

Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法による新型インフルエンザウイルスおよび季節性 A 型インフルエンザウイルス (H1N1, H3N2) の迅速検出

広島県立総合技術研究所保健環境センター

重本 直樹 福田 伸治 高尾 信一 島津 幸枝
谷澤 由枝 桑山 勝 大原 祥子

(平成 21 年 11 月 9 日受付)

(平成 22 年 3 月 29 日受理)

Key words: influenza A (H1N1), influenza A (H3N2), 2009 influenza (H1N1),
reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)

要 旨

2009 年 4 月にメキシコ, アメリカで確認された豚由来の新型インフルエンザの迅速診断および季節性 A 型インフルエンザウイルスの判別を目的に Reverse Transcription (RT)-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの検出法を検討した. 新型インフルエンザウイルス A (H1N1) および季節性インフルエンザウイルス A ソ連型 (H1N1), A 香港型 (H3N2) の各 HA 遺伝子の遺伝子配列を基にプライマーを設計し, 新型, A ソ連型, A 香港型の検出系を構築した. 63°C で 40 分間の RT-LAMP 反応では, 各亜型および B 型インフルエンザウイルス, C 型インフルエンザウイルス, アデノウイルス, RS ウイルス, メタニューモウイルス, パラインフルエンザウイルスおよびライノウイルスとの交差反応は認められず, 新型, A ソ連型, A 香港型をそれぞれ特異的に検出できることが確認された. また, RT-LAMP 反応液に加えたエリオクロムブラック T により, 陽性検体の反応液の色は赤紫から青色に変化し, リアルタイム濁度測定装置を用いなくても陽性陰性の目視判別が容易であった. 新型インフルエンザの疑いで持ち込まれた 139 検体について今回構築した RT-LAMP 法とリアルタイム RT-PCR 法で新型インフルエンザウイルスの検出を試みたところ, RT-LAMP 法では, リアルタイム RT-PCR で新型インフルエンザウイルスが検出された 112 検体中 110 検体で検出され, ウイルス量が少なかった 2 検体はリアルタイム RT-PCR 法のみで検出された結果となった. また, リアルタイム RT-PCR 法で新型陰性となった 27 検体のうち 4 検体はウイルス分離およびコンベンショナル RT-PCR で A 香港型であったが, この 4 検体については A 香港型検出系の RT-LAMP でいずれも陽性となった.

以上の結果から, 今回構築した RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの迅速診断法は, 新型, A ソ連型, A 香港型インフルエンザの迅速な検出および判別が可能であることが示唆された.

[感染症誌 84: 431~436, 2010]

序 文

病原微生物の遺伝子学的検出には PCR 法やリアルタイム PCR 法が一般的に用いられるが, 近年はより迅速・簡便に遺伝子検出が可能な遺伝子増幅法が開発されている. これらの迅速検出法は短時間のうちに一

定温度で遺伝子を増幅 (等温遺伝子増幅法) するよう工夫されており, 我が国では Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法, Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) 法, および Transcription Reverse-Transcription Concerted (TRC) 法が一般化している. このうち LAMP 法は遺伝子増幅が進むとピロリン酸マグネシウムが産生され反応液が白濁することから, 濁度を測定することにより陽性陰性

別刷請求先: (〒734-0007) 広島市南区皆実町 1-6-29

広島県立総合技術研究所保健環境センター保健
研究部 重本 直樹

平成22年 7 月20日

Table 1 Primer sets for novel influenza A (H1N1) virus and seasonal influenza A (H1N1 and H3N2) viruses.

