an underlying viral cause. However, a large proportion of patients with gastroenteritis were not identified with enteric viruses because virus identification has not been undertaken routinely in the country. Using improved molecular techniques, the etiologic role of viruses causing acute gastroenteritis has been established in various outbreaks [Koopmans, 2005; Siebenga et al., 2007; Svraka et al., 2007] and in studies on hospitalized children [Chen et al., 2007; Fabiana et al., 2007]. Enteric viruses that have been reported as a cause of nonbacterial acute gastroenteritis include group A rotaviruses, noroviruses, sapoviruses, astroviruses and enteric adenoviruses.

Rotaviruses (RVs) are members of the Reoviridae family, which consists of seven groups (A through G). Group A rotavirus causes acute diarrhea and is most commonly found among infants and young children [Glass et al., 2006]. Group B and C rotaviruses, however, infect children to a lesser extent [Phan et al., 2004; Barman et al., 2006]. RV is a nonenveloped virus containing 11 segments of double-stranded RNA [Estes

Grant sponsor: Thai Government through Mahidol University, fiscal year 2006–2007; Grant sponsor: Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Japan (Core University System Exchange Program).

\*Correspondence to: Leera Kittigul, Faculty of Public Health, Department of Microbiology, Mahidol University, 420/1 Rajvithi Road, Bangkok 10400, Thailand. E-mail: phlkt@mahidol.ac.th

Accepted 22 September 2008

DOI 10.1002/jmv.21380

Published online in Wiley InterScience  
(www.interscience.wiley.com)



and Kapikian, 2007]. There are 19G genotypes and 27P genotypes in RVs recovered from humans and animals [Matthijnssens et al., 2008]. The most prevalent human RVs are G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], and G9P[8] [Santos and Hoshino, 2005]. Noroviruses (NoVs), which belong to the genus *Norovirus* in the family *Caliciviridae*, are the most common viral cause of acute gastroenteritis in all ages but are known to have more severity in young children and the elderly [Estes et al., 2006]. NoVs are nonenveloped, positive-sense, single-stranded RNA viruses and are classified into five distinct genogroups. Human NoV strains have been found in genogroups I (GI), II (GII), and IV (GIV) and are subdivided further into at least 8 genotypes for GI, and 19 genotypes for GII [Zheng et al., 2006]. Sapoviruses (SaVs) are members in the genus *Sapovirus* within the same *Caliciviridae* family as NoVs. Among those admitted to hospital, acute diarrhea caused by SaVs is more widespread in infants and young children. SaVs have a lower detection rate than NoVs [Hansman et al., 2004b; Khamrin et al., 2007a]. Human astroviruses (AsVs) belong to the *Astroviridae* family. The virion is nonenveloped and contains a positive single-stranded RNA genome [Mendez and Arias, 2007]. Besides rotaviruses and caliciviruses, AsVs are one of the major causes of acute gastroenteritis within young children and the elderly [Guix et al., 2005]. Human adenoviruses (AdVs) are only one DNA virus among other enteric RNA viruses and members of the family *Adenoviridae*, which consists of six subgenera (A through F). AdVs subgenus F are divided into two serotypes (AdV40 and AdV41) both of which are associated with diarrhea in children [Fabiana et al., 2007].

Rotaviruses and noroviruses are important enteric viruses in Thailand because they are often causes of acute gastroenteritis in infants and children admitted to hospital. In two studies, RVs were reported to be associated with approximately 37–43% of children with acute gastroenteritis admitted to hospital [Jiraphongsa et al., 2005; Khamrin et al., 2007c]. In other studies, NoVs were detected in hospitalized infants and children at a rate of 8.6–14.1% [Guntapong et al., 2004; Hansman et al., 2004b; Khamrin et al., 2007a]. Nevertheless, genetic analysis of the enteric viruses causing acute gastroenteritis has not been studied extensively. This particular study was carried out to determine the presence of gastroenteritis viruses in patients of all age groups attending hospital with acute gastroenteritis. The study used reverse transcription-multiplex polymerase chain reaction (RT-multiplex PCR) for screening and DNA sequencing for confirmation. Molecular characterization of the enteric viruses found in the stool samples of patients with acute gastroenteritis is included.

