

血対ID	受理日	番号	感染症 (PT)	出典	概要	
70023	2007/04/26	70137	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 1965-1970	スクレイパー22L株に感染した神経芽細胞腫細胞およびFUクロイツフェルトヤコブ病原体に感染した視床下部GT細胞は直交配列で高密度な25nmウイルス様粒子を示した。この粒子は膜に囲まれた不完全結晶で、A型レトロウイルス粒子クラスターや異常PrP原線維とは別に存在し、形態学的にも異なっていた。またPrP抗体でラベルされず、ホルボールエステル処理で増加しなかったことから、プリオンではなかった。この粒子は後期PrP脳病変を誘発するTSE原因ビリオンである可能性がある。	51
60248	2007/03/30	61061	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	ProMED-mail20070108.0081	英国保健省は2007年1月8日、CJD患者数に関する最新情報を公表した。vCJD確定例における死亡患者112名、vCJD可能性例における死亡患者(神経病理学的に未確定)46名で、死亡患者総数は158名である。生存中のvCJD可能性患者は7名で、vCJD確定例または可能性例総数は165名である。2006年12月4日の月例統計以来、死亡患者総数には変化なく、確定例または可能性例総数は1名増加した。このデータは英国におけるvCJD流行は減少しつつあるとする見解に一致する。	52
60248	2007/03/30	61061	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Science 2006; 314: 133-136	慢性消耗病(CWD)非感染シカをCWD陽性のシカの唾液、血液または尿・糞に曝露させた。その結果、CWDを伝播しうる感染性プリオンが唾液および血液中に認められた。CWDはシカ科の動物に容易に伝播すると言える。プリオン感染では体液との接触に関する注意が払われるべきである。	
70021	2007/04/25	70125	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Vaccine (2006), doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.058	ヒトや動物におけるTSEの多様性を解明するため、PrPresの詳細な特徴が研究されている。分子学的な方法により、最近、ヨーロッパと米国の感染牛で異常なBSE型が発見され、少なくともBSE牛の何例かには別の起源の可能性が出てきた。小型反芻動物での新しいTSE型は「非典型的スクレイパー」または「Nor98」と呼ばれ、ヨーロッパの大部分の国でTSE迅速検査で同定されている。	53
70021	2007/04/25	70125	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Vet Rec 2007; 160: 215-218	カナダで乳牛のBSE感染が確定したことで、牛肉だけでなく牛乳や乳製品が病原体プリオンを含有しているかが大衆の関心事となった。このレビューは、牛乳や初乳中のプリオン、ならびに種々の動物系における垂直および水平感染に関する研究から牛乳の安全性に関するエビデンスを検討した。エビデンスは牛乳の消費による新たなvCJD感染のリスクは無視できることを示した。	54
60248	2007/03/30	61061	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Vox Sanguinis 2006; 91(Suppl 3): 70	PRDT(Pathogen Removal and Diagnostics Technologies)は、全血、RBCまたは血漿存在下で、脳由来プリオンタンパク質およびTSE感染物と強く結合する高親和性リガンドを得るため、何百万もの化合物をスクリーニングした。その結果、PRDTのリード樹脂は赤血球存在下でも高濃度のTSE感染物を吸着し、低濃度の内因性TSE感染物を除去した。この樹脂を使用したMacoPharma P-Capt(TM)フィルターを用いることにより、輸血によるvCJD伝播リスクを軽減できる。	
70017	2007/04/25	70121	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Vox Sanguinis 2006; 91: 221-230	散在性(s)、家族性(f)および異型(v)クロイツフェルト・ヤコブ病(GJD)が輸血を介して感染伝播するかを判定するために、英国CJDサーベイランスユニットと血液サービスにより進行中の試験の2006年3月1日までの結果である。供血者として報告されたvCJD 31例中18例、sCJD 93例中3例およびfCJD 5例中3例の血液が、各々、66例、20例および11例の受血者へ輸血されていた。2例の受血者においてvCJDが確定していた。また、vCJD 11例中7例、sCJD 52例中7例が、輸血の既往歴があった。	55

血対ID	受理日	番号	感染症 (PT)	出典	概要	