Primer	Sequences (5'-3')	Final concentration (μM)
Novel influenza A (H1N1)		
swF3	AATGTAACATTGCTGGCTG	0.2
swB3	TGTCTTGGGGAATATCTCAA	0.2
swFIP	CCACAAAGTAGGACCATGAGCTTTTATCCTGGGAAATCCAGAGT	1.6
swBIP	CAATGGAACGTGTTACCCAGGATTTTCCTTCAAATGATGACACTGAG	1.6
swLF	GCTGTGGAGAGTGATTCA	0.8
swLB	CGATTATGAGGAGCTAAGAGAG	0.8
Seasonal influenza A (H1N1)		
HuH1F3	TGGAACATGTTACCCAGG	0.2
HuH1B3	CCGTCAGCCATAGCAAAT	0.2
HuH1FIP	TCGAACCTCTCAAATGAAGATACTGTTTTTCATTTCGCTGACTATGAGGA	1.6
HuH1BIP	CCAAAGAAAGCTCATGGCCCTTTGTAAAACTGCTTTCCCCATT	1.6
HuH1LF	ACTCAATTGCTCCCTCAG	0.8
HuH1LB	AGTGTGAGCATCATGCTCCC	0.8
Seasonal influenza A (H3N2)		
HuH3F3	CCTTGATGGAGAAAAGTCA	0.2
HuH3B3	CGTTTTGAGTGACTCCAGTC	0.2
HuH3FIP	GCGTTCAACAAAAAGGTCCCATTTCCTAATAGATGCTCTATTGGGAGAC	1.6
HuH3BIP	GTTACCTTATGATGTGCCGATTTCTTCATTGTTAAACTCCAGTG	1.6
HuH3LF	TTGGAAGCCATCACACTGAG	0.8
HuH3LB	TCAC TAGTTGCCCTCATCCGG	0.8

の判定が容易にできる特徴がある。これまでに RNA ウイルスであるウエストナイルウイルス¹⁾, SARS コロナウイルス²⁾, デングウイルス³⁾, ノロウイルス⁴⁾, 日本脳炎ウイルス⁵⁾⁶⁾, 風疹ウイルス⁷⁾, チクングニアウイルス⁸⁾およびリフトバレー熱ウイルス⁹⁾¹⁰⁾などを検出するための Reverse Transcription (RT)-LAMP 法(逆転写反応と遺伝子増幅反応を同時に行う)が報告されている。こうした中, 2009 年 4 月以降の新型インフルエンザ A (H1N1) のパンデミック¹¹⁾を契機に, インフルエンザウイルスの鑑別・迅速診断のための検出法開発が必要視された。これまでにインフルエンザウイルスの RT-LAMP 法の報告¹²⁾¹³⁾はあるが, 新型を含めた A 型インフルエンザウイルスの亜型まで判別できる検出系は報告されていない。今回我々は, 迅速・簡易で視覚的に陽性陰性の判定が可能な RT-LAMP 法を適用し, 市販の RNA 増幅試薬キットを基礎反応液とした新型インフルエンザウイルス (H1N1) 検出用 RT-LAMP 法の構築を試みた。また同時に, 季節性インフルエンザとして毎年流行する A ソ連型 (H1N1) および A 香港型 (H3N2) インフルエンザウイルス検出用 RT-LAMP 法の構築も併せて行った。

材料と方法

1. 供試検体

RT-LAMP 法の特異性を確認するため, 2009 年に患者から採取され, MDCK 細胞によるウイルス分離と RT-PCR 法によりウイルスが確認された咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液(以下, 臨床検体と略す)について新型, A ソ連型, A 香港型の陽性検体を各 10

検体, B 型インフルエンザウイルス陽性検体を 5 検体用いた。加えて, 分離株の判別への有用性も併せて確認する目的でウイルスを感染させた細胞の培養上清について, A ソ連型, A 香港型を各 10 検体, B 型インフルエンザウイルスを 5 検体, C 型インフルエンザウイルス, アデノウイルス, RS ウイルス, メタニューモウイルス, パラインフルエンザウイルス, ライノウイルスを各 2 検体用いた。さらに, 実際の臨床検体での RT-LAMP 法の有用性を確かめるために 2009 年 6 月から 9 月までに新型インフルエンザ疑いの患者から採取された咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液 139 検体を用いた。