## MATERIALS AND METHODS

### Stool Samples

A total of 273 stool samples were collected from patients attending Lopburi Hospital, Lopburi Province,

Thailand, and who had a clinical diagnosis of acute gastroenteritis or acute diarrhea. The study period was from January 2006 to February 2007, a 14-month period. The patients enrolled in this study had watery diarrhea for less than 7 days and one or more of the following symptoms; nausea, vomiting, abdominal cramps, headache, muscle pain and/or fever ( $\geq 38.0^\circ\text{C}$ ). Written informed consent was obtained from each patient or, if the patient was a child, their parent. The study was conducted with the approval of the Ethical Committee for Human Rights Related to Human Experimentation, Mahidol University, and of Lopburi Hospital. Stool samples were tested routinely for pathogenic bacteria, that is, *Salmonella*, *Shigella*, and *Vibrio* species. All stool samples were diluted in a ratio of 1:3 in 0.05 M phosphate-buffered saline, at pH 7.2. The suspensions were centrifuged at 500g for 15 min and the supernatant was stored at  $-70^\circ\text{C}$ . Samples were sent to the laboratory and diluted 1:10 prior to RNA extraction.

### RNA Extraction and Reverse Transcription-Multiplex Polymerase Chain Reaction (RT-Multiplex PCR)

Viral RNA was extracted from 140  $\mu\text{l}$  of diluted supernatant (1:10) using a QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Screening for the presence of RV groups A, B, and C, NoV GI and GII, SaV, AsV, and AdV in the stool specimens was conducted using RT-multiplex PCR. Two sets of primers were used: set A, including the primers for the detection of RV groups A, B, C, and AdV; and set B, primers for the detection of NoV GI, GII, SaV, and AsV. The RT-multiplex PCR was performed according to the methods described previously by Yan et al. [2003, 2004].

Briefly, complementary DNA (cDNA) was prepared by adding 5  $\mu\text{l}$  of RNA to 5  $\mu\text{l}$  of random hexamers (50 ng/ $\mu\text{l}$ ), 10 mM dNTP mix and DEPC-treated water (Invitrogen, Carlsbad, CA) and this was followed by incubation at  $65^\circ\text{C}$  for 5 min. The mixture was put on ice for 5 min. RT mixture (10  $\mu\text{l}$ ) containing 1 $\times$  RT buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM of each dNTP, 0.1 M DTT, Rnase OUT<sup>TM</sup> (40 Units/ $\mu\text{l}$ ), and Superscript<sup>TM</sup> III RT (200 Units/ $\mu\text{l}$ ), was then added to the sample. RT was carried out at  $25^\circ\text{C}$  for 10 min, which was followed by  $50^\circ\text{C}$  for 50 min. The reaction was terminated by incubation at  $85^\circ\text{C}$  for 5 min, and then chilling the mixture on ice. cDNA was centrifuged briefly, 1  $\mu\text{l}$  of RNaseH was added and the resultant mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min.

In the multiplex PCR assay, 5  $\mu\text{l}$  of cDNA was added to 20  $\mu\text{l}$  of PCR mixture containing 1 $\times$  *Taq* DNA polymerase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 200  $\mu\text{M}$  dNTP, and 33  $\mu\text{M}$  each of specific primers, 5 U/ $\mu\text{l}$  of *Taq* DNA polymerase, and nuclease free water. Two specific primer sets were added in separate tubes. Set A contained Beg 9, VP7-1' [group A RV]; ADG9-1F, ADG9-1R [group B RV]; G8NS1, G8NS2 [group C RV];

and Ad1, Ad2 [AdV]. While set B contained G1-SKF, G1-SKR [NoV GI]; COG2F, G2-SKR [NoV GII]; SLV 5317, SLV 5749 [SaV]; and PreCAP1, 82b [human AsV]. PCR was performed at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min, 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 3 min.

Monoplex PCR was also carried out for confirmation of virus-positive stool samples detected by RT-multiplex PCR using the procedure for RT-multiplex PCR but with only one pair of primers specific to each virus.

PCR products were electrophoresed in a 1.5% agarose gel, followed by staining with ethidium bromide (0.5 µg/ml) for 30 min, then visualized under ultraviolet light of a transilluminator. The results were recorded by photography. Specific DNA bands that corresponded to the product size for enteric viruses included group A RV (395 bp), group B RV (814 bp), group C RV (351 bp), AdV (462 bp), NoV GI (330 bp), NoV GII (387 bp), SaV (434 bp), and AsV (719 bp).

