

鳥インフルエンザ遺伝子検査法の特性と電気泳動による リアルタイム PCR 結果の検証

井上大輔[†] 吉野文彦 向原要一 岩松 茂

長崎県中央家畜保健衛生所 (〒 854-0063 諫早市貝津町 3118)

(2014 年 10 月 31 日受付・2015 年 5 月 18 日受理)

要 約

鳥インフルエンザの遺伝子検査法であるリアルタイム PCR (rPCR) とコンベンショナル PCR (cPCR) の感度を比較したところ、rPCR が cPCR の 10～10,000 倍以上高感度であった。ジーンバンクに登録された塩基配列情報と遺伝子検査に用いるプライマー、プローブの配列を比較したところ、NP 遺伝子ではミスマッチが少なく、近隣諸国の浸潤株を見逃す可能性は低いと推察された。一方、H5 亜型ではミスマッチが多く、一部の低病原性株の検出に際し感度の低下が懸念され、診断上の注意、プライマーやプローブの適宜更新が必要と考えられた。rPCR 産物を電気泳動に供することで rPCR 結果の確認が可能か検討したところ、rPCR で発生する非特異反応の判別も可能であり、結果の信頼性向上や検査感度の上昇に繋がる方法となり得ることが示唆された。

——キーワード：鳥インフルエンザ、電気泳動、遺伝子検査、ミスマッチ、感度。

----- 日獣会誌 68, 569～574 (2015)

近年、わが国では、高病原性鳥インフルエンザ (HPAI)、あるいは低病原性鳥インフルエンザが相次いで発生し [1-9]、特に、2010～2011 年、9 県 24 農場において発生した H5N1 亜型 [9] による被害は甚大で、最終的な殺処分羽数は 183 万羽にのぼった。これを契機に、農林水産省は家畜伝染病予防法を改正するとともに、発生予防、早期発見、迅速な初動対応の強化を目的として、防疫指針を改訂した。これにより、発症鶏から H5 もしくは H7 亜型鳥インフルエンザウイルス (AIV) に特異的な遺伝子が検出された時点で疑似患者と確定されるようになったため、従来、H5 もしくは H7 亜型 AIV の分離及び同定後、すなわち発見から数日を待たねば開始できなかった防疫活動が、早ければ発見当日中に開始できるようになった。しかしながら、これにより、新たな問題も浮上してきた。

AIV は、遺伝子変異が起りやすい RNA ウイルスであり、中でも亜型の判定に重要な HA 遺伝子は特に変異が多い領域で、自然界には多様な遺伝子が存在することが知られている [10, 11]。これまで、HA 遺伝子を標的としたコンベンショナル PCR 法 (cPCR) [12-14] や

リアルタイム PCR 法 (rPCR) [15-19] が国内外で開発されてきたが、プライマーやプローブのミスマッチにより、新たに出現した変異株を検出できない場合や、検出感度が低下する可能性があることが報告されている [19-21]。重要疾病の診断、ひいては農場飼養鶏の全羽殺処分という重大な決定を下すために行われている遺伝子診断法の精度や限界を見極めることはきわめて重要である。また、遺伝子検査には、非特異反応による偽陽性の可能性が常に存在する。今回の指針の改訂で採用されたプローブ法の rPCR [20, 21] においても、検査結果の真偽を簡便に確認できる方法が検査の信頼性を高めることが期待される。

本研究では、これらの問題に対処すべく rPCR と cPCR の感度を比較し、rPCR で使用するプライマー、プローブ配列とデータベースに登録されている塩基配列との比較を行うとともに、rPCR 結果を補助的に検証する方法として rPCR 産物の電気泳動を検討した。

材料及び方法

感度の検討：AIV 4株(A/duck/Chiba/3/2007(H3N2))

[†] 連絡責任者：井上大輔 (長崎県中央家畜保健衛生所)

〒 854-0063 諫早市貝津町 3118

☎ 0957-25-1331 FAX 0957-25-1332

E-mail : inoued00@pref.nagasaki.lg.jp

表1 供試ウイルス株, 標的遺伝子, プライマー, プローブの組み合わせ

ウイルス株	標的遺伝子	rPCR				cPCR (1step, 2step, 高速 2step)		
		F ³⁾	R ⁴⁾	P ⁵⁾	文献	F	R	文献
Chiba/H3	NP	NP-1200F(0 ⁶⁾)	NP-1529R(0)	NP-Probe(0)	[19]	NP-1200(0)	NP-1529(0)	[12]
Tsukuba/H5	HA(H5)	H5-918F(1)	H5-1166R(0)	H5-Probe(0)	[19]	H5-155f(3)	H5-699r(0)	[12]
Shimane/H7	HA(EuH7 ¹⁾)	H7-937Feu(0)	H7-1177R(0)	H7-Probe(0)	[19]	H7-12f(7)	H7-645r(0)	[12]
NY/H7	HA(AmH7 ²⁾)	H7-937Fau(0)	H7-1177R(0)	H7-Probe(0)	[19]	H7-12f(6)	H7-645r(0)	[12]

