

化学発光酵素免疫測定法を用いたヒトパルボウイルス B19 抗原スクリーニングにおける遺伝子型検出の評価

坂田 秀勝¹⁾ 松林 圭二¹⁾ 武田 尋美¹⁾ 岸本 信一¹⁾ 伊原 弘美¹⁾
佐藤進一郎¹⁾ 加藤 俊明¹⁾ 田所 憲治²⁾ 池田 久實¹⁾

【背景】日赤では、輸血用血液や血漿分画製剤原料へのヒトパルボウイルス B19 (B19V) の混入を防止するため、化学発光酵素免疫測定法 (chemiluminescence enzyme immunoassay : CLEIA) による B19V 抗原スクリーニング検査を実施している。近年、B19V は 3 種の遺伝子型に分類されたため、米国食品医薬品局 (FDA) は、血漿分画製剤製造工程中の検査として、すべての遺伝子型が検出可能な核酸増幅検査を導入するよう勧告した。しかし、本邦で流行している B19V の遺伝子型や、CLEIA 法が B19V の遺伝子型すべてを検出可能かは不明である。【対象と方法】既報を改変した B19V ユニバーサル real-time PCR 法 (U-PCR 法) および CLEIA 法で、3 種類の B19V 遺伝子型を含む WHO パネルを測定し、それぞれの検出感度を評価した。また、過去 13 年間の北海道内献血者から検出された B19V 陽性検体 96 例を用いて、U-PCR 法による検出および遺伝子型を調査した。【成績】U-PCR 法および CLEIA 法のいずれの方法でも、3 種類の B19V が検出可能であった。U-PCR 法の検出感度は 1 型、2 型および 3 型に対して、それぞれ 13.6, 9.4 および 14.6 IU/ml 以上であった。また CLEIA 法の検出感度はいずれの遺伝子型についても約 6.3 \log_{10} IU/ml 以上と推測された。B19V 陽性 96 例全例が U-PCR 法で陽性となり、遺伝子型はすべて 1 型であった。【結論】CLEIA 法は 3 種類の B19V すべてを検出可能であった。また過去 13 年間に道内で検出された B19V は 1 型だけであった。

キーワード：ヒトパルボウイルス B19, 遺伝子型, 化学発光酵素免疫測定法, CLEIA 法, real-time PCR 法

はじめに

ヒトパルボウイルス B19 (B19V) は、小児における伝染性紅斑の原因ウイルスである。また溶血性貧血患者での赤芽球癆や妊婦での胎児水腫等、多様な臨床症状を呈することもよく知られている。B19V の主な感染ルートは飛沫感染であるが、B19V 感染者ではウイルス血症を呈するため、献血によって輸血用血液や血漿分画製剤原料に B19V が混入する可能性がある。また B19V はノンエンベロープウイルスで様々な不活化処理に抵抗性を示すため、分画原料血漿に大量に混入すると除去や不活化が困難であり、感染リスクとなる。日本赤十字社 (日赤) では 1997 年に receptor-mediated hemagglutination assay (RHA 法) による B19V スクリーニングを導入し¹⁾²⁾、これにより、輸血用血液や分画原料血漿への B19V 混入量は大幅に減少した³⁾⁴⁾。その後、欧米では分画製剤原料用プール血漿の混入 B19V DNA 量を 4 \log_{10} IU/ml 以下とする指針が出された⁵⁾⁶⁾。そこで、我々は富士レビオ社と共同で、更に高感度な B19V 抗原スク

リーニング用全自動検査システム CL4800 (化学発光酵素免疫測定法, chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA 法) を開発した⁷⁾。2008 年より全国の血液センターで、この CLEIA 法による B19V 抗原スクリーニングが導入されている。

一方、2005 年には B19V の遺伝子型は、これまでの原型である 1 型に加え、新たに 2 型および 3 型が同定され、3 種類に分類された⁸⁾。これに伴い FDA は 2009 年 7 月に上記の指針に加え、血漿分画製剤製造工程中の B19V 検査基準として、3 種類すべての B19V 遺伝子型が検出可能な核酸増幅検査 (nucleic acid amplification test : NAT) を導入するよう勧告した⁹⁾。分画原料血漿プールへの B19V 混入量を減少させる検査として、欧米では NAT を実施しているためである。また、現在市販されている B19V NAT 試薬の中には、B19V の 2 型および 3 型の検出感度や特異性に問題があるものも確認されている⁸⁾⁹⁾。このような状況下で、我々が使用している real-time PCR 法および CLEIA 法が、3 種類すべ

