

事 務 連 絡

平成25年8月23日

各〔 都 道 府 県 〕
〔 保 健 所 設 置 市 〕 衛生主管部（局）
〔 特 別 区 〕 感染症対策担当課 御中

厚生労働省健康局結核感染症課

抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスの継続について（依頼）

インフルエンザウイルスサーベイランスにおいては、平成23年3月31日付け厚生労働省結核感染症課長通知「インフルエンザに係るサーベイランスについて」に基づき、実施いただいているところですが、先般、国立感染症研究所より、昨シーズンに引き続き、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施することについて、別紙1のとおり地方衛生研究所あてに周知されたところです。

都道府県等におかれましては、引き続きウイルスサーベイランス体制の整備に御協力いただきますよう、よろしく申し上げます。

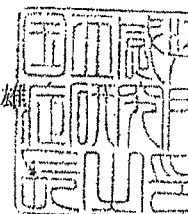
なお、保健所において、検体を採取される際には、別紙2の様式において服薬等の履歴を確認いただきますよう重ねてお願い申し上げます。

また、基幹定点医療機関においてインフルエンザ入院サーベイランスを実施しておりますが、当該医療機関の入院患者から耐性株が検出された場合もインフルエンザ定点医療機関の検体に準じて、国立感染症研究所への情報提供及びウイルス提出等のご協力をお願いします。

各地方衛生研究所 所長 殿

平成25年8月20日

国立感染症研究所 所長 渡邊 治雄



「2013/2014 シーズン インフルエンザウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス実施のお願い」

日頃よりインフルエンザウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスにご協力いただきましてありがとうございます。

平成 21 年 9 月に開始した抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスは、2010/2011 シーズンには 47 都道府県の 71 地衛研にまで拡大し、日本国内における薬剤耐性株の監視体制が確立されました。サーベイランスにより得られた耐性株の検出情報は、感染症疫学センター IASR ウェブサイトにおいて毎月更新され、医療機関等に適宜情報を提供することで、インフルエンザ株サーベイランス事業として社会に大きく貢献しています。地方衛生研究所の皆様方には重ねて感謝申し上げます。

平成 25 年 6 月 7 日に策定された新型インフルエンザ等対策特別措置法に基づく「新型インフルエンザ等対策政府行動計画」において、平時における薬剤耐性株サーベイランスの必要性が明示され、地衛研と感染研によるサーベイランスが益々重要視されております。そこで 2013/14 シーズンも引き続き、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施いたします。

つきましては、別紙実施要綱、別添「解析株一覧」および別途、感染症疫学センターから配布される「入力の手引き」に従って、耐性株の検出と報告をしていただきますようお願い申し上げます。

なお、耐性株が検出された際には、インフルエンザウイルス研究センターにおいて引き続き薬剤感受性試験を実施いたしますので、分与依頼書に基づいて耐性株の分与をお願い申し上げます。

別紙

2013/2014 シーズン インフルエンザウイルスの 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス実施要綱

[目的]

インフルエンザウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株の検出および流行状況を継続的に監視し、国や自治体、医療機関および WHO へ迅速に情報を還元し、インフルエンザ対策の一助とする。

[背景]

日本は世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であり、薬剤耐性株の検出状況を迅速に把握することは公衆衛生上非常に重要である。また、新型インフルエンザ等対策特別措置法に基づく「新型インフルエンザ等対策政府行動計画」にも平時における薬剤耐性株サーベイランスの必要性が明示されている。

2009年9月に開始した A(H1N1)pdm09 ウイルスの薬剤耐性株サーベイランスは、2010/2011 シーズンには 47 都道府県の 71 地衛研に拡大し、日本国内における A(H1N1)pdm09 耐性株の監視体制が確立された。一方、2010/2011 および 2011/2012 シーズンには、日本国内で薬剤耐性 A(H3N2) ウイルスが検出され、A(H1N1)pdm09 以外の流行ウイルスに対する薬剤耐性株サーベイランスの重要性が明らかになった。