2. プライマーの設計

新型, A ソ連型および A 香港型の HA 遺伝子をターゲットとしてプライマーの設計を行った。プライマーの設計はプライマー設計支援ソフト PrimerExplorer ver. 3 (<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>)を活用して行った。新型, A ソ連型および A 香港型インフルエンザの検出に用いたプライマー配列を Table 1 に示した。

3. RT-LAMP 反応

RT-LAMP 反応は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) により RNA 抽出後, RNA 増幅試薬キット(栄研化学)を用いて行った。すなわち, 2×Reaction mix. 12.5μL, Enzyme mix. 1μL, Table 1 に示す最終濃度の 6 プライマー, 0.025% エリオクロムブラック T(シグマアルドリッチ ジャパン)0.5μL および RNA 抽出液 2μL を含む 25μL 系で実施した。反応条件は

Table 2 RT-LAMP assay evaluation in clinical specimens and culture fluid

Specimen	Virus isolation and RT-PCR assay results	RT-LAMP assay results			
		novel influenza A (H1N1)	influenza A (H1N1)	influenza A (H3N2)	negative
Clinical specimen ^a	novel influenza A (H1N1)	10	0	0	0
	influenza A (H1N1)	0	10	0	0
	influenza A (H3N2)	0	0	10	0
	influenza B	0	0	0	5
Culture fluid	influenza A (H1N1)	0	10	0	0
	influenza A (H3N2)	0	0	10	0
	influenza B	0	0	0	5
	other ^b	0	0	0	12

^athroat and nasal swabs^binfluenza C virus, adenovirus, respiratory syncytial virus, metapneumovirus, parainfluenza virus, and rhinovirus

63℃, 40 分とした. 判定は反応液中に生成されるピロリン酸マグネシウムの濁度をリアルタイム濁度測定装置 LA-320C (テラメックス) で測定するとともに, 反応終了後に反応液中のエリオクロムブラック T の色調変化を観察することにより行った. また, 一部については増幅産物を確認するため 3% アガロースゲルにより電気泳動を行った.

4. RT-LAMP 法の検出限界の測定

新型については HA 遺伝子の塩基 111-549 の範囲の PCR 産物を QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) を用いて pDrive クローニングベクター (QIAGEN) にライゲーションし, コンピテントセル DH5α (TOYOBO) にトランスフォーメーションを行った. そして, 大腸菌から目的の遺伝子断片を有するプラスミド DNA を MonoFas プラスミド抽出キット III (ジエールサイエンス) を用いて精製し, MEGAscript (Ambion) により RNA を作製した. 作製した RNA は吸光度を測定してコピー数を算出し, 滅菌蒸留水で段階希釈したものをテンプレートに RT-LAMP 反応を行って検出限界を求めた. A ソ連型, A 香港型についてはそれぞれウイルス分離株 3 検体から抽出したウイルス RNA のゲノムコピー数をリアルタイム PCR で測定後, 滅菌蒸留水で 10 倍段階希釈シリーズを作製し, これをテンプレートに RT-LAMP 反応を行って検出限界を算定した. A ソ連型, A 香港型のウイルスゲノムコピー数は, 国立感染症研究所から示された「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ (2009 年 11 月 ver. 2)」のリアルタイム PCR 法に従って実施した. なお, A ソ連型については HA 遺伝子の塩基 1-724 を組み込んだプラスミドを, A 香港型については HA 遺伝子の塩基 1-1141 を組み込んだプラスミドをスタンダードとして用いた.

