

リケッチア症レファレンスセンター会議 報告2016

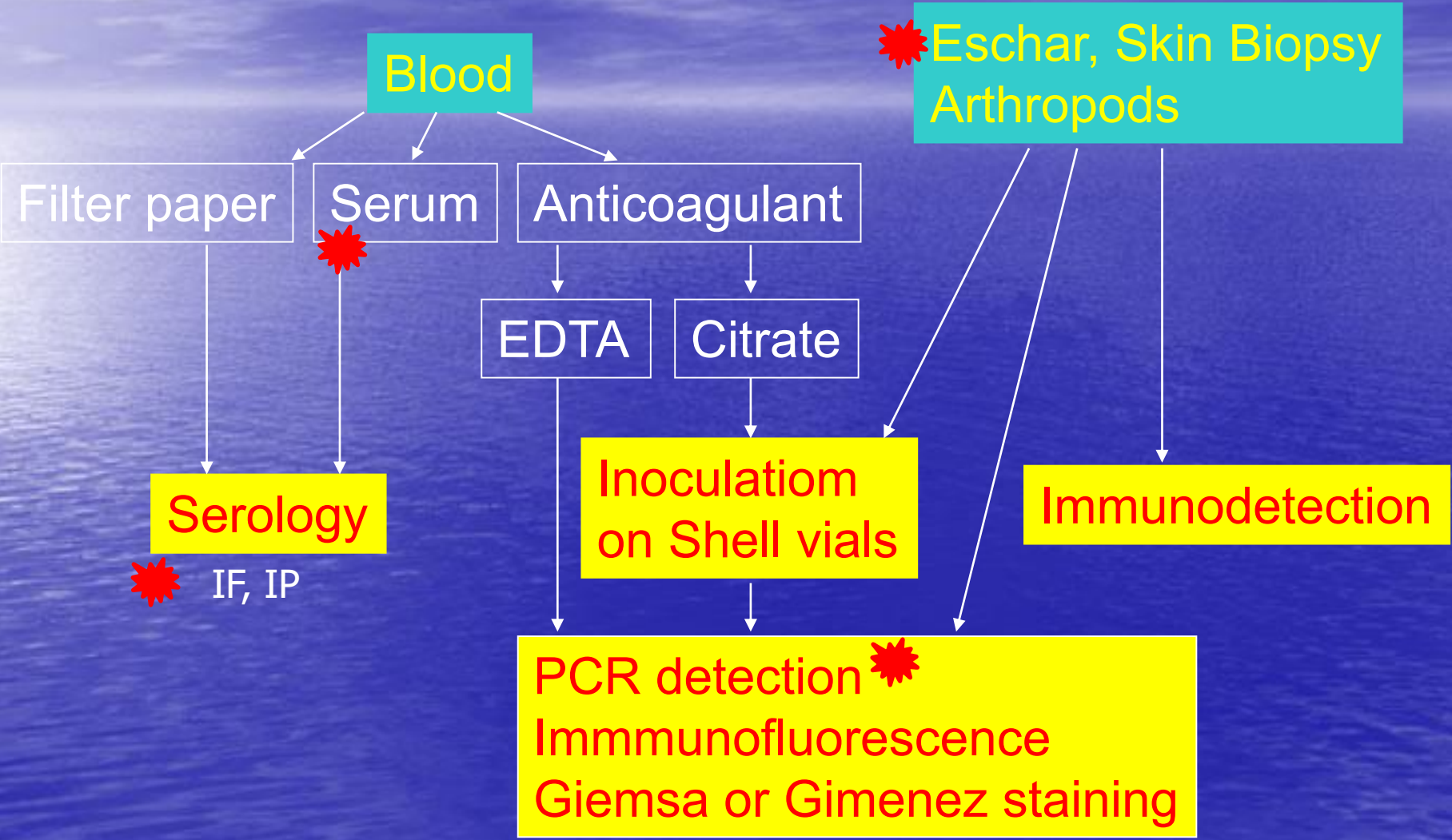
全国衛生微生物技術協議会, 2016年7月22日, 広島

- 北海道東北地区
福島県衛生研究所
青森県環境保健センター
- 東海北陸
三重県保健環境研究所
富山県衛生研究所
- 関東甲信静
東京都健康安全研究センター
埼玉県衛生研究所
- 近畿ブロック
和歌山県環境衛生研究センター
兵庫県立生活科学研究所健康科学研究センター
- 中国・四国
岡山県環境保健センター
広島県総合科学研究所環境保健センター
高知県衛生研究所
- 九州
宮崎県衛生環境研究所
鹿児島県環境保健センター

