

[調査研究]

Chimeric primers を用いた呼吸器系感染症の Multiplex RT-PCR 法

ウイルス課 安藤 克幸

1 はじめに

呼吸器系感染症には急性上気道炎、下気道感染症及び肺炎があり、主にコロナウイルス、パラインフルエンザウイルス、RSウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ライノウイルス、コロナウイルスなどのウイルスとマイコプラズマ、クラミジアや細菌などが原因となって発症する。このうち、秋から冬にかけて流行するインフルエンザウイルスによる集団感染の発生は毎年、多数発生している。

このような集団発生や小児科定点からの調査依頼(感染症発生動向調査)に迅速に対応するため、これまでの個々の検査法を見直し、一斉に分析が可能な方法について検討した。

2 材料および方法

以下に示す方法により既存プライマーとユニバーサル配列の組合せによる 38 種類 (19 セット) のユニバーサルプライマーを作成した。Fig1)

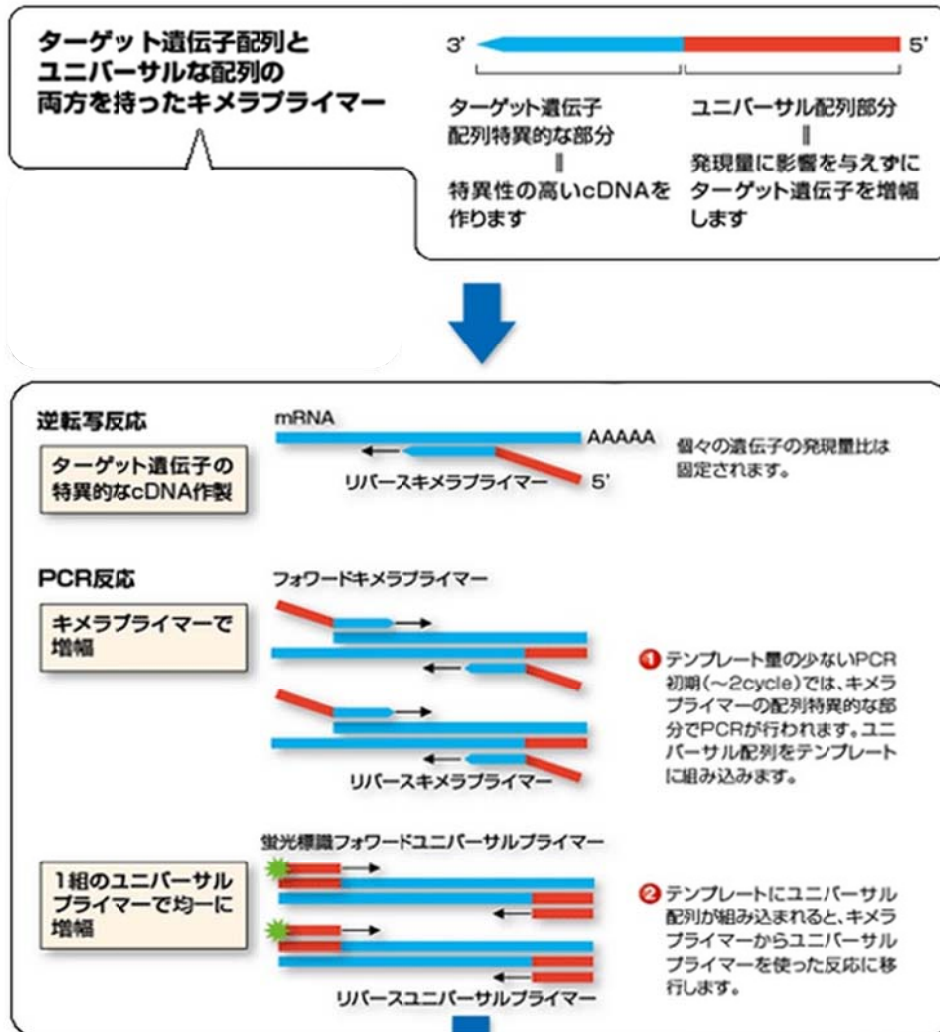


Fig1 キメラ primers の配列、逆転写反応及び PCR 反応

## [調査研究]

## (1)材料

感染症発生动向調査等で収集し、陽性が確定した検体及び Plasmid DNA を positive control (PC) とした。

## (2)分析方法

既報の Chimeric primers<sup>3)</sup>と新規 Chimeric primersによる PC等の検出の確認及び Multiplex PCRによる Ex Bandの有無の確認、これまでの報告と今回設計の分析方法の感度の比較を行った。

## 3 結果

新たに設計した M pneumonia<sup>7)</sup>, C. pneumonia<sup>1)</sup>及び Influenza virus C<sup>8)</sup>の Chimeric primersにより PCの検出が可能であった。Fig2) また、Multiplex PCRによる Ex Bandの出現はなかった。

PCR条件は既報の方法<sup>2,3,5,6)</sup>を検討し、95° C for 3 min, followed by 10 cycles of 95° C for 30 s, 55° C for 45 s, and 72° C for 60 s; 10 cycles of 95° C for 30 s, 65° C for 45 s, 72° C for 60 s; 25 cycles of 95° C for 30 s, 48° C for 45 s, and 72° C for 60 s, and a final incubation of 72° C for 3 min とした。