5. リアルタイム RT-PCR 反応およびコンベンショナル RT-PCR 反応

新型ウイルスのリアルタイム RT-PCR 法と新型, A

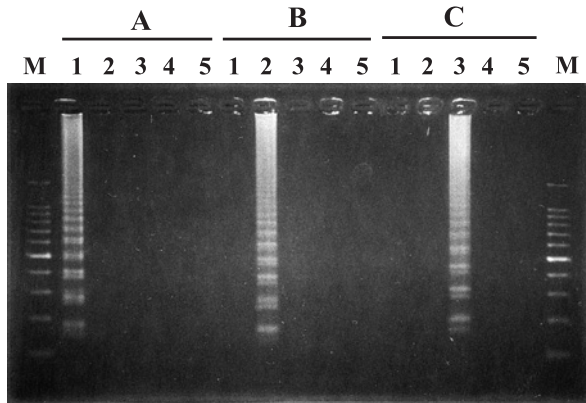
ソ連型, および A 香港型の RT-PCR 法は, 「新型インフルエンザウイルス検査対応指針と検体輸送ガイドライン (5 月 3 日: 暫定版 国立感染症研究所)」に基づき, 国立感染症研究所から示された「病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ (2009 年 5 月 ver. 1)」に従った. 新型ウイルスのリアルタイム RT-PCR 反応は, HA 遺伝子検出用プライマーとプローブを用いた TaqMan Probe 法により実施し, QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) と LightCycler 480 (Roche) を用いて行った. なお, 新型インフルエンザの疑いで持ち込まれた検体からのウイルス検出における RT-LAMP 法とリアルタイム RT-PCR 法の比較では, 同一検体から抽出した RNA を用い, 両方法を平行して行った. その際新型陰性になった検体については, RT-PCR 法および MDCK 細胞によるウイルス分離により季節性インフルエンザウイルスの判別を行った.

成 績

1. インフルエンザウイルス亜型別の RT-LAMP 反応特異性

新型陽性の臨床検体 10 検体, A ソ連型および A 香港型については, 陽性の臨床検体各 10 検体と MDCK 細胞の培養上清各 10 検体を用いて RT-LAMP を行った. すべての検体から新型, A ソ連型, A 香港型それぞれの検出系において該当する亜型で遺伝子増幅の陽性反応を示すピロリン酸マグネシウムの白濁が観察され, ウイルス分離および RT-PCR の同定結果と一致した (Table 2). ピロリン酸マグネシウムの産生をモニターするリアルタイム濁度測定装置による増幅曲線は概ね 10 分から 20 分で立ち上がり始め, 40 分以内には遺伝子の検出が可能であった. また, リアルタイム濁度測定装置で陽性を示した検体はすべて反応後にエリオクロムブラック T の色調が赤紫色から青色に変化し, 目視によっても陽性陰性の判断が容易であった. 新型, A ソ連型および A 香港型の陽性反応

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-LAMP product. Detection of (A), novel influenza A (H1N1); (B), seasonal influenza A (H1N1); (C), seasonal influenza A (H3N2). Lane M, 100bp ladder; Lane 1, novel influenza A (H1N1); Lane 2, seasonal influenza A (H1N1); Lane 3, seasonal influenza A (H3N2); Lane 4, influenza B; Lane 5, negative control.