1) EuH7 (ユーラシア系統 H7) 2) AmH7 (アメリカ系統 H7) 3) フォワードプライマー 4) リバースプライマー
5) プローブ 6) プライマーもしくはプローブとウイルスとの遺伝子塩基配列のミスマッチ数を示す。

(Chiba/H3), A/duck/Tsukuba/9/2005(H5N2) (Tsukuba/H5), A/duck/Shimane/83/2006(H7N3) (Shimane/H7), A/chicken/NY/119055-7/2001(H7N2) (NY/H7)) (いずれの株も HA 価 4,096 倍以上) を材料として, 市販の RNA 精製キット (QIAamp Viral RNA Mini, 株) QIAGEN, 東京) を用い, 取扱説明書のスピンプロトコールに準じて精製した各 RNA を 10 倍階段希釈 ($10^0 \sim 10^{-6}$ 倍) し, Tsukamoto ら [19] の報告した rPCR 及び Lee ら [12] の報告した cPCR の検出限界を比較した. rPCR は, 市販の rPCR 用逆転写反応キット (PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time), タカラバイオ株, 滋賀) を用い, 鋳型 RNA を $5 \mu\text{l}$, 最終液量を $10 \mu\text{l}$, 逆転写反應用のプライマーはキット添付のランダムプライマーとして, キットの使用方法に従い cDNA を合成し, rPCR キット (Premix Ex Taq (Perfect Real Time), タカラバイオ株, 滋賀) を用い, 鋳型 cDNA を $1 \mu\text{l}$, 最終液量 $20 \mu\text{l}$ として, 95°C 30 秒間の熱変性の後, 95°C 10 秒間, 50°C 20 秒間, 60°C 32 秒間の反応サイクルを 35 回繰り返した. cPCR は, 1 ステップ RT-PCR 用キット (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, 株) QIAGEN, 東京) を用いた 1 ステップ cPCR (1step), 逆転写反応キット (PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit, タカラバイオ株, 滋賀) 及び cPCR キット (TaKaRa Ex Taq, タカラバイオ株, 滋賀) を用いた 2 ステップ cPCR (2step), 逆転写反応キット (PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit, タカラバイオ株, 滋賀) 及び高速 cPCR キット (SapphireAmp Fast PCR Master Mix, タカラバイオ株, 滋賀) を用いた 2 ステップ cPCR (高速 2step) の 3 種類を実施した. 1step は, 鋳型 RNA を $1 \mu\text{l}$, 最終液量を $20 \mu\text{l}$ として, 50°C 30 分間の逆転写反応, 95°C 10 分間の熱変性の後, 94°C 30 秒間, 45°C 30 秒間, 72°C 45 秒間の反応サイクルを 35 回繰り返す. 2step は, 鋳型 RNA を $1 \mu\text{l}$, 最終液量を $10 \mu\text{l}$, 逆転写反應用のプライマーはキット添付のランダムプライマーを用い, キットの使用方法に従い cDNA を合成し, 鋳型 cDNA を $1 \mu\text{l}$, 最終液量 $20 \mu\text{l}$ として, 94°C 10 分間の熱変性の後, 94°C 30 秒間, 50°C 30 秒間, 72°C 1 分間

の反応サイクルを 35 回繰り返す. 最後に 72°C 10 分間の伸長反応を行った. 高速 2step は, 2step と同様に cDNA を合成し, 鋳型 cDNA を $1 \mu\text{l}$, 最終液量 $20 \mu\text{l}$ として, 94°C 2 分間の熱変性の後, 98°C 5 秒間, 50°C 5 秒間, 72°C 10 秒間の反応サイクルを 35 回繰り返す. 最後に 72°C 10 分間の伸長反応を行った. 試験におけるウイルス株, 標的遺伝子, プライマー, プローブの組み合わせ, プライマー, プローブとウイルス株の塩基配列のミスマッチについては表 1 に示す. rPCR については, 各希釈につき 2 検体を供試し, 市販の rPCR 装置 (ABI7500, ライフテクノロジーズ・ジャパン株, 東京) を用い, ベースラインを 3~15 サイクル, Threshold を 0.05 に設定した上, 各希釈の 2 検体とも Threshold ラインを超えた最高希釈倍数を検出限界と判定した.