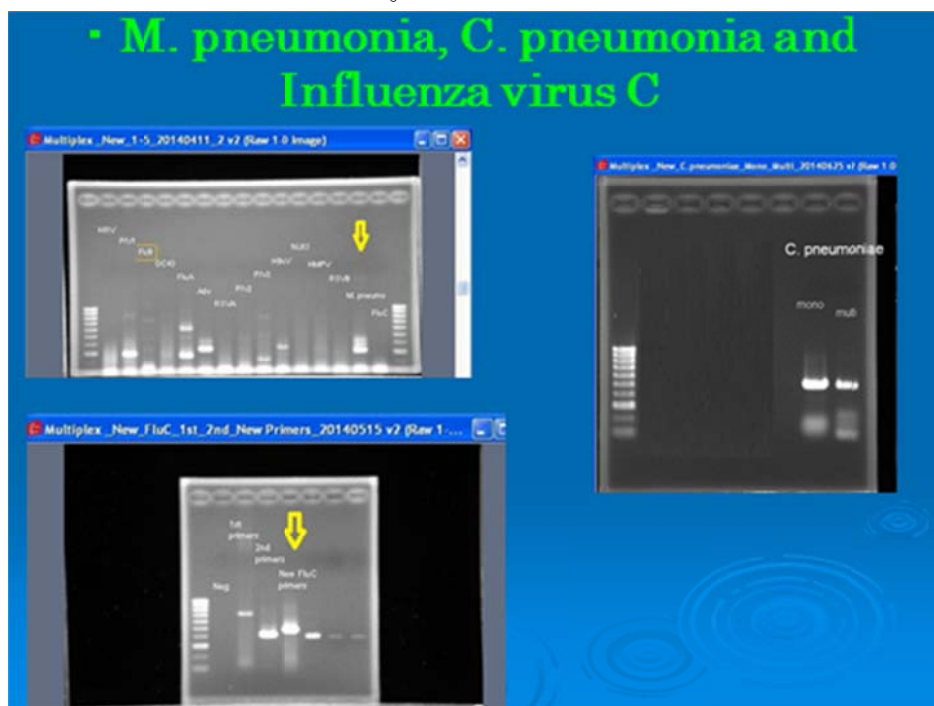


Fig2 M. pneumoniae, C. pneumoniae 及び Influenza virus C の電気泳動結果

## 4 考察

既報の16項目の検出に加えて3項目を加えた19項目を5グループに分割した Multiplex RT-PCRが可能となった。Table1)

Table1 19項目(38種類)検出用プライマー  
MultiPlex I

HRV (148bp), CoV 229E (189bp), CoV HKU1 (226bp), PIV1 (286bp)  
 HRV F ; AGGTGACACTATAGAATACCCCTGAATGYGGCTAACCT  
 HRV R ; GTACGACTCACTATAGGGACGGACCCAAAGTAGTYGGT  
 229E F ; AGGTGACACTATAGAATACTCGGAATCCTTCAAGTGACAGA  
 229E R ; GTACGACTCACTATAGGGAACGAGAAGGCTTAGGAGTAC

## [調査研究]

HKU1F ; AGGTGACACTATAGAATATATAGTRAAACCTGATATGGCT  
 HKU1R ; GTACGACTCACTATAGGGATACCAAAACACTGTTGAACAT  
 PIV1F ; AGGTGACACTATAGAATATCTCATTATTACCYGGACCAA  
 PIV1R ; GTACGACTCACTATAGGGATCCTGTTGTCGTTGATGTCATA

## MultiPlexⅡ

FluB (171bp), CoV OC43 (208bp), FluA (M) (244bp), Adv (342bp)

FLuB F ; AGGTGACACTATAGAATAAAAAAGRAGATTCATCACAGAGC  
 FLuB R ; GTACGACTCACTATAGGGATTCTGCTATTTCAAATGCTTCA  
 OC43 F ; AGGTGACACTATAGAATAATTGCACCAGGAGTCCCA  
 OC43 R ; GTACGACTCACTATAGGGATATCGGTGCCGACTGGTCT  
 FluA F ; AGGTGACACTATAGAATATTCTAACCGAGGTGCGAAACG  
 FluA R ; GTACGACTCACTATAGGGAACAAAGCGTCTACGCTGCAG  
 Adv F ; AGGTGACACTATAGAATAGCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC  
 Adv R ; GTACGACTCACTATAGGGACAGCACSCCICGRATGTCAAA

## MultiPlexⅢ

RSVA (163bp), PIV2 (198bp), PIV3 (233bp), and HBoV (298bp)