70017	2007/04/25	70121	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	Vox Sanguinis 2007; 92: 121-124	ハプトグロビンおよび抗トロンビンの2つの異なった調整液にヒトパルボウイルスB19を加え、60°Cで10時間処理した。異なった溶液中のB19は加熱中異なった熱感受性パターンを示し、ハプトグロビン調整液中では緩やかな不活性化、抗トロンピン調整液中では限定的な不活性化であった。異なった調整液を用いた以前の研究ではB19は迅速に不活性化され、今回の不活性化の動力学とは大きく異なった。B19の熱感受性は溶液組成に大きく依存する。	56
60234	2007/03/23	61006	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	英国保健省 Press Statement 2007年1月18日	輸血と関係した新たなvCJD疾患(4例目)が、最近診断された。この症例は後にvCJDを発症したドナーからの輸血を受けてから約9年後にvCJDと診断された。同じ供血者からの輸血は以前に同定された1例とも関係していた。4例目の患者は以前からvCJDに暴露した可能性を知らされていた。4例目のvCJD感染症例により、輸血を介したヒトの間におけるvCJD感染リスクについての懸念が高まっている。4症例は全て、成分輸血に関係したものであり、血漿分画製剤による治療に関連した症例は今まで報告されていない。	57
60237	2007/03/27	61024	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	英国保健省 Press Statement 2007年1月18日	英国で輸血と関係した新たなvCJD症例(4例目)が、最近診断された。この症例は後にvCJDを発症したドナーからの輸血を受けた約9年後にvCJDと診断された。同じ供血者からの輸血は以前に同定されたvCJD1例とも関係していた。4例目の患者は以前からvCJDに暴露した可能性を知らされていた。4例目のvCJD感染症例により、輸血を介したヒトの間におけるvCJD感染リスクについての懸念が高まっている。4症例は全て、成分輸血に関係したものであり、血漿分画製剤による治療に関連した症例は今まで報告されていない。	58
60237	2007/03/27	61024	異型クロイツフェルト・ヤコブ病	厚生労働省 平成18年8月24日	平成18年8月23日に開催された薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会において、ヒト胎盤エキス(プラセンタ)注射剤使用者に対する献血制限措置を日本赤十字社が実施することが了承された。	
60248	2007/03/30	61061	感染	Blood 2006; 108: Abstract #4144	0.2mM S-303 (アクリジン化合物) および20mM グルタチオン (GSH) を用いた改良S-303処理法を用い、RBC中の細菌およびウイルス不活化の有効性を評価した。輸血に関連するグラム陽性菌およびグラム陰性菌、Vesicular stomatitisウイルス、Adenovirus 5、HIVおよびウシウイルス性下痢ウイルス(HCVのモデル)のいずれも改良S-303処理により効果的に不活化された。	59
60248	2007/03/30	61061	狂犬病	ProMED-mail20061118.3303	2006年11月17日、京都府の保健所は、京都市の60歳代の男性がフィリピンで犬にかまれ、帰国後に狂犬病を発症して死亡したと発表した。厚労省によると、日本人が国内で狂犬病を発症したのは36年ぶりである。厚労省によると、男性はフィリピン滞在中の8月末に野良犬にかまれ、11月1日に帰国した。9日に風邪のような症状で京都市内の病院を受診した。その後、幻覚症状、水や風を怖がるなど狂犬病特有の症状を発症した。国立感染症研究所が調べたところ、男性の唾液から狂犬病ウイルスが検出された。	60
60234	2007/03/23	61006	結核	NIKKEI NET いきいき健康 2006年12月5日	既存の治療薬がほとんど効かず、世界保健機関(WHO)が警戒を呼び掛けている「超多剤耐性」の結核菌が、国内でも入院患者の0.5%から検出されたことが、結核研究所の調査で明らかになった。2002年6月から11月にかけて国内99の結核治療施設の入院患者3122人から採取した結核菌を分析した結果である。検出例の半数は薬の服薬歴がなかったことから、他の患者から感染した可能性が高い。	61

血対ID	受理日	番号	感染症 (PT)	出典	概要	
60241	2007/03/28	61036	細菌感染	Epidemiol Infect 2006; 134: 1068-1073	Mycobacterium bovisはニュージーランドの野生動物や家畜を宿主とする。1995-2002年のヒト結核症例を疫学的、臨床検査学的に調べた結果、確定症例1997例中54例(2.7%)がM.bovisで、10万人当たり0.2人の割合であった。ヒトからの単離体23例中14例がウシ、シカ、オポッサム、フェレット、フタ、ネコからの単離体と同一の制限酵素分析パターンを示した。ニュージーランドでは動物宿主からヒトへの伝播が低レベルで続いていることが示唆された。	62
70017	2007/04/25	70121	重症急性呼吸器症候群	Transfusion 2006; 46: 1770-1777	血液由来製品を模した蛋白質溶液中の重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)を不活性化する方法として、加熱、UV照射、オクタン酸、溶剤/界面活性剤(S/D)法を検討した。その結果、60℃で15-30分間加熱および40分間UVC照射はSARS-CoVを不活性化した。UVA照射はソラーレン添加を必要とし、オクタン酸処理はSARS-CoVを不活性化できなかった。S/D処理は、SARS-CoV不活性化に、Triton X-100は2時間、Tween 80は4時間、石炭酸ナトリウムは24時間を要した。	63