そこで 2013/2014 シーズンは、A(H1N1)pdm09 分離株について引き続き地衛研で H275Y 耐性マーカの検出を実施すると共に、A(H3N2) および B 型分離株について感染研で薬剤感受性試験を実施し、薬剤耐性株の監視体制を強化する。

[実施要領]

- 検体採取年月日が 2013 年 9 月 1 日以降のウイルス株を対象とする。
- 薬剤感受性試験結果は毎週、NESID の病原体検出情報システム「感染研でのインフルエンザ HI 試験結果 還元データダウンロード」にアップロードされる。
- 集計結果は毎月、感染症疫学センター IASR ウェブサイト「抗インフルエンザ薬耐性株検出情報」(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr-inf.html#taiseikabu>)において検体採取週別、報告機関別に公表される。

A(H1N1)pdm09 ウイルス

1. 2013/2014 シーズン薬剤耐性株サーベイランスに用いる検体

- 解析株は原則的に、ウイルスサーベイランスに基づくインフルエンザ病原体定点医療機関からの検体を中心にして、無作為抽出する。インフルエンザ入院サーベイランスに基づく検体あるいは薬剤耐性疑い例など医療機関からの検査依頼検体を解析株に含む場合は、別添「解析株一覧」にその旨記載する。
- TaqMan RT-PCR 法では検出感度を保証するために、原則的に HA 価が 8 程度以上のウイルス培養上清を使用する。RNA 抽出は不要であり、ウイルス培養上清を遠心して細胞由来成分を除去し、滅菌蒸留水で 10 倍希釈したものを 2 μ l 使用する。凍結保存されている

ウイルス培養上清に関しては、融解後に遠心して同様に使用する。

- 継代を行っても HA 価が 8 程度以上に上がらない株の場合は、亜型同定のための RT-PCR に使用した精製 RNA 2 μ lを使用してもよい。
- 鼻腔拭い液などの臨床検体を使用する場合には、RNA を抽出し、その抽出液を 2 μ l 使用するが、検体中に含まれるウイルス量が非常に少ない例があるため、検出感度は保証されない。
- 解析する株数は、毎週概ね 3 株を目標値として、月毎にまとめて解析を実施してもよい。

2. A(H1N1)pdm09 ウイルス NA 遺伝子上の H275Y 耐性マーカーの同定

- H275Y 耐性マーカーの同定は、感染研から配布済みの「A/H1N1pdm09 H275Y 耐性株検出法実験プロトコール ver.2」に従って、TaqMan RT-PCR 法により実施する。
- TaqMan RT-PCR に用いる RT-PCR 反応試薬は、2011/2012 シーズンに感染研から配布されたものを引き続き使用する。感染研において同ロットの試薬の有効性を検証済みである。
プライマー & プローブミックスは 5,000 検体分を配布済みであるため、追加の配布は行わない。
- NA 遺伝子部分シーケンス法を採用する場合は、従来のマニュアルに従って実施する。ただし、シーケンス結果の波形を確認し、明らかに 823 番目の塩基部分に C (275H) と T (275Y) の波形の重複が見られた場合は、275H/Y mixture と判定する。
- シーケンスに用いる反応試薬およびプライマーは、地衛研で準備する。

3. TaqMan RT-PCR 法に使用する試薬

解析に用いる PCR 機種に応じた RT-PCR 試薬を使用する。

- QuantiTect Virus + ROX Vial Kit を使用する機種
 - Roche Light Cycler 480
 - Agilent MX3000P, Agilent MX3005P
 - ABI 7500, ABI 7500Fast
 - BioRad CFX96
- QuantiTect Virus Kit を使用する機種
 - ABI 7900HT
 - ABI StepOne, ABI StepOnePlus
 - ABI 7300
 - ABI 7000

4. TaqMan RT-PCR 法での結果判定

- 各 PCR 機器用 Software 中の「Allelic Discrimination 解析」を利用する(各機器の操作マニュアル参照)。
- 反応終了時の蛍光強度をグラフにプロットし、プロットの位置から、Y275 (耐性株)、H275 (感受性株)、Mix (Y275 と H275 の混合株)、Undetermined と判定する(実験プロトコール参照)。