世話人 安藤秀二
国立感染症研究所
ウイルス第一部第五室
shuando@nih.go.jp

- **イントロ（情報共有：発生状況 等）**
- **情報提供（診断系の流れの確認。新規LAMP法）**
- **情報提供（感染細胞抗原を用いたELISA（抗体検出））**
- **情報提供（広島県の取り組み）**
 - **広島県内のダニ類媒介感染症の発生状況と検査対応等について**
 - **ダニ媒介感染症について総合的に対応している実例を紹介，他県での取り組みの参考とする。**
- **意見交換**

Strategy of Laboratory Diagnosis of Rickettsial Infection



リケッチア症に用いる遺伝子検出

国内のリケッチア症の多様性 (*Rickettsia japonica* 以外の紅斑熱群リケッチアによる患者発生, つつが虫病の抗原性状の多様性) から, 特異性は保ちながらも, より広範なリケッチアを検出する系でスクリーニングし, その後 conventional PCR からシーケンス解析で種, 型を決定するのが望ましい。

- Kawamori et al (SFG and Scrub typhus Realtime PCR, H26衛微協)
 - 感染症法で規定され、国内で確実に発生するつつが虫病と日本紅斑熱をスクリーニング可能
- Hanaoka et al (*R. japonica* Realtime PCR, *R. heilongjiangensis*, *Emerg Infect Dis* 15:1994-7, 2009)
 - イスカマダニの生息が現在確認されている地域以外(宮城県より南)は *R. japonica* としてほぼ間違いない。
- Conventional PCR (*Rickettsia* spp 17KDa, *gltA*, H20希少感染症研修)
 - シーケンスにより種の確定
- Conventional PCR (*O. tsutsugamushi* type-specific antigen (TSA))
 - Furuya et al: Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura A Jr.: Serotype-specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA by nested polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31; 1637-40
 - Sato et al: 佐藤寛子、柴田ちひろ、斎藤博之、須藤恒久: 秋田県における Shimokoshi 型 つつが虫病の遡及的疫学調査. *Med. Entomol. Zool.*, 2014, 65(4):183-188

リケッチア属検出のためのLAMP法の検討

背景と目的

- 国内の紅斑熱群リケッチア症として、*Rickettsia japonica*による日本紅斑熱は発生地域拡大とともに近年増加傾向にある。
- *R. heilongjiangensis*による極東紅斑熱や*R. helvetica*、*R. tamurae*による患者も報告されている。
- 紅斑熱群リケッチアは世界的にも極めて多種のものが知られ、従来の遺伝子増幅検出系では特異性を重視するあまり、異なる種の検出には不適切である。
- すべてのリケッチア属を検出できる遺伝子検出系の検討が必要。

方法:LAMP 使用機器及び反応組成

使用酵素 LoopampDNA増幅試薬キット [栄研化学]

使用機器 リアルタイム濁度測定装置 RT-160C [栄研化学]
LOOP 反応チューブ [栄研化学]