1) 北海道赤十字血液センター

2) 日本赤十字社血液事業本部

〔受付日：2010 年 12 月 16 日，受理日：2011 年 1 月 21 日〕

での B19V の検出が可能か否かの確認はまだ行われていない。また、これまで日本の献血者に検出された B19V を新しい遺伝子型別に調査した報告もない。したがって、これらの調査研究を行うことは、日本の B19V スクリーニングの妥当性を検証し、今後の B19V 感染防止対策を講じるために極めて重要である。

材料および方法

1. WHO B19V パネル

B19V ユニバーサル real-time PCR 法 (U-PCR 法) の評価には、ポール・エールリッヒ研究所の Dr. Sally Baylis より供与された WHO B19V パネル (NIBSC code : 09/110)¹⁰⁾ を使用した。これを構成する 3 種類のパネル Member 1 (M1), Member 2 (M2) および Member 3 (M3) の遺伝子型は各々 1 型, 2 型および 3a 型に対応しており、各パネルの B19V DNA 量は 5.98, 5.94 および 5.97 log₁₀IU/ml であった。一方、CLEIA 法を評価するためにはその感度から、少なくとも B19V DNA 量が約 6 log₁₀IU/ml を超える検体が必要であるため⁷⁾、この WHO B19V パネルでは CLEIA 法の評価はできない。そこで、この WHO B19V パネルと同一血漿由来の、より濃度の高い B19V パネル (M1S, M2S および M3S) も併せて供与された。このパネルの B19V DNA 量は後述の定量法により、各 8.28, 8.82 および 8.48 log₁₀IU/ml と算出された。

2. U-PCR 法の設定

U-PCR 法に用いたプライマー・プローブは Koppelman らの方法¹¹⁾ に準じて設定した。プライマーは、sense primer : EVF (5'-AATGCAGATGCCCTCCAC-3') と antisense primer : EVR (5'-GGACCAGTTCAGGAG AATCAT-3') を用いた。TaqMan プローブは、核酸融解温度 (T_m) を増大させ、特異性を高めるために使用していた locked nucleic acid (LNA) の代わりに、Minor Groove Binder (MGB) を導入し、配列は 5'(FAM)-AACCCGCGCTCTAGTAC-(MGB)3' とした。

実際の検査は、QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen 社) を用いて検体 200μl から溶出量 22μl でウイルス核酸を抽出し、増幅検出反応にはその 20μl (検体 182μl 相当) を用いた。前述のプライマー・プローブセットと増幅試薬 (2xFastStart Universal Probe Master (Rox), Roche Biochemicals 社) および AB7500 (Applied Biosystems 社) を使用し、50°C/2min, 95°C/10 min の後、95°C/15sec, 56°C/15sec, 72°C/1min を 50 サイクルで実施し特異蛍光を検出した。濃度の高い B19V パネル (M1S, M2S および M3S) の定量は、B19V 核酸定量キット (Roche Biochemicals 社) によりあらかじめ測定した B19V DNA 陽性検体 (約 12 log₁₀IU/ml) の 10 倍連続希釈液を定量用スタンダードとして、その

検量線から定量値を算出した。

3. U-PCR 法による各 B19V 遺伝子型の検出感度測定

WHO B19V パネル (M1, M2 および M3) を 5% BSA 含 PBS を用いて B19V DNA 量が 1.5, 1.0, 0.5, 0.0 log₁₀ IU/ml となるように希釈調製し、各パネルに対して U-PCR 法による B19V DNA 測定 (N=24) を実施した。検出感度 (検出率が 95% となる濃度) は、各希釈パネルの総試験回数 (24 回) において陽性となった回数からプロビット分析法を用いて算出した。

4. CLEIA 法による B19V 遺伝子型の検出

濃度の高い B19V パネル (M1S, M2S および M3S) を 5% BSA 含 PBS で 10 倍段階希釈し、3 濃度 (M1S : 7.28, 6.28 および 5.28 log₁₀IU/ml, M2S : 7.82, 6.82 および 5.82 log₁₀IU/ml および M3S : 7.48, 6.48 および 5.48 log₁₀IU/ml) の希釈パネルを作製した。各パネルを CLEIA 法で 3 重測定し、平均値を算出した。