また, 極東地域で検出された A 型 (18 亜型 145 株) 及び H5 亜型 (高病原性 224 株, 低病原性 29 株) インフルエンザウイルスを NCBI のジーンバンクから選抜し (表 2), 上記の検出限界の比較で使用した rPCR 用の NP 及び H5 のプライマー及びプローブ [19], cPCR 用の NP 及び H5 のプライマー [12] に加え, 国内で開発された cPCR 用の H5 のプライマー [22] との間で, MEGA5 を用いて塩基配列を比較し, それぞれのプライマーもしくはプローブについて何株に何塩基のミスマッチがあるかカウントした. また, 同様の方法で, 各プライマーの 3' 末端の 1 塩基がミスマッチとなる株数をカウントした. なお, 近年の国内の養鶏場における発生事例がすべて H5 亜型ウイルスによるものであった [1-9] ことから, H7 のプライマーもしくはプローブのミスマッチについては今回解析を行わなかった.

rPCR 結果の確認法の検討: 感度の検討で得られた rPCR 産物を電気泳動 (rPCR+電気泳動) に供し, 陽性検体の確認や非特異反応の陰性判定が可能か検討した. また, rPCR+電気泳動, 1step, 2step 及び高速 2step について, 逆転写から判定まで反応に要する時間を比較した.

表2 ジーンバンクからの選抜株

標的	亜型	株数	分離年	由来
NP	H1N1	1	2004	鳥類
	H3N2	3	2006, 2007, 2010	哺乳類
	H3N6	5	2000, 2004	鳥類
	H3N8	3	2004, 2005, 2010	鳥類
	H4N2	1	2009	鳥類
	H4N6	2	2004, 2005	鳥類
	H5N1	109	1997, 1999~2012	鳥類, 哺乳類, 環境
	H5N2	8	1999, 2001, 2004, 2005, 2007, 2012	鳥類
	H5N3	2	2002, 2003	鳥類
	H6N1	2	1999, 2005	鳥類
	H6N2	1	2006	鳥類
	H6N5	2	2004	鳥類
	H8N4	1	2005	鳥類
	H9N2	1	2001	鳥類
	H11N2	1	2005	鳥類
	H11N9	1	2005	鳥類
	H14N5	1	1992	鳥類
H14N6	1	1992	鳥類	
小計		145		
	高病原性 ¹⁾			
	H5N1	224	1997, 2002~2011	鳥類, 哺乳類, 環境
	低病原性 ¹⁾			
H5	H5N1	2	2004, 2009	鳥類
	H5N2	20	1978, 2004~2008	鳥類
	H5N3	7	1976, 2002, 2005, 2006, 2010	鳥類
小計		253		

1) OIE 基準の HA タンパク質の開裂部位の推定アミノ酸配列 (Avian Influenza, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 436-454 (2013)) から分類。

成 績

感度: 各検査法の検出限界を表3に示す。今回検証に供したウイルス株に対して、最も感度が高かったのが rPCR で、いずれの検査でも cPCR より 10~10,000 倍以上高感度であった。この感度の差は、特に H5 及び H7 の検査で顕著であった。cPCR の中では、1step の感度が高い傾向がみられた。H5 及び H7 では株と検査法の組み合わせで検出できないものがあった。

表3 各検査法の検出限界

標的 遺伝子	ウイルス株	rPCR	cPCR		
			1step	2step	高速 2step
NP	Chiba/H3	- 4 ¹⁾	- 3	- 2	- 2
H5	Tsukuba/H5	- 4	- 2	ND ²⁾	0
H7 (ユーラ シア系統)	Shimane/H7	- 4	- 3	0	0
H7 (北米 系統)	NY/H7	- 3	- 1	- 1	ND

1) 検出限界 (10ⁿ 倍) 2) ND: 検出されず

各プライマー、プローブのミスマッチは、表4に示すとおりであった。NP 遺伝子では、rPCR で最大1塩基、cPCR で最大3塩基、高病原性株の H5 遺伝子では、rPCR、cPCR ともに最大2塩基、低病原性株では、rPCR で最大4塩基、cPCR では最大6塩基のミスマッチが認められた。また、H5 遺伝子の cPCR のプライマーの一つで、3' 末端のミスマッチが多く認められた。

rPCR 結果の確認法: 感度は rPCR 単独より rPCR+電気泳動の方が高く、rPCR で陽性と判定された検体は、1 検体を除き、すべて電気泳動で目的サイズのバンドが認められた (表5)。NP 遺伝子で 10⁻⁶ の1 検体が rPCR で陽性となったが、これについては電気泳動で目的外のサイズのバンドが認められ、非特異反応と判定された。