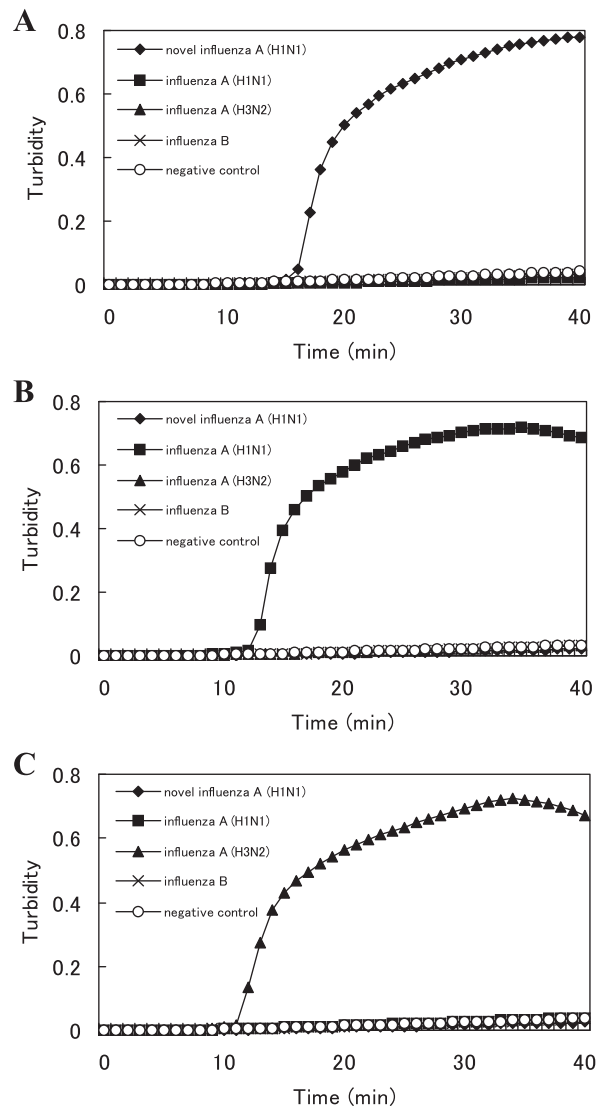
液の電気泳動像は LAMP 法に特徴的な増幅 DNA バンドが認められ、特異性が確認された (Fig. 1). また、他の亜型および B 型インフルエンザとの交差反応はリアルタイム濁度測定による増幅曲線および増幅産物の電気泳動結果からも認められなかった (Fig. 1, 2). 同様に、C 型インフルエンザウイルス、アデノウイルス、RS ウイルス、メタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルスおよびライノウイルスについても新型、A ソ連型および A 香港型それぞれの検出系において交差反応は認められなかった。

2. RT-LAMP 法におけるインフルエンザウイルス遺伝子の検出限界

HA 遺伝子由来の陽性コントロール RNA を用いて新型の RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出限界コピー数を確認したところ、反応あたり約 2.5×10^2 コピーまで検出可能であった。一方、A ソ連型および A 香港型のウイルス分離株から抽出した RNA の 10 倍段階希釈シリーズを使って A ソ連型および A 香港型検出系の検出限界を調べたところ、それぞれ 10^2 希釈、 10^3 希釈において供試した 3 検体すべてから検出できた。各亜型 3 検体の検出感度のうち、最も検出感度が低かった検体の反応あたりのウイルスゲノムコピー数は A ソ連型で 1.1×10^5 コピー、A 香港型で 4.4×10^5 コピーであった。なお、同じ 10 倍段階希釈シリーズについて、リアルタイム PCR を応用したところ、A ソ連型では 10^2 希釈、A 香港型では 10^3 希釈まで検出可能であり、RT-LAMP 法はリアルタイム PCR に対しほぼ同等であった。

3. 新型インフルエンザウイルス疑い患者の臨床検体からのウイルス検出

Fig. 2 Evaluation of RT-LAMP cross-reactivity among novel influenza A (H1N1), seasonal influenza A (H1N1 and H3N2), and influenza B viruses. (A), novel influenza A (H1N1); (B), seasonal influenza A (H1N1); (C), seasonal influenza A (H3N2).



2009 年 6 月から 9 月までに当センターへ持ち込まれた新型インフルエンザ疑いの 139 検体について RT-LAMP 法とリアルタイム RT-PCR 法による新型インフルエンザウイルスの検出を行った。RT-LAMP 法では 139 検体のうち 110 検体が陽性、リアルタイム RT-PCR 法では 139 検体のうち 112 検体が陽性であった (Table 3) が、両法に有意差は認められなかった (McNemar テスト, $P=0.50$)。RT-LAMP 法で陽性となった検体のリアルタイム RT-PCR での増殖曲線の立ち上がりポイント (Ct 値) は 15.7~40.6 であった。一方、RT-LAMP 法で陰性、リアルタイム RT-PCR 法で陽性となった 2 検体のリアルタイム RT-PCR の Ct 値は 39.1 と 41.6 で、リアルタイム RT-PCR での定

Table 3 Comparison of RT-LAMP and real-time RT-PCR assays for detecting novel influenza A (H1N1) virus.