5. 北海道内献血者の B19V 遺伝子型調査

北海道内献血者において、1996 年 4 月から 2009 年 3 月までの 13 年間に血液センターの B19V 抗原スクリーニング (RHA 法, CLEIA 法) で検出された B19V 陽性検体のうち、採血日順に無作為に抽出した 96 例 (P1~P96) について、前述の U-PCR 法を用いて B19V DNA 検出を確認した。次に B19V ゲノムの可変領域である NS1-Vp1u junction 部分の約 700 塩基をターゲットとして、遺伝子解析用にすべての遺伝子型に対応したユニバーサルなプライマーセットをデザインした。プライマーは sense primer : PNV1u-F (5'-GGACCAGTTC AGGAGAATCAT-3') と antisense primer : PNV1u-R (5'-GAAGACTTACACAAGCCTGG-3') を設定した。B19V 陽性献血者検体 96 例を前述の方法で抽出し、TaKaRa Ex Taq[®] HS (タカラバイオ社) を用いて、98°C/10sec, 55°C/30sec, 72°C/1min を 40 サイクルで PCR を実施した。増幅産物は BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および ABI 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて遺伝子配列を決定した。次に各遺伝子型のプロトタイプである Au 株 (1 型), A6 株 (2 型) および V9 株 (3a 型), D91.1 株 (3b 型)^{12)~14)} とともに CLUSTAL W により遺伝子解析を行い、Neighbor-joining method による分子系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。

結 果

1. U-PCR 法における各 B19V 遺伝子型の検出感度

調製した各 WHO B19V パネルの B19V DNA を、U-PCR 法で 24 重測定した (Table 1)。各遺伝子型について、プロビット分析により算出された検出感度は、1 型が 13.6 IU/ml, 2 型が 9.4 IU/ml, および 3 型が 14.6 IU/ml 以上であった。したがって、U-PCR 法は、すべ

Table 1 Detection limits of universal real-time PCR for each genotype of human parvovirus B19 by probit analysis

B19V DNA load log ₁₀ IU/ml (IU/ml)	WHO B19V genotype panel		
	M1 (genotype 1)	M2 (genotype 2)	M3 (genotype 3a)
1.5 (31.6)	24/24*	24/24	24/24
1 (10.0)	21/24	23/24	21/24
0.5 (3.2)	18/24	17/24	16/24
0 (1.0)	7/24	8/24	6/24
95% detection limit (IU/ml)	13.6	9.4	14.6

*number of positives/number of tests

3 members of the WHO B19V genotype panel (NIBSC code: 09/110) were diluted at 0, 0.5, 1, 1.5 log₁₀ IU/ml and subjected to universal real-time PCR.

での遺伝子型について検出可能であり、さらに各遺伝子型間での感度に大きな差は認められなかった。

2. CLEIA 法における B19V 遺伝子型の検出

濃度の高い B19V パネル (M1S, M2S および M3S) を希釈調製した各パネルの B19V DNA 量に対する CLEIA 法測定値 (3 重測定 の 平均値) を Fig. 1 に示した。各遺伝子型について CLEIA 法の値と B19V DNA 量との相関を見た結果、累乗近似により希釈直線性が認められた。また、1 型、2 型および 3 型の測定により得られた近似直線は、ほぼ一定の範囲内に収束していた。したがって、CLEIA 法における各パネルの検出感度および特異性に大きな差は認められなかった。また、各近似直線が CLEIA 法のカットオフ値 (1.0 C.O.I.) と交差する B19V DNA 量から、その検出感度は約 6.3 log₁₀ IU/ml 以上と推定された (Fig. 1)。

3. 北海道内献血者における B19V 遺伝子型分布

北海道内献血者由来の B19V 陽性 96 例 (P1~P96) を、U-PCR 法により測定した。その結果、96 例全例が B19V DNA 陽性であった。また、これら 96 例について、B19V ゲノムの NS1-VP1u 領域の塩基配列 (約 700 塩基) に基づく Neighbor-joining method による分子系統樹解析で得られた系統樹を Fig. 2 に示した。解析の結果、96 例のパネルの遺伝子型はすべて 1 型で、2 型および 3 型はいずれも検出されなかった。したがって、1996 年から 2009 年の 13 年間では、北海道内の献血者において 1 型のみが流行していたと考えられた。またこの系統樹から、1 型の各株はさらに大きく 3 つのグループ (サブグループ A, B および C) に分類され、採血日 (年) を考慮すると、サブグループ A から B、さらに C への流行株の変遷が示唆された。