#### DNA Sequencing and Phylogenetic Analysis

DNA products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) and sequenced at the Bioservice Unit of the National Science and Technology Development Agency, Bangkok. The nucleotide sequences were compared with those of RV, NoV, SaV, and AdV strains deposited in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank database using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program [Altschul et al., 1990]. Phylogenetic relationships of RV, NoV, and SaV were examined by aligning sequences with the ClustalX program. A phylogenetic tree was constructed according to the neighbor-joining method using MEGA version 3.1 [Kumar et al., 2004].

#### Nucleotide Sequence Accession Numbers

The nucleotide sequences of the study strains have been deposited at GenBank (accession nos., EU603407-

EU603420 for RVs, EU603421 for NoV GI, EU603422-EU603436 for NoVs GII, EU603437 for SaV, and EU603438-EU603441 for AdVs).

## RESULTS

### Characteristics of Patients

From January 2006 to February 2007, a total of 273 patients with acute gastroenteritis or acute diarrhea were enrolled in this study. One hundred and ninety eight (72.5%) and 75 (27.5%) cases attended the Inpatient Department and Outpatient Department in Lopburi Hospital, respectively. The ratio of patients attending the Inpatient Department to Outpatient Department was 2.6:1. The ratio of males to females was 1.1:1. The median age was 12.5 years old (range 2 months–86 years old).

### Virological Testing

In this study, enteropathogenic bacteria were identified in 11 patients and the samples from these patients were therefore excluded from the analysis. Among the 262 patients with nonbacterial acute gastroenteritis, 39 (14.9%) cases of enteric viruses were detected by RT-multiplex PCR and confirmed by RT-monoplex PCR. These enteric viruses included group A RVs (6.1%), NoVs (6.5%); GI (0.8%) and GII (5.7%), SaVs (0.8%) and AdVs (1.5%), as shown in Table I. After DNA amplification and gel electrophoresis with ethidium bromide staining, positive DNA bands were shown at 395 bp for group A RV, 330 bp for NoV GI, 387 bp for NoV GII, 434 bp for SaV, and 462 bp for AdV (Fig. 1). Group B RV, group C RV and AsV were not detected. The ratio of patients with viral gastroenteritis attending the Inpatient Department to Outpatient Department was 12:1. The patients with acute gastroenteritis in the age group 0–4 years had the highest frequency of viral infection. The median ages of patients infected with RVs and NoVs GII were 18 months (range 2 months–48 years) and 22 months (range 4 months–59 years), respectively.

TABLE I. Enteric Viruses in Patients With Acute Gastroenteritis Detected Using RT-Multiplex PCR

|                   | Nonbacterial gastroenteritis no. | Viral infection (%) <sup>a</sup> | Rotavirus (%) | Norovirus  |           | Sapovirus (%) | Adenovirus (%) |
|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------|------------|-----------|---------------|----------------|
|                   |                                  |                                  |               | GI (%)     | GII (%)   |               |                |
| Patients          | 262                              | 39 (14.9)                        | 16 (6.1)      | 2 (0.8)    | 15 (5.7)  | 2 (0.8)       | 4 (1.5)        |
| Age group (years) |                                  |                                  |               |            |           |               |                |
| 0–4               | 106                              | 30 (28.3)                        | 12 (11.3)     | 1 (0.9)    | 12 (11.3) | 1 (0.9)       | 4 (3.8)        |
| 5–9               | 16                               | 3 (18.8)                         | 2 (12.5)      | —          | —         | 1 (6.3)       | —              |
| 10–14             | 9                                | —                                | —             | —          | —         | —             | —              |
| 15–30             | 10                               | —                                | —             | —          | —         | —             | —              |
| >30               | 121                              | 6 (5.0)                          | 2 (1.7)       | 1 (0.8)    | 3 (2.5)   | —             | —              |
| Male:female       | 1.1:1                            | 1.3:1                            | 3:1           | All female | 0.7:1     | All male      | 1:1            |
| Days after onset  |                                  |                                  |               |            |           |               |                |
| 1–3               | 206                              | 21 (10.2)                        | 5 (2.4)       | 1 (0.5)    | 10 (4.8)  | 2 (1.0)       | 3 (1.5)        |
| 4–6               | 51                               | 16 (31.4)                        | 9 (17.6)      | 1 (2.0)    | 5 (9.8)   | —             | 1 (2.0)        |
| 7–9               | 4                                | 2 (50)                           | 2 (50)        | —          | —         | —             | —              |
| >9                | 1                                | —                                | —             | —          | —         | —             | —              |

<sup>a</sup>Percentage of virus-infected patients in all nonbacterial gastroenteritis patients in each row.