検査の所要時間は、rPCR+電気泳動が148分、1step が231分、2step が216分、高速2step が160分であった。

考 察

AIV の遺伝子検査法について検討を行った結果、感度の検討では、rPCR の感度が高く、cPCR の感度は、特に亜型判別の検査で低い傾向にあった。塚本ら [21] は、AIV の rPCR の開発過程において、プライマーやプローブのミスマッチが3塩基以上あると、感度が低下したり、検出できずに偽陰性となる場合があったことを報告している。試験に用いた亜型判別用 cPCR のプライマー、プローブは、rPCR と比較して供試株の遺伝子との間に多くのミスマッチが認められ、このミスマッチが感度低下の一因である可能性が考えられた。cPCR の中では 1step の感度が高い傾向にあったが、1step は他の2種類の cPCR と比較して最終反応溶液中に持ち込む RNA 量が10倍多かったことが、感度の差の一因として考えられた。しかし、亜型判別の 2step や高速 2step では、1step と比較して100倍以上の感度の差が認められたものや、検出できないものがあった。PCR の感度は、プライマー以外に、使用する酵素や検査条件によっても異なることや、混合塩基を用いたプライマー、プローブではマッチした塩基の種類によって Tm 値が変動することも考えられる。今回の結果については、それらの条件を

表4 選抜株とプライマー、プローブのミスマッチ

標的遺伝子	検査法	プライマー プローブ ¹⁾	供試株 病原性 ²⁾	供試 株数	ミスマッチ株数							
					0 ³⁾	1	2	3	4	5	6	3' 末端
NP	cPCR [12]	F	・	145	7	67	68	3	0	0	0	0
		R	・	145	141	4	0	0	0	0	0	0
	rPCR [19]	F	・	145	142	3	0	0	0	0	0	0
		R	・	145	141	4	0	0	0	0	0	0
H5	cPCR-A [12]	F	HP	224	198	25	1	0	0	0	0	0
		R	HP	224	217	7	0	0	0	0	0	0
	cPCR-B [22]	F	HP	224	106	116	2	0	0	0	0	82
		R	HP	224	204	20	0	0	0	0	0	0
	rPCR [19]	F	HP	224	160	61	3	0	0	0	0	0
		R	HP	224	159	64	1	0	0	0	0	0
		P	HP	224	210	14	0	0	0	0	0	0
	cPCR-A [12]	F	LP	29	5	1	20	3	0	0	0	0
		R	LP	29	23	6	0	0	0	0	0	0
	cPCR-B [22]	F	LP	29	1	0	20	6	0	1	1	5
		R	LP	29	0	25	2	2	0	0	0	0
	rPCR [19]	F	LP	29	5	21	1	1	1	0	0	0
R		LP	29	25	4	0	0	0	0	0	0	
P		LP	29	24	5	0	0	0	0	0	0	

1) F (フォワードプライマー) R (リバースプライマー) P (プローブ)

2) HP: 高病原性 LP: 低病原性 ・: 分類せず

3) ミスマッチ塩基数

表5 rPCR と rPCR+ 電気泳動の成績

標的遺伝子	ウイルス株	rPCR 成績 / rPCR+ 電気泳動成績						
		0 ¹⁾	- 1	- 2	- 3	- 4	- 5	- 6
NP	Chiba/H3	++/++ ²⁾	++/++	++/++	++/++	++/++	+-/+	+-/--
H5	Tsukuba/H5	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	+-/+	---/--
H7 (ユーラシア系統)	Shimane/H7	++/++	++/++	++/++	++/++	++/++	--/--	--/--
H7 (北米系統)	NY/H7	++/++	++/++	++/++	++/++	--/+	--/--	--/--

1) 検体希釈倍率 (10ⁿ 倍)