考 察

新規に分類された B19V 遺伝子型のうち、2 型は主に

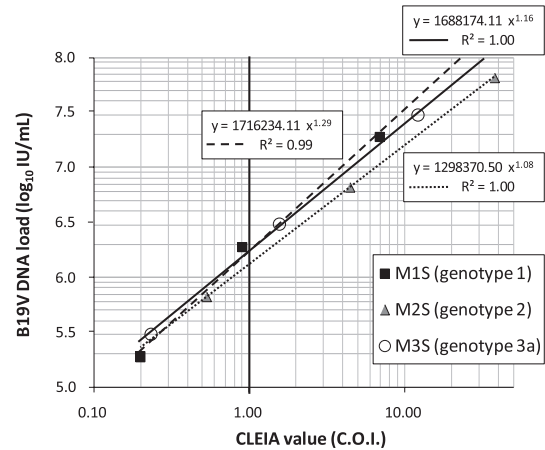


Fig. 1 Correlation of CLEIA value (C.O.I.) for human parvovirus B19 antigen and human parvovirus B19 DNA load in genotype panels

M1S, M2S and M3S are source materials of the WHO B19V genotype panels (NIBSC code: 09/110). M1, M2 and M3 (Table 1), respectively. B19V DNA load of each panel was determined by universal real-time PCR using B19V DNA standards. Samples with a CLEIA value (C.O.I.) of > or = 1.0 are determined to be positive for B19V antigen.

北および中央ヨーロッパを中心に、高齢患者由来の皮膚や固形組織から検出された。最近の疫学調査では、半世紀ほど前にヨーロッパを中心に感染循環していたが、その後時間の経過とともに大部分が 1 型にとって代わったと報告されている¹⁵⁾。一方 3 型のサブタイプである 3a 型は西アフリカのガーナで流行している株で、最近では米国等でも検出されている¹⁶⁾。また、もう 1 つのサブタイプである 3b 型はブラジル、フランス、イギリス等で分離されており、近年徐々にその拡がりをみせている¹⁷⁾。しかし、これら遺伝子型における疫学的な詳細は不明である⁸⁾。今回、過去 13 年間の北海道の献血者検体から検出された B19V 遺伝子型は 1 型だけであった。また我々と同地域である札幌市の医療機関のレトロスペクティブな研究によると、過去 28 年間に集められた患者検体から 104 例の B19V DNA 陽性例が検出されたが、いずれも 1 型であったと報告されている¹⁸⁾。さらに、1 型流行株が 1980 年代後半と 1990 年代後半に 2 度大きく変化しており¹⁸⁾、このうち後者は、我々の検討でのサブグループ A から B への変遷の時期と一致していた。これらの結果から、過去 10 年間以上の道内における B19V の流行は 1 型によるものだが、その主要な株は変遷していることが示唆された。最近検出されたサブグループ C の動向についても引き続き注目していく必要がある。