Infections with NoVs GI were found in one child aged 4 years and one adult aged 47 years. SaV infections occurred in children at the age of 6 and 8; whereas, all patients with AdV infections were less than 5 years old. Analysis by the Chi-square test was used to compare the two variables, the results showed that viral acute gastroenteritis occurred in children less than 15 years of age (33/131, 25.2%) with higher frequency than in adults (6/131, 4.6%) at  $P$ -value  $<0.001$ . Viral gastroenteritis occurred in males at a greater rate than in females. RV infection was observed in males at a rate three times greater than in females but for NoV GII, females were infected at a greater rate than males. The stool samples collected from the patients with acute gastroenteritis on days 1–3 after onset of illness were positive for RVs, NoVs, SaVs, and AdVs. Group A RVs were still detected in the stool samples collected on days 7–9 (Table I).

### Season

Patients with rotaviral diarrhea occurred in the winter season, from January to March. A monthly analysis of cases with acute gastroenteritis, in order to determine the proportion of virus-infected patients, revealed a peak of RV infection in January. The patients infected with NoVs GI were found in October, while the patients with NoVs GII appeared between February and March and between August and November; the peak NoV GII infections was August and September. All patients with acute gastroenteritis caused by SaVs or AdVs were diagnosed in the early summer months (March and April), data not shown.

### Genetic Analysis

Based on screening using RT-multiplex PCR, 16 group A RV (6.1%) cases were detected in 262 stool samples. Fourteen DNA products (87.5%) of the RVs detected were subjected to DNA sequencing of the partial VP7 capsid region. The genotypes of RVs were classified according to the phylogenetic analysis proposed by Khamrin et al. [2007b]. DNA amplification products were associated with RV reference strains and belonged

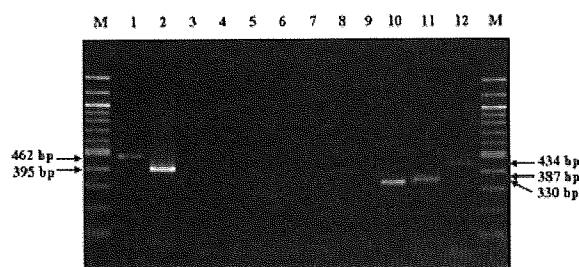


Fig. 1. Detection of enteric viruses in stool samples. Lanes: M, DNA marker (100-bp DNA Ladder); 1, adenovirus-positive sample (No. 057); 2, rotavirus-positive sample (No. 048); 3–9, virus-negative stool samples; 10, norovirus GI-positive sample (No. 105); 11, norovirus GII-positive sample (No. 085); 12, sapovirus-positive sample (No. 039). Gel electrophoresis of the RT-multiplex PCR products of adenovirus showed 462 bp; group A rotavirus, 395 bp; norovirus GI, 330 bp; norovirus GII, 387 bp; and sapovirus, 434 bp.

*J. Med. Virol.* DOI 10.1002/jmv

to RVs G1 (11 samples), G3 (2 samples), and G9 (1 sample), as shown in Figure 2 and Table II. It was found that in this study G1 was the most predominant genotype, followed by G3 and G9. RVs G1 were only found in adults with acute gastroenteritis. Using the BLAST program and phylogenetic analysis, one sample positive for RV G1 showed 98% nucleotide sequence identity with human RV G1 isolate Chi-87 (DQ512998) within the same cluster as the reference KU strain; whereas, nearly all other RVs G1 showed 98–99% identity with rotavirus A strain 7265/JP (EF079066) within the same cluster as reference AU007 strain.