反応時間

63°C 60分

基本反応組成

使用量

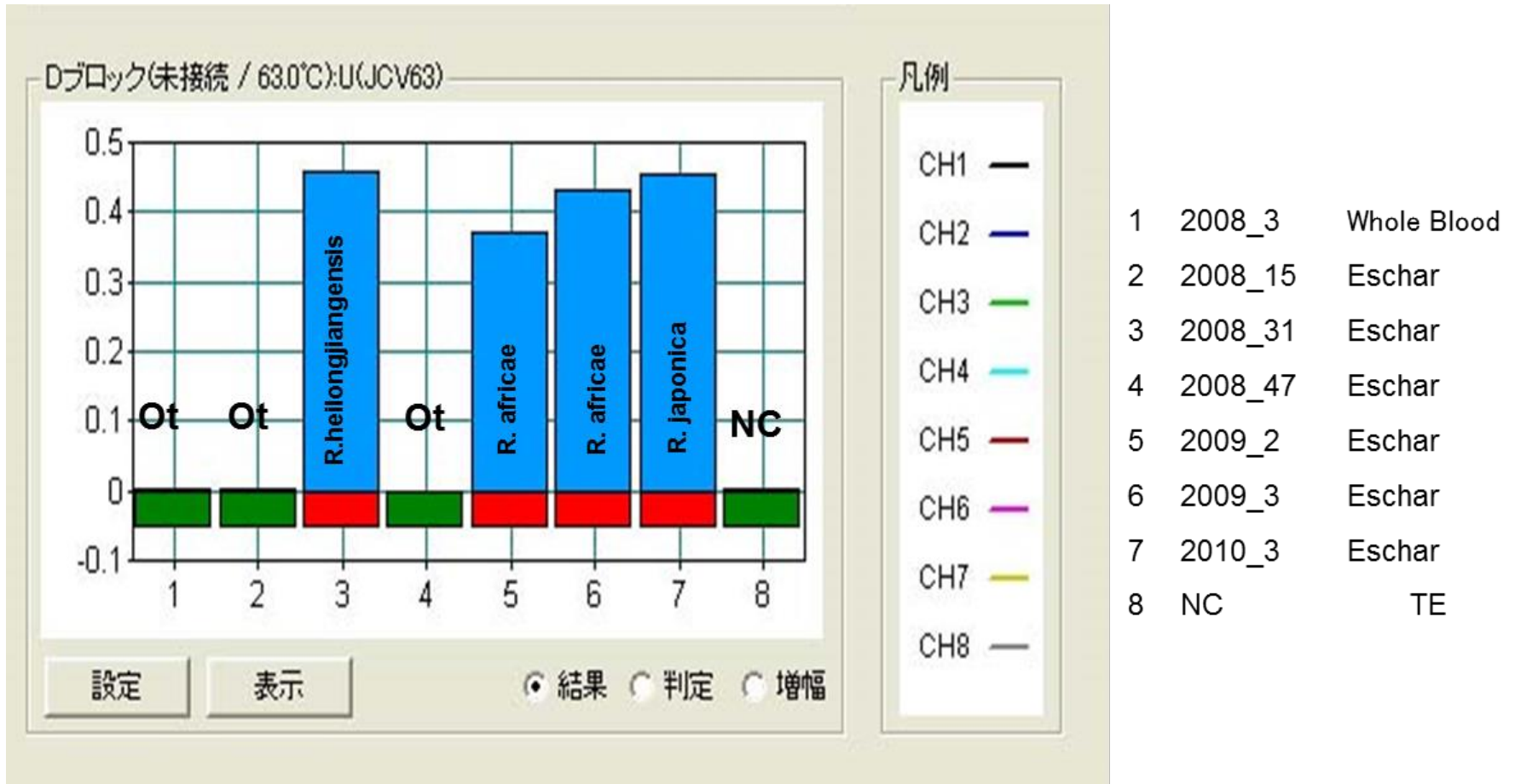
| | |
|--------------------|---------|
| Reaction Mix (2 ×) | 12.5 μl |
| FIP (40 μM) | 1 μl |
| BIP (40 μM) | 1 μl |
| Loop-F (20 μM) | 1 μl |
| Loop-B (20 μM) | 1 μl |
| F3 (5 μM) | 1 μl |
| B3 (5 μM) | 1 μl |
| F3_cana (5 μM)* | 1 μl |
| B3_cana (5 μM)* | 1 μl |
| Bst DNA polymerase | 1 μl |
| template | 1 μl |
| dH2O (滅菌蒸留水) | 8.5 μl |
| Total | 25 μl |

| Set ID | Name | Nucleotide sequence (5'-3') | Purpose |
|--------|---------------|---|---------------------------------------|
| | 164_3_F3 | GGATCATTACTATGCTAATAGGTT | |
| | 164_3_B3 | TCGATTAATAACCGCAGCT | |
| | 164_3_FIP | TCTTTGTTGCAGGAGGCCAGGGCTTATAGGAATTTT ATGGATAGC | |
| | 164_3_BIP | TACTCACTGGTTCGCTTCAAAGAATAGCAAGAGCA CCACCT | |
| 164_3 | 164_3_F3_cana | GGATCATTACTATTCTAATAGGCT | LAMP for <i>Rickettsia</i> spp. |
| | 164_3_B3_cana | TCGACACCAATAAATTAACT | |
| | 164_LF | CCCATAGATTGAAACCAGTTACTG | |
| | 164_LB | TGGGCTATGGGTGCAACTTCTAATC | |

*反応性向上のために配列の若干異なるF3_cana,B3_canaを加えた。

*JJID Advance Publication, Hanaoka N et al

臨床検体



Each samples were amplified by Rickettsia spp. or Orientia-specific nested PCR, and identified by sequence analysis.