RSVA F ; AGGTGACACTATAGAATACATCCCCTCTATGCACAACC  
 RSVA R ; GTACGACTCACTATAGGGACATGTTTCAGCTTGTGGGAA  
 PIV2 F ; AGGTGACACTATAGAATATCTACTGCATCAGCCAGC  
 PIV2 R ; GTACGACTCACTATAGGGACCCCTAAAAGAGATGAGCCC  
 PIV3 F ; AGGTGACACTATAGAATATTGTCAATTATGATGGYTCAATCT  
 PIV3 R ; GTACGACTCACTATAGGGAGACACCCAGTTGTGTTGCAG  
 HBoV F ; AGGTGACACTATAGAATAAAGAAAAGGGAGTCCAGAA  
 HBoV R ; GTACGACTCACTATAGGGACTCTGTGTTGACTGAATACAG

## MultiPlexⅣ

CoV NL63 (179b), HMPV(L) (212bp), HMPV(N), (212bp)RSVB (280bp)

NL63 F ; AGGTGACACTATAGAATATCCCAAATGTGATAGAGCTTGC  
 NL63 R ; GTACGACTCACTATAGGGACTGTAAAACCTGTGCCAACTC  
 HMPV F1(L) ; AGGTGACACTATAGAATACATGCCCACTATAAAAAGGTCAG  
 HMPV R1(L) ; GTACGACTCACTATAGGGACACCCAGTCTTCTTGA  
 HMPV F(N) ; AGGTGACACTATAGAATAGAGCTAAYAGAGTGCTAAGTGATG  
 HMPV R(N) ; GTACGACTCACTATAGGGAACCTTCTGCTTGTCTCCTGT  
 RSVB F ; AGGTGACACTATAGAATAAACGAAGATTTCTGGGCTTC  
 RSVB R ; GTACGACTCACTATAGGGATGCGACAGCTCTGTTGATTT

## MultiPlexⅤ

M pneumonia(277bp), C. pneumonia(463bp), Influenza virus C(441bp)

MP16s1 ; AGGTGACACTATAGAATA AAGGACCTGCAAGGGTTCGT  
 MP16s2 ; GTACGACTCACTATAGGGA CTCTAGCCATTACCTGCTAA  
 CP16s1 ; AGGTGACACTATAGAATATGACAACTGTAGAAATACAGC  
 CP16s2 ; GTACGACTCACTATAGGGACGCTCTCTCCTATAAAAT  
 FluC\_HEF\_F ; AGGTGACACTATAGAATAGTGCAAACCTGCATCTTGTGG  
 FluC\_HEF\_R ; GTACGACTCACTATAGGGACTCATTCTTGTGATCTCCATG

Rnasep F ; AGGTGACACTATAGAATAGAGGCTGGCTTTTGAACCT

## [調査研究]

Rnasep R ; GTACGACTCACTATAGGGAATCAAATTGAGGGCACTGGA

※内標準用 ; ヒトの RNaseP gene 検出用 chimeric primers

Tag F ; AGGTGACTACTATAGAATA (universal forward primer)

Tag R ; GTACGACTCACTATAGGGA (universal reverse primer)

検出感度の比較では、感染性胃腸炎検出系で使用する Adeno V. 用の primers に比較して、この呼吸器系検出用 primersの方が検出感度が高いことが判明した。Fig3)



Fig3 吸器系検出用と感染性胃腸炎検出用 Adeno V. primers の検出感度の比較

また、臨床検体が共通し、2つ(感染性胃腸炎、呼吸器系)の測定系で検出できない Boca V., Parecho V. and Saffold V.については、この DNase・RT の系を変更した方法 (RT の時間を 15min から 30min に変更(Boca V. は特異的 primer を使用)) で検出できることが確認できた。Fig4)

## [調査研究]



Fig 4 A result of electrophoresis of Boca V., ParechoV. and Saffold V.

## 5 文献

- 1) Haranaga, S., H. Ikejima, H. Yamaguchi, H. Friedman, and Y. Yamamoto. Analysis of *Chlamydia pneumoniae* growth in cells by reverse transcription-PCR targeted to bacterial gene transcripts. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002 ; 9:313-319.
- 2) Hu X, Zhang Y, Zhou X, et al. Simultaneously typing nine serotypes of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012;50(2):288-293.
- 3) Jin Li, Shunxiang Qi, Chen Zhang, et al. A Two-Tube Multiplex Reverse Transcription PCR Assay for Simultaneous Detection of Sixteen Human Respiratory Virus Types/Subtypes. *Biomed Res Int.* Volume 2013 (2013), Article ID 327620, 8 pages.
- 4) J. Mahony, S. Chong, F. Merante, S. Yaghoubian, et al. Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay. *J Clin Microbiol.* 2007 ; 45(9): 2965-2970.
- 5) Li J, Mao NY, Zhang C, et al. The development of a GeXP-based multiplex reverse transcription-PCR assay for simultaneous detection of sixteen human respiratory virus types/subtypes. *BMC Infectious Diseases.* 2012;12, article 189
- 6) Tabone T, Mather DE, Hayden MJ. Temperature Switch PCR (TSP): robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs. *BMC Genomics.* 2009;10, article 580
- 7) van Kuppeveld F. J. M., van der Logt J. T. M., Angulo A. F., van Zoest M. J., Quint W. G. V., Niesters H. G. M., Galama J. M. D., Melchers W. J. G. (1992) Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2606-2615.
- 8) Zhang W, Evans DH. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991;33:165-89.17.