2) +: 陽性 -: 陰性 希釈ごと同検体を2つずつ供試

念頭に置いた評価が必要である。

極東地域に浸潤しているインフルエンザウイルスと、プライマーもしくはプローブのミスマッチを調べたところ、特に NP の rPCR は最も配列のミスマッチが少なく、近年、近隣諸国に浸潤しているほとんどの AIV を検出できると考えられた。一方、H5 遺伝子では、高病原性株に対するミスマッチはすべて2塩基以下であったものの、低病原性株で3塩基以上のミスマッチのある株が複数認められた。また、H5 遺伝子の cPCR のプライマーの一つに、3' 末端のミスマッチが多く認められた。DNA 合成の基点となるプライマーの3' 末端がミスマッチである場合、DNA ポリメラーゼが DNA 合成を始めない、あるいは DNA 合成効率が低下する可能性がある。これらのことから、H5 亜型の遺伝子検査では、株とプ

ライマーやプローブの組み合わせによっては検出感度が低下し、偽陰性となる可能性があり、発生状況やその他検査成績を総合的に考え、遺伝子検査成績が疑わしい場合は対応を保留し、ウイルス分離検査を実施しなければならない。また、本試験により HA 遺伝子の多様性が改めて確認された。今後、継続的な AIV 遺伝子変異のモニタリングとともに、プライマー、プローブのアップデートを行っていく必要がある。

rPCR 結果の確認法について、rPCR+ 電気泳動は、rPCR 単独よりも高感度で、所要時間から cPCR の判定前に rPCR 結果の確認が可能であり、rPCR で出現した非特異反応の陰性判定が可能であった。このことから、rPCR 産物の電気泳動は非常に簡便でありながら、rPCR で得られた結果の信頼性向上や検査感度の上昇に

繋がる方法となり得ることが示唆された。一方、rPCRの反応生成物を電気泳動に供することは、反応生成物に直接触れることなく、反応の有無を判定でき、反応生成物による実験室内コンタミネーションを引き起こさないというrPCRの長所を損なう手法であることから、実際の運用においては実験室内コンタミネーションを起こさないための十分な配慮が必要である。

今回の成績は、正確なHPAIの診断に資する非常に重要な知見である。迅速かつ的確な防疫対応を行うために、診断検査時に起こり得る偽陽性や偽陰性などの想定されるリスクについての情報が共有されることが肝要と考える。

稿を終えるにあたり、Chiba/H3株のシーケンス情報を教授いただき、本研究に助言、指導をいただいた動物衛生研究所インフルエンザ・プリオン病研究センター 金平克史博士並びに西藤岳彦センター長に深謝する。