5. 結果報告とウイルス株の送付

- H275Y 耐性マーカーが同定された場合および 275H/Y mixture あるいは Undetermined と判定された場合は、下記担当者へ速やかに連絡し、感染研からの分与依頼に基づいて送料着払いでウイルス株を送付する。感染研では送付されたウイルス株について速やかに薬剤感受性試験を行い、結果を直ちに当該地衛研に報告する。
- H275Y 耐性マーカーの有無等の解析結果情報については、感染症疫学センターから別途配布される「入力の手引き」を参照し、個々のウイルス株に関して NESID への追加入力を行う。
- 月毎の解析結果は、感受性株を含めたすべての解析株について感染研から配布される別添「解析株一覧」に記入し、その月末までにメールで下記担当者へ送付する。

A(H3N2)および B 型ウイルス

1. A(H3N2) および B 型ウイルスでは、インフルエンザ診断マニュアル第 2 版 (http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza_2003.pdf) に記載があるように、複数の耐性マーカーが報告されているが、A(H1N1)pdm09 ウイルスにおける H275Y 変異のような代表的な耐性マーカーが存在しないため、薬剤感受性試験によってのみ耐性の判定が可能である。薬剤感受性試験には分離株を用いるため、ウイルス分離が必須となる。
2. 通常の分与依頼に基づいて感染研に送付された A(H3N2)および B 型分離株すべてについて薬剤感受性試験が実施される。
3. NA 遺伝子シーケンスにより、既知の耐性マーカーを検出した場合は、下記担当者へ速やかに連絡し、感染研からの分与依頼に基づいて送料着払いでウイルス株を送付する。感染研では送付されたウイルス株について速やかに薬剤感受性試験を行い、結果を直ちに当該地衛研に報告する。

ウイルス株の送付および薬剤耐性株サーベイランスに関するお問い合わせは

国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター第一室
薬剤耐性株サーベイランス担当 高下恵美 までご連絡ください。

E-mail: emitaka@nih.go.jp

TEL: 042-848-7163/7164 FAX: 042-561-6149

以上、ご協力をよろしくお願いいたします。

インフルエンザウイルス研究センター長 田代眞人
第一室長 小田切孝人

<参考資料>

1. 検査コスト(100反応分、プライマーは除く)

- TaqMan RT-PCR 法
 - QuantiTect Virus +ROX Vial Kit あるいは QuantiTect Virus Kit
 - TaqMan MGB プローブ

使用の場合で、約 28,000 円

- NA 遺伝子部分シーケンス法
 - QIAamp Viral RNA Mini Kit
 - TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)
 - QIAquick PCR Purification Kit
 - BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit
 - BigDye X Terminator 精製キット

使用の場合で、約 190,000 円

2. TaqMan RT-PCR 法で PCR 機器に関する問題が生じた場合の連絡先

- <ABI>テクニカルサポート
E-Mail: jptechsupport@appliedbiosystems.com
TEL: 0120-477-392 FAX: 0120-477-120, 03-5566-6538
- <Roche>コールセンター
E-Mail: tokyo.biochemicals@roche.com
TEL: 03-5443-5287 FAX: 03-5443-7098
- <Agilent>お客様窓口
E-Mail: email_japan@agilent.com
TEL: 0120-477-111 FAX: 0120-565-154

3. TaqMan RT-PCR 法で技術的問題が生じた場合の問い合わせに際して必要となるファイル

- Roche Light Cycler 480
「.ixo」ファイル1つ
- Agilent MX3000P、Agilent MX3005P
「.MxPro」ファイル1つ
- ABI 7500、ABI 7500Fast、ABI 7300、ABI 7000 Software v1.X
「.sds」ファイル3つ (Pre-Read、Amplification、Post-Read)
- ABI 7500、ABI 7500Fast Software v2.X
「.eds」ファイル1つ
- ABI 7900HT
「.sds」ファイル3つ (Pre-Read、Amplification、Post-Read)
- ABI StepOne、ABI StepOnePlus
「.eds」ファイル1つ

一類感染症、二類感染症、三類感染症、四類感染症、五類感染症、新型コロナウイルス等感染症及び指定感染症検査票(病原体)