		RT-LAMP assay	
		Positive	Negative
Real-time RT-PCR assay	Positive	110	2
	Negative	0	27

量値はそれぞれ 36.6, 122.0 コピー/反応であった。また、リアルタイム RT-PCR で新型インフルエンザ陰性となった 27 検体の中には RT-PCR および MDCK 細胞を用いたウイルス分離法で A 香港型陽性となった検体が 4 検体あったが、これらは A 香港型検出系の RT-LAMP 法でいずれも陽性となった。今回 RT-LAMP 法で陽性となった検体の増殖曲線は 10~25 分程度で立ち上がり始め、40 分以内に判定が可能であった。検体の RNA 抽出から遺伝子検出までの全工程に要する検査時間は 2 時間以内であった。

考 察

今回我々が構築した RT-LAMP 法を新型、A ソ連型、A 香港型の臨床検体（咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液）および細胞培養上清に適用したところ、ウイルス分離および RT-PCR との結果と完全に一致し、他のウイルスとの交差反応は認められなかったことから各検出系において迅速・簡易に、かつ亜型を特異的に判別できることが確認された。LAMP 法では遺伝子増幅の副産物であるピロリン酸マグネシウムの濁度を測定装置あるいは目視で検出するか、反応液の特異的な電気泳動パターンを確認することにより行われるが、今回、我々は増幅反応指示薬としてエリオクロムブラック T を反応液に加えることにより、遺伝子増幅の有無を反応液の色の変化で容易に目視確認できることを明らかにした。これは反応液中の Mg^{2+} イオンがエリオクロムブラック T とキレート化合物を形成するため最初は赤紫色であるが、遺伝子の増幅過程でピロリン酸マグネシウムが生成するため Mg^{2+} イオンが減少し、遊離したエリオクロムブラック T によって青色に変化することによるものである。本法の検出感度は、新型の場合、反応あたりウイルスゲノム 2.5×10^2 コピーで、これは、先に Fukuda ら⁴⁾の報告にあるノロウイルスの RT-LAMP 法の検出感度と同程度であった。一方、A ソ連型、A 香港型の検出感度は反応あたりそれぞれ 1.1×10^5 , 4.4×10^5 コピーであるが、検体によっては 10^4 コピーでも検出できるケースがあった。A ソ連型、A 香港型の検出感度は新型に比べ劣ったが、原ら¹⁴⁾は、インフルエンザ患者の鼻汁および咽頭ぬぐい液の臨床検体に含まれるインフルエンザウイルス量は 10^7 から 10^{10} コピー/mL であることを

報告しており、臨床検体からの検出には十分な感度であることが示唆された。

2009 年 6 月から 9 月の間に搬入された新型インフルエンザ疑い検体の RT-LAMP 法による新型インフルエンザウイルス検出結果は、ウイルス量が反応あたり 36.6, 122.0 コピーであった 2 検体を除き、リアルタイム RT-PCR 法による検出結果と一致したことから、RT-LAMP 法による臨床検体からの新型インフルエンザウイルス検出の信頼度は非常に高いと考えられた。

2009 年 4 月にメキシコおよびアメリカで確認された新型インフルエンザウイルスが 2009 年 5 月に日本でも最初に確認されて以来、各自治体においても新型インフルエンザウイルスの検査体制の確立が急務となった。検査手法としては RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法が主要な検査法として行われているが、高額な装置が必要であると同時に、手技に熟練を要している。今回我々が確立した新型インフルエンザおよび季節性インフルエンザウイルス遺伝子検出用の RT-LAMP 法は、迅速性と操作の簡便性の観点から病院、保健所でも十分に利用が可能であると考えられる。そして、RNA 抽出から判定までを 2 時間以内で行うことができるため、医療現場における診断、治療の補助として非常に有用であると思われる。