引用文献

- [1] Mase M, Tsukamoto K, Imada T, Imai K, Tanimura N, Nakamura K, Yamamoto Y, Hitomi T, Kira T, Nakai T, Kiso M, Horimoto T, Kawaoka Y, Yamaguchi S : Characterization of H5N1 influenza A viruses isolated during the 2003-2004 influenza outbreaks in Japan, *Virology*, 332, 167-176 (2005)
- [2] 岡松正敏, 西藤岳彦, 真瀬昌司, 塚本健司 : 茨城県発生の弱毒ウイルスによる鳥インフルエンザ, 鶏病研究会報, 42, 1-4 (2006)
- [3] 後藤俊郎 : 宮崎県における高病原性鳥インフルエンザの発生と防疫, 鶏病研究会報, 43, 1-7 (2007)
- [4] 都筑智子, 清水ひろみ : 茨城県で発生した高病原性鳥インフルエンザ (弱毒タイプ) についての一考察, 鶏病研究会報, 43, 89-96 (2007)
- [5] Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S : Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006, *Vet Microbiol*, 124, 35-46 (2007)
- [6] Sugiura K, Yamamoto M, Nishida T, Tsukamoto D, Saito T, Onodera T : Recent outbreaks of avian influenza in Japan, *Rev Sci Tech*, 28, 1005-1013 (2009)
- [7] 伊藤裕和 : 愛知県におけるウズラの高病原性鳥インフルエンザの発生と対応, 鶏病研究会報, 45, 23-31 (2009)
- [8] 西藤岳彦, 内田裕子 : 2009年に愛知県で分離されたH7N6亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの解析, 鶏病研究会報, 45, 33-35 (2009)
- [9] Sakoda Y, Ito H, Uchida Y, Okamatsu M, Yamamoto N, Soda K, Nomura N, Kuribayashi S, Shichinohe S, Sunden Y, Umemura T, Usui T, Ozaki H, Yamaguchi T, Murase T, Ito T, Saito T, Takada A, Kida H : Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in the 2010-2011 winter season in Japan, *J Gen Virol*, 93, 541-550 (2012)
- [10] Guan Y, Peiris JS, Lipatov AS, Ellis TM, Dyrting KC, Krauss S, Zhang LJ, Webster RG, Shortridge KF : Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 8950-8955 (2002)
- [11] Swayne DE, Halvorson DA : *Influenza, Diseases of Poultry*, Saif YM, et al eds, 12th ed, 153-184, Blackwell Publ, Ames, Iowa (2008)
- [12] Lee MS, Chang PC, Shien JH, Cheng MC, Shieh HK : Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR, *J Virol Methods*, 97, 13-22 (2001)
- [13] Starick E, Römer-Oberdörfer A, Werner O : Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza A viruses (AIV), *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 47, 295-301 (2000)
- [14] Tsukamoto K, Ashizawa H, Nakanishi K, Kaji N, Suzuki K, Okamatsu M, Yamaguchi S, Mase M : Subtyping of avian influenza viruses H1 to H15 on the basis of hemagglutinin genes by PCR assay and molecular determination of pathogenic potential, *J Clin Microbiol*, 46, 3048-3055 (2008)
- [15] Das A, Suarez DL : Development and bench validation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction protocols for rapid detection of the subtypes H6, H9, and H11 of avian influenza viruses in experimental samples, *J Vet Diagn Invest*, 19, 625-634 (2007)
- [16] Monne I, Ormelli S, Salviato A, De Battisti C, Bettini F, Salomoni A, Drago A, Zecchin B, Capua I, Cattoli G : Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses, *J Clin Microbiol*, 46, 1769-1773 (2008)
- [17] Sidoti F, Rizzo F, Costa C, Astegiano S, Curtoni A, Mandola ML, Cavallo R, Bergallo M : Development of real time RT-PCR assays for detection of type A influenza virus and for subtyping of avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes, *Mol Biotechnol*, 44, 41-50 (2010)
- [18] Spackman E, Senne DA, Bulaga LL, Trock S, Suarez DL : Development of multiplex real-time RT-PCR as a diagnostic tool for avian influenza, *Avian Dis*, 47, 1087-1090 (2003)
- [19] Tsukamoto K, Noguchi D, Suzuki K, Shishido M, Ashizawa T, Kim MC, Lee YJ, Tada T : Broad detection of diverse H5 and H7 hemagglutinin genes of avian influenza viruses by real-time reverse transcription-PCR using primer and probe sets containing mixed bases, *J Clin Microbiol*, 48, 4275-4278 (2010)
- [20] Arafa AS, Selim AA, Hassan MK, Aly MM : Genetic characterization of variant strains of highly pathogenic avian influenza H5N1 that escaped detection by real-time reverse transcriptase-PCR diagnostic tests, *Avian Dis*, 54, 673-676 (2010)
- [21] 塚本健二 : H5及びH7亜型の鳥インフルエンザウイルスを検出するためのリアルタイムPCR, 鶏病研究会報, 49, 59-63 (2013)
- [22] 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル 高病原性鳥インフルエンザ, 96-123 (2006)

Comparison of Avian Influenzavirus Genetic Detection Assays and Verification
of Real-time PCR Results by Electrophoresis

Daisuke INOUE[†], Fumihiko YOSHINO, Yoichi MUKOHARA and Shigeru IWAMATSU

**Chuo Livestock Hygiene Service Center, Nagasaki Prefecture, 3118 Kaizu, Isahaya, 854-0063,
Japan*

SUMMARY

The sensitivity of genetic detection assays of avian influenza virus (AIV) was compared to show that real-time polymerase chain reaction (rPCR) was 10 to 10,000 times more sensitive than conventional PCR (cPCR). Nucleotide sequences of the primers and probes for AIV genetic detection assays were compared with influenza virus sequences registered to GenBank. A few mismatches between the nucleotide sequences of the primers and probes for the assays targeting the NP gene and those of the strains were observed. Several mismatches were observed in a case study targeting H5 genes, raising concern that sensitivity might be lower against several low pathogenic strains. Electrophoresis of an rPCR product was used for evaluation of the results, showing that it is rapid and sensitive enough to discriminate non-specific reaction caused in the rPCR assay. — Key words : Avian Influenza, Electrophoresis, Genetic Detection Assay, Mismatch, Sensitivity.

[†] *Correspondence to : Daisuke INOUE (Chuo Livestock Hygiene Service Center, Nagasaki Prefecture)*

3118 Kaizu, Isahaya, 854-0063, Japan

TEL 0957-25-1331 FAX 0957-25-1332 E-mail : inoued00@pref.nagasaki.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 569 ~ 574 (2015)