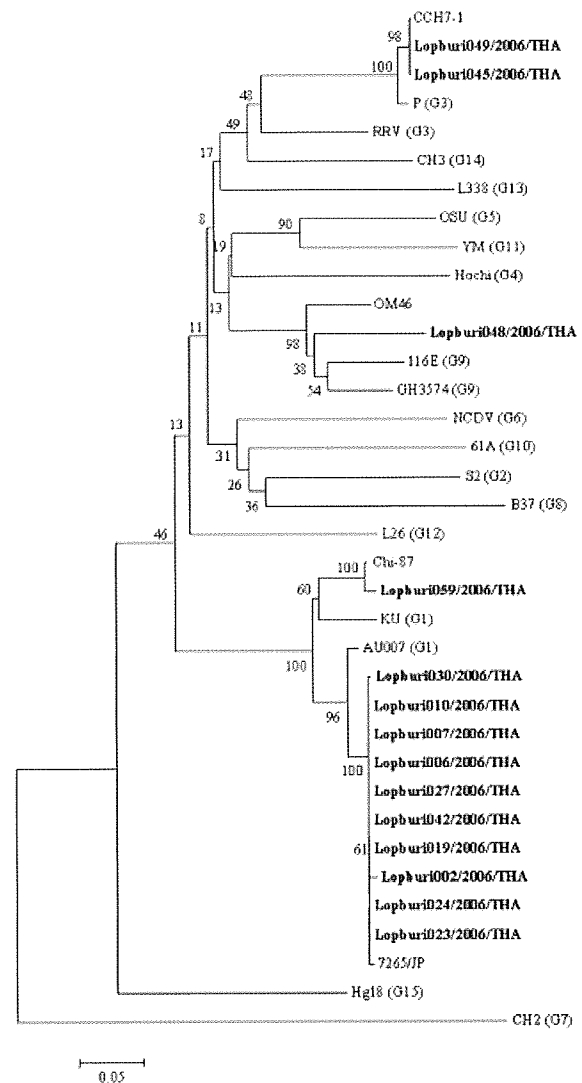


Fig. 2. Phylogenetic analysis of partial VP7 nucleotide sequences of group A rotavirus detected in patients with acute gastroenteritis (Lopburi002-059/2006/THA). The GenBank accession numbers for 15 known G genotypes include: G1; KU (D16343), AU007 (AB081799), G2; S2 (M11164), G3; P (AB118024), RRV (AF295303), G4; HoChi (AB012078), G5; OSU (X04613), G6; NCDV (M12394), G7; CH2 (X56784), G8; B37 (J04334), G9; GH3574 (AY211068), 116E (L14072), G10; 61A (X53403), G11; YM (M23194), G12; L26 (M58290), G13; L338 (D13549), G14; CH3 (D25229), and G15; Hg18 (AF237666). The tree was generated based on the neighbor-joining method and the numbers on each branch indicate the bootstrap values.

TABLE II. Genotypes of Norovirus GI, Norovirus GII, Group A Rotavirus, and Sapovirus Derived From Phylogenetic Analysis of Enteric Viruses in Patients With Acute Gastroenteritis

| Etiologic virus <sup>a</sup> | Genotype <sup>b</sup> | Sample code         | Date of collection  | Age (years)         | Gender         |      |      |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|------|------|
| Norovirus GI                 | GI-2                  | Lopburi105/2006/THA | October 20, 2006    | 4                   | Female         |      |      |
| Norovirus GII                | GII-2                 | Lopburi026/2006/THA | February 14, 2006   | 27                  | Female         |      |      |
|                              | GII-3                 | Lopburi020/2006/THA | February 8, 2006    | <1                  | Male           |      |      |
|                              | GII-4                 | Lopburi084/2006/THA | August 19, 2006     | <1                  | Male           |      |      |
|                              |                       | Lopburi095/2006/THA | September 28, 2006  | 2                   | Female         |      |      |
|                              | Lopburi102/2006/THA   | October 20, 2006    | 2                   | Male                |                |      |      |
|                              | Lopburi103/2006/THA   | October 20, 2006    | <1                  | Male                |                |      |      |
|                              | Lopburi109/2006/THA   | October 20, 2006    | 2                   | Female              |                |      |      |
|                              | Lopburi117/2006/THA   | October 21, 2006    | 2                   | Female              |                |      |      |
|                              | Lopburi127/2006/THA   | October 22, 2006    | 59                  | Female              |                |      |      |
|                              | Lopburi146/2006/THA   | October 30, 2006    | 48                  | Female              |                |      |      |
|                              | Lopburi159/2006/THA   | November 15, 2006   | 2                   | Female              |                |      |      |
|                              | GII-12                | Lopburi043/2006/THA | March 9, 2006       | 2                   | Female         |      |      |
|                              |                       | GII-16              | Lopburi085/2006/THA | August 19, 2006     | 1              | Male |      |
|                              | Lopburi147/2006/THA   |                     | October 30, 2006    | <1                  | Female         |      |      |
|                              | Lopburi155/2006/THA   |                     | November 8, 2006    | 53                  | Female         |      |      |
|                              | Rotavirus             | G1                  | Lopburi002/2006/THA | January 5, 2006     | <1             | Male |      |
| Lopburi006/2006/THA          |                       |                     | January 10, 2006    | 1                   | Female         |      |      |
| Lopburi007/2006/THA          |                       |                     | January 10, 2006    | 4                   | Female         |      |      |
| Lopburi010/2006/THA          |                       |                     | January 18, 2006    | 3                   | Male           |      |      |
| Lopburi019/2006/THA          |                       |                     | January 30, 2006    | 48                  | Female         |      |      |
| Lopburi023/2006/THA          |                       |                     | February 8, 2006    | 1                   | Male           |      |      |
| Lopburi024/2006/THA          |                       |                     | February 10, 2006   | <1                  | Male           |      |      |
| Lopburi027/2006/THA          |                       |                     | February 15, 2006   | 46                  | Male           |      |      |
| Lopburi030/2006/THA          |                       |                     | February 15, 2006   | <1                  | Male           |      |      |
| Lopburi042/2006/THA          |                       |                     | March 9, 2006       | 2                   | Male           |      |      |
| Lopburi059/2006/THA          |                       |                     | March 26, 2006      | <1                  | Male           |      |      |
| G3                           |                       |                     | Lopburi045/2006/THA | March 9, 2006       | 2              | Male |      |
|                              |                       |                     | Lopburi049/2006/THA | March 16, 2006      | 5              | Male |      |
| Sapovirus                    |                       |                     | G9                  | Lopburi048/2006/THA | March 15, 2006 | 1    | Male |
|                              |                       |                     |                     | Lopburi039/2006/THA | March 7, 2006  | 8    | Male |