我々は Koppelman らの報告した測定系¹¹⁾を一部改変して、すべての B19V 遺伝子型が検出可能な U-PCR

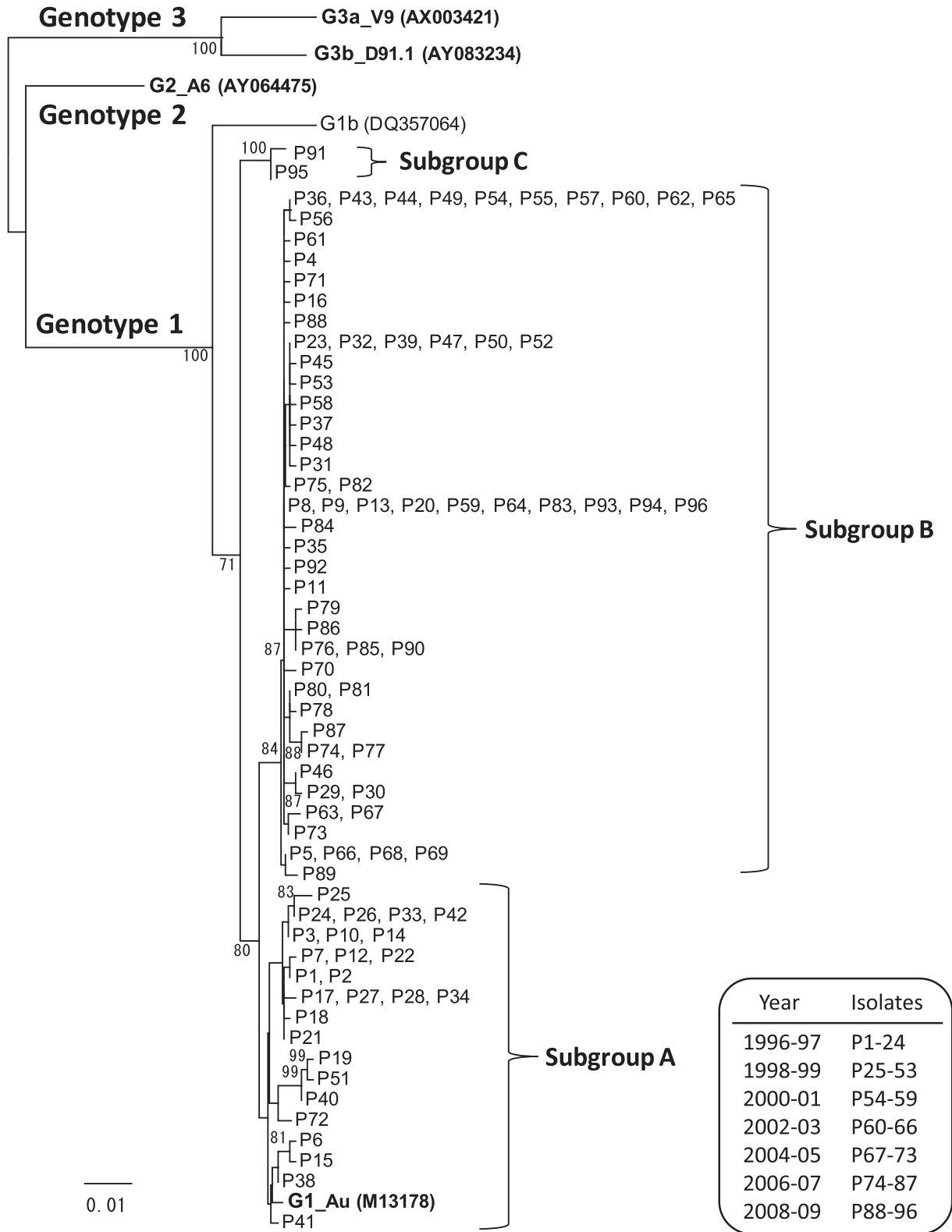


Fig. 2 Phylogenetic tree (Neighbor-joining method) of human parvovirus B19 among blood donors in Hokkaido (Apr. 1996-Mar. 2009)

Genotype 1 is represented by the prototype strain Au (DDBJ/EMBL/GenBank Accession Number: M13178). Genotype 2 is represented by the prototype strain A6 (AY064475). Genotype 3 is represented by two prototype strains, V9 and D91.1 (AX003421 and AY083234, respectively). Bootstrap values of >70% are indicated for the major nodes as a percentage of the data obtained from 1,000 resamplings. All 96 isolates (P1-P96) from blood donors in Hokkaido were segregated into genotype 1.

法を設定した。Koppelman らの報告では、1型および2型の検体についてのみの検討であったが、今回、同様のプライマー・プローブセットで3型のサブタイプである3a型を含むすべての遺伝子型を検出できることが確認された。一方、B19V 遺伝子型には今回検討した株の他に、最近ベトナムで1型のサブタイプである1b型が報告された¹⁹⁾。この1b型と前述した3b型²⁰⁾の陽性検体の入手は困難であり、現時点でその反応性を確認することはできなかった。しかし、DNA データバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) に登録されている1b型および3b型の塩基配列は、今回使用したプライマー・プローブの配列と完全に一致しているので、それらの検出は可能と考えられる。なお、U-PCR法で使用しているLNAやMGBのようなTmが増大するプローブは特異性の高い構造のため、短い配列での設定が可能である反面、配列の中に1塩基でも不一致があると反応性が大きく低下することが知られている¹¹⁾。したがって、プローブの種類を含めた測定条件の最適化は今後の課題である。