患者	性別 (男・女)	年齢 (歳 月)	指定医療機関の場合は該当するものを○で囲んでください
主治医等記載欄	・インフルエンザ定点 ・小児科定点 ・眼科定点 ・性感染症定点 ・基幹定点		
医療機関等名及び主治医等医師名(記載者)	年 月 日 分離株(無、有、検査中)		
検体送付日	年 月 日		
診断日	年 月 日		
発病日	年 月 日		
採取日	年 月 日		
検体採取日	年 月 日		
検査材料の種類	・鼻液 ・尿 ・穿刺液(腹水、胸水、関節液、その他)) ・吐物 ・喀痰 ・気管吸引液 ・皮膚病巣(水疱内容、痂皮、創傷) ・咽頭ぬぐい液(うがい液、鼻汁) ・結膜ぬぐい液(結膜擦過物、眼脂) ・細胞診、生検、剖検材料(臓器) ・血液(全血、血清、血漿、血漿、抗凝固剤) ・その他 ()		
臨床徴候等	・無症状 ・頭痛 ・発熱(最高 ℃) ・頸性けいれん ・関節痛(関節炎)、筋肉痛 ・口内炎 ・上気道炎(咽頭炎/痛、扁桃炎) ・下気道炎(肺炎、気管支炎) ・水疱 ・発疹(丘疹、紅斑、バラ疹) ・出血傾向 ※全身性のもの ・リンパ節腫脹(部位)、唾液腺腫脹、 浮腫(部位) ・ショック症状(低血圧、循環不全) ・その他の症状(上記以外の症状や臨床徴候)		
検査項目	・胃腸炎(下痢、血便、嘔吐、腹痛) ・角膜炎、結膜炎、角膜炎 ・髄膜炎、意識障害、麻痺(部位)、 中枢神経系症状(脳炎、脳症、脊髄炎、 その他) ・循環器障害(心筋炎、心不全) ・黄疸 ・腎機能障害 多尿、腎不全 ・尿路上生殖器症状(膀胱炎、尿道炎、外陰炎、 頸管炎)		
基礎疾患	経過観察中、軽快、治癒、後遺症有り、死亡(原因)		
転	経過観察中、軽快、治癒、後遺症有り、死亡(原因)		
主治医等から地方衛生研究所への連絡事項	*インフルエンザ迅速キット使用(無、有、メーカー名) *抗インフルエンザ薬投与(無、有、薬剤名) 投与開始日 年 月 日 [予防投与、治療投与]]:[陰性、陽性、保留]		

発生状況	散発 ・集団発生 (無、有) ・発生市区町村() 有の場合(保育所、幼稚園、小学校、中学校、高校、大学、宿舍・寮・寮、病院、 老人ホーム[介護施設を含む]、福祉・養護施設、旅館・ホテル、飲食店、 事業所、海外ツアー、国内ツアー、その他)
最近の海外渡航履歴	国名 期間 年 月 日 ~ 年 月 日 (無、有、不明) 最終接種年月日 年 月 日 ワクチン接種履歴 (Lot No.)
記載者名	地方衛生研究所記載欄 記載者名 抗体検出方法 (蛍光、IP、eLISA、CF、HI、PA、中和、イムノブロット、ゲル内沈降、凝集反応、 その他) ()
検出年月日	年 月 日 検出方法 (培養細胞、細胞名) () [菌株ごとの方法を ○で囲んで下さい]
病原体検出	・分離培養(培養細胞、動物、その他) () ・抗原検出(蛍光、BIA、RPHA、IA、PA、IC[イムノクロマト]、その他) () ・遺伝子検出 1.非増幅(ハイブリ)、PAGE、その他() 2.増幅(PCR、PCR+ハイブリ、PCR+シーケンス、LAMP、その他) () ・電顕 ・鏡検
検出病原体(群、型、亜型)	検出病原体 (群、型、亜型) [その他特記事項]

注1)主治医記載欄については、検体送付日において記載できる範囲で記載をお願いします。
 注2)ワクチン接種履歴については、当該疾患に係るものにつき記載して下さい。
 注3)医療機関(民間検査所を含む)で病原体を分離した場合、地方衛生研究所への分離株の送付をお願いします。