<sup>a</sup>Enteric virus detected using RT multiplex-PCR.

<sup>b</sup>Genotype determined by phylogenetic analysis.

Seventeen NoVs (6.5%) were detected in 262 stool samples; GI appeared in 0.8% of the samples (two NoVs GI) and GII appeared in 5.7% of the samples (15 NoVs GII). DNA products were sequenced and identified by phylogenetic analysis of the partial capsid region according to the phylogenetic clustering method described by Kageyama et al. [2004]. Only one sample of a DNA product from NoV GI was available for nucleic acid sequencing. Using the BLAST program and phylogenetic analysis, the DNA sequence showed 97% nucleotide sequence identity with human calicivirus SRSV/MI1/94/JP (AB005259), within the same cluster as the reference Southampton strain. This sequence belonged to GI-2 (Fig. 3 and Table II). A total of 15 NoVs GII were classified further into five genotypes: GII-2 (one sample), GII-3 (one sample), GII-4 (nine sample), GII-12 (one sample), and GII-16 (three samples), as shown in Figure 4 and Table II. The most common genotype was NoV GII-4. Two of these NoV GII-4 strains exhibited 99–100% nucleotide identity with NoV Hu/GII.4/Terneuzen70/2006/NL (EF126964); seven of the samples had 99–100% nucleotide identity with NoV Hu/GII.4/Nijmegen115/2006/NL (EF126966). NoV GII-16 was the second most frequent genotype found in this study. The distribution and genetic diversity of NoV GII genotype was observed in all ages.

Of 262 stool samples, two (0.8%) were positive for SaVs, as determined by RT-multiplex PCR and one DNA product was sequenced on the partial capsid region. The genotype was classified according to the clustering method mentioned by Phan et al. [2007b]. Using the BLAST program and phylogenetic analysis, this DNA product showed 94% nucleotide sequence identity with the cruise ship reference strain and classified into GII-3 (Fig. 5 and Table II). Four stool samples (1.5%) were positive for AdVs and all amplified DNA products specific to the hexon gene were analyzed by DNA sequencing. Using the BLAST program, two samples showed 96% and 97% nucleotide sequence identity with human adenovirus type 41 Tak prototype strain (X51783.1). The other two samples showed 96% nucleotide sequence identity with human adenovirus 2 (EU 128938.1) and 97% identity with human adenovirus type 38 (DQ 149633.1).

## DISCUSSION

Outbreaks of gastroenteritis caused by enteric viruses have been recognized and reported from all over the world. The disease burden and severity of viral acute gastroenteritis in Thailand has not been studied extensively since methods for detection of these viruses