FDAは血漿分画製剤によるB19V感染防止対策として、製造工程中のB19V NAT検査法は既知の遺伝子型の検出ができること、およびプール血漿中のB19V DNA混入量は $4 \log_{10}$ IU/mlを超えないよう勧告を行った⁵⁾。現在、欧米ではこれらの勧告を遵守するために、分画原料血漿に対するB19V NATスクリーニングが実施されつつあるが、輸血用血液のB19Vスクリーニングは行われていない。一方、日赤は、分画原料血漿プールへのB19V混入量を減らし、同時に輸血用血液を介したB19Vの感染リスクを低減させる目的で、すべての献血血液に対してB19V抗原スクリーニングを実施している。仮にFDAの勧告の基準を満たすためには、CLEIA法がB19Vすべての遺伝子型を検出可能な検査法なのかということ、現在の検出感度で、分画原料血漿プールでのB19V混入量を $4 \log_{10}$ IU/ml以下に抑えられるかということの評価する必要がある。B19Vの各遺伝子型間におけるDNAレベルでの差は約10~15%と言われているが、*in vitro*での細胞感染性、p6プロモーター活性、および血清学的交差反応性はほぼ同等で、血清型としては1種類であると報告されている²¹⁾。CLEIA法によるB19Vスクリーニングは抗原抗体反応を利用した抗原検出系であり、本検討でB19Vの各遺伝子型間でのCLEIA法における検出感度に大きな差がなかったことは、妥当な結果と言える。CLEIA法はB19Vの全遺伝子型について、少なくとも約 $6.3 \log_{10}$ IU/ml以上のウイルス量を検出できることが確認された。

一方、プール血漿中のB19V DNA混入量が $4 \log_{10}$ IU/mlを超えないためには、以前我々が報告したように10,000バッグをプールすると仮定した場合、1バッグあ

たりの混入量を $6\sim 7 \log_{10}$ IU/ml以下にする必要がある⁷⁾。今回用いたWHO B19Vパネルは、いずれもB19V抗体陰性の高濃度B19V DNA陽性血漿を希釈した検体だが、遺伝子型にかかわらず、CLEIA法の感度はDNA量が約 $6.3 \log_{10}$ IU/ml以上であった。しかし、今後のB19V流行期における陽性献血者の増加やB19V抗体共存血漿の存在を考えると、CLEIA法の更なる高感度化が望まれる。

過去13年間の北海道内の献血者に検出されたB19Vの遺伝子型は1型のみであった。しかし、B19Vの感染経路は飛沫感染が主体であることから、将来的に2型および3型が輸入感染症として侵入してくる可能性も十分考えられる。したがって、今回CLEIA法において、B19Vのすべての遺伝子型に対する特異性が確認された意義は大きい。今後、U-PCR法の再構築およびCLEIA法の更なる高感度化への検討が引き続き必要である。

文 献

- 1) Sato H, Takakura F, Kojima E, et al: Screening of blood donors for human parvovirus B19. *Lancet*, 346: 1237—1238, 1995.
- 2) Sakata H, Ihara H, Sato S, et al: Efficiency of donor screening for human parvovirus B19 by the receptor-mediated hemagglutination assay method. *Vox Sang*, 77: 197—203, 1999.
- 3) Sekiguchi S, Sato S, Kato T: Human parvovirus B19 DNA detected by receptor-mediated hemagglutination assay of pooled plasma for fractionation. *Transfusion*, 38: 108—109, 1998.
- 4) 武田芳於, 阿部生馬, 青木玄伸, 他: 献血血液のRHA検査による第VIII因子製剤(クロスエイトMTM)原料血漿からのパルボウイルスB19除去効果. *日本輸血学会雑誌*, 48(1): 27—31, 2002.
- 5) U.S. Food and Drug Administration: Nucleic acid testing (NAT) to reduce the possible risk of parvovirus B19 transmission by plasma-derived products. Rockville (MD): FDA Center for Biologics Evaluation and Research; 2008, FDA draft guidance for industry.
- 6) Brown KE, Young NS, Alving BM, et al: Parvovirus B19 implications for transfusion medicine. *Transfusion*, 41(1): 130—135, 2001.
- 7) 武田尋美, 坂田秀勝, 松林圭二, 他: 化学発光酵素免疫測定法を用いた献血者における高感度ヒトパルボウイルスB19抗原スクリーニング. *日本輸血学会雑誌*, 53(4): 467—472, 2007.