文 献

- 1) Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K : Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 257—63.
- 2) Thai HTC, Le MQ, Vuong CD, Parida M, Minekawa H, Notomi T, *et al.* : Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 1956—61.
- 3) Parida M, Horioka K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, *et al.* : Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 2895—903.
- 4) Fukuda S, Takao S, Kuwayama M, Shimazu Y, Miyazaki K : Rapid detection of norovirus from fecal specimens by real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 1376—81.
- 5) Toriniwa H, Komiya T : Rapid detection and quantification of Japanese encephalitis virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol* 2006 ; 50 : 379—87.

- 6) Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Saxena P, Ambuj S, *et al.* : Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 4172—8.
- 7) Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, *et al.* : Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 3268—73.
- 8) Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, *et al.* : Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 2007 ; 45 : 351—7.
- 9) Peyrefitte CN, Boubis L, Coudrier D, Bouloy M, Grandadam M, Tolou HJ, *et al.* : Real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Rift Valley fever virus. *J Clin Microbiol* 2008 ; 46 : 3653—9.
- 10) Le Roux CA, Kubo T, Grobbelaar AA, Jansen van Vuren P, Weyer J, Nel LH, *et al.* : Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2009 ; 47 : 645—51.
- 11) Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, *et al.* : Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009 ; 325 : 197—201.
- 12) Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, Ihara T, Okuno Y : Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification : Comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods* 2006 ; 135 : 272—5.
- 13) Poon LLM, Leung CSW, Chan KH, Lee JHC, Yuen KY, Guan Y, *et al.* : Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 427—30.
- 14) 原三千丸, 貞升健志, 高尾信一, 新開敬行, 甲斐明美, 福田伸治, 他 : リアルタイム PCR 法との比較による A 型および B 型インフルエンザ迅速診断キットの評価. *感染症誌* 2006 ; 80 : 522—6.

Rapid Detection of Novel Influenza A Virus and Seasonal Influenza A (H1N1, H3N2) Viruses
by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

Naoki SHIGEMOTO, Shinji FUKUDA, Shinichi TAKAO, Yukie SHIMAZU, Yukie TANIZAWA,
Masaru KUWAYAMA & Sachiko OHARA

Center for Public Health and Environment, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute

Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay we developed detects novel influenza A (H1N1) of swine origin and seasonal influenza A (H1N1 and H3N2) viruses. Individual primer sets targeting the HA gene for novel H1N1, H1N1, and H3N2 were newly designed to specifically detect these subtypes. No cross-reactions occurred among novel H1N1, H1N1, and H3N2, and 7 respiratory viruses—influenza B virus, influenza C virus, adenovirus, respiratory syncytial virus, metapneumovirus, parainfluenza virus, and rhinovirus—had no reaction to 3 RT-LAMP assays. RT-LAMP is assayed at 63°C for 40 min. In our RT-LAMP assay, Eriochrome Black T was added to the reaction mixture as an amplification indicator to detect virus genomes without using real-time turbidimetry. Positive reactions were indicated in blue and negative reactions remained purple. Of 139 samples from suspected novel H1N1 subjects tested by both RT-LAMP and real-time RT-PCR assay, 110 were positive in both assays. Two samples with low copy numbers were positive only in real-time RT-PCR assay. Of 27 novel negative H1N1 samples, 4 were positive for H3N2 on viral isolation and conventional RT-PCR assay. RT-LAMP assay for detecting H3N2 obtained the same findings.

Our RT-LAMP assay is thus potentially useful in rapidly detecting influenza A virus such as novel H1N1, H1N1, and H3N2.