- 8) Baylis SA: Standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for different genotypes of parvovirus B19: a meeting summary. *Vox Sang*, 94: 74—80, 2008.
- 9) Cohen BJ, Gandhi J, Clewley JP: Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*, 36: 152—155, 2006.
- 10) Baylis SA, Ma L, Padley DJ, et al: Collaborative study to establish a World Health Organization International Genotype Panel for parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. WHO ECBS report, 2009, WHO/BS/09.2122.
- 11) Koppelman MH, Rood IG, Fryer JF, et al: Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang*, 93: 208—215, 2007.
- 12) Shade RO, Blundell MC, Cotmore SF, et al: Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol*, 58: 921—936, 1986.
- 13) Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, et al: Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology*, 30: 374—380, 2002.
- 14) Servant A, Laperche S, Lallemand F, et al: Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol*, 76: 9124—9134, 2002.
- 15) Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, et al: Bioportfolio: life-long persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 7450—7453, 2006.
- 16) Rinckel LA, Buno BR, Gierman TM, et al: Discovery and analysis of a novel parvovirus B19 genotype 3 isolate in the United States. *Transfusion*, 49 (7): 1488—1492, 2009.
- 17) Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, et al: Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J Clin Microbiol*, 47: 3735—3738, 2009.
- 18) Suzuki M, Yoto Y, Ishikawa A, et al: Analysis of nucleotide sequences of human parvovirus B19 genome reveals two different modes of evolution, a gradual alteration and a sudden replacement: a retrospective study in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008. *J Virol*, 83: 10975—10980, 2009.
- 19) Toan NL, Duechting A, Kremsner PG, et al: Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J Gen Virol*, 87: 2941—2949, 2006.
- 20) Parsyan A, Szmaragd C, Allain JP, et al: Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol*, 88: 428—431, 2007.
- 21) Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, et al: Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J Virol*, 81: 6927—6935, 2007.

GENOTYPIC SPECIFICITY OF CHEMILUMINESCENT ENZYME IMMUNOASSAY SCREENING FOR HUMAN PARVOVIRUS B19 ANTIGEN IN BLOOD DONORS

Hidekatsu Sakata¹⁾, Keiji Matsubayashi¹⁾, Hiromi Takeda¹⁾, Shinichi Kishimoto¹⁾, Hiromi Ihara¹⁾, Shinichiro Sato¹⁾, Toshiaki Kato¹⁾, Kenji Tadokoro²⁾ and Hisami Ikeda¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center

²⁾Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters

Abstract:

Background: To prevent the risk of human parvovirus B19 (B19V) transmission through contaminated blood products, the Japanese Red Cross Blood Center has introduced B19V antigen screening by chemiluminescent enzyme immunoassay (CLEIA). Recently, B19V has been classified into three genotypes, 1, 2 and 3. According to the FDA guideline, B19V NAT for all plasma-derived products should detect all known genotypes of the virus. However, no survey for B19V genotyping or the possibility of detection of all genotypes by serology has been reported in Japan.

Methods: WHO panels including all genotypes of B19V were tested by universal real-time PCR (U-PCR) with some modifications and CLEIA to determine the sensitivity of each method. A total of 96 B19V DNA-positive donor samples obtained in Hokkaido during the past 13 years were assayed by U-PCR and phylogenetically analyzed by PCR direct sequencing.

Results: All genotypes of B19V were confirmed to be detected by U-PCR and CLEIA. The detection limits of U-PCR for genotypes 1, 2 and 3 were 13.6, 9.4 and 14.6 IU/ml, respectively. The sensitivity of CLEIA was inferred to be approximately 6.3 log₁₀ IU/ml. All 96 isolates from blood donors were detected by U-PCR and segregated into genotype 1.

Conclusion: All genotypes of B19V were detectable by CLEIA. B19V genotype 1 was the only strain circulating in Hokkaido during the past 13 years.

Keywords:

human parvovirus B19, genotype, chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA, real-time PCR