60248	2007/03/30	61061	鳥インフルエンザ	Eurosurveillance 2006; 11(12): 061221	2006年11月29日時点でH5N1型トリインフルエンザウイルス感染患者258名がWHOに報告され、50カ国以上で鳥類での感染が確認されており、うち10カ国では鳥類がヒト患者発生の感染源となっている。EUでは、同ウイルスは家禽には感染定着しておらず、2006年春季に少なくとも15カ国で野鳥の感染が確認されたが、ヒト感染症例は発生していない。家禽の感染予防が成功し、感染は5件のみで迅速に制圧された。散发例の報告が続いていることから、生物学的安全確保対策と早期警報システムを堅持する必要がある。	64
60248	2007/03/30	61061	鳥インフルエンザ	ProMED-mail20061201.3394	WHOは、H5N1鳥インフルエンザウイルスにより光を当て、パンデミック株への変異の検出を容易にするために、H5N1鳥インフルエンザのヒト症例調査のためのガイドラインを発表した。14ページのガイドラインは、患者の問診、周辺で他の症例を捜索することによる接触歴の調査、ヒト-ヒト感染の何らかの徴候を発見するためのデータのふるいわけなど、各症例の徹底的な調査を求めている。ガイドラインでは、臨床検査の結果が出る前に疑い症例の調査を行うことを要請している。	65
60248	2007/03/30	61061	鳥インフルエンザ	ProMED-mail20070120.0260	2007年1月18日、農林水産省は、宮崎県の養鶏場で発生したトリインフルエンザは高病原性ウイルスによるものだったと明らかにした。同省は養鶏場で死亡した鶏から採取したウイルスのサンプルを検査して病原性が高いものであることを確認した。H5N1型ウイルスの流行は、宮崎県清武町の谷口養鶏場黒坂農場で発生し、3つある鶏舎のうち1つで3500羽の鶏が死亡した。	66
70006	2007/04/23	70089	鳥インフルエンザ	Transfusion 2007; 47: 452-459	血漿製剤の製造中に通常使われるウイルス不活性化処理、即ち、ヒトアルブミンに対するパスツール法、静注用免疫グロブリン(IVIG)に対するSD処理、第VIII因子インヒビターバイパス活性に対する蒸気加熱、及びIVIGに対する低pHインキュベーションが、H5N1インフルエンザウイルス不活性化に有効かを再集合体株を使って調べた。その結果、H5N1インフルエンザウイルスは、エンベロープウイルスと同様の挙動を示し、これらのウイルス不活性化処理によって効果的に不活性化された。	67
60234	2007/03/23	61006	梅毒	Lancet 2007; 369: 132-138	中国の性感染症サーベイランスシステム及び監視サイトネットワークからの症例報告データを収集し評価した。中国における報告された梅毒の全症例発生率は、1993年には100,000人あたり0.2例であったが、2005年には、第一期及び第二期梅毒だけで100,000人あたり5.7例であった。先天的な梅毒の発生率は、1991年には100,000例の出生児あたり0.01症例であったが、2005年には100,000例の出生児あたり19.68症例まで、年平均71.9%の割合で大きく増加した。	68

医薬品 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数		報告日	第一報入手日 2006. 12. 26	新医薬品等の区分 該当なし	機構処理欄
一般的名称	(製造承認書に記載なし)	研究報告の公表状況	Tjon GM, Coutinho RA, van den Hoek A, Esman S, Wijkmans CJ, Hoebe CJ, Wolters B, Swaan C, Geskus RB, Dukers N, Bruisten SM. J Med Virol. 2006 Nov;78(11):1398-405.	公表国 オランダ	
販売名(企業名)	合成血「日赤」(日本赤十字社) 照射合成血「日赤」(日本赤十字社) 合成血-LR「日赤」(日本赤十字社) 照射合成血-LR「日赤」(日本赤十字社)				
研究報告の概要	<p>○免疫正常者におけるA型肝炎ウイルスの多量かつ持続的な排泄 A型肝炎ウイルス(HAV)感染患者の血液および糞便中へのウイルス排泄期間および排泄量を、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、疾患重症度、HAV遺伝子型との関連において調べた。急性A型肝炎患者27名(年齢の中央値:33歳)から臨床データ、血液、糞便を、最長26週間収集した。別の急性A型肝炎患者55名から得た単回輸血検体(single blood donations)も使用した。ウイルス量は、競合的nested RT-PCR法を用いて定量した。HAVは、疾患発症後から81日間(中央値)便中に排泄され、50%の患者で36日目においても多量なウイルスの排泄が続いた(懸濁液1mL当たり$2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$コピー)。ウイルス血症が検知されたが、ウイルス量は検出限界以下であり、ウイルス血症期間の中央値は発症後42日間であった。疾患発症後10日間は、ALT値の高さは血中ウイルス量の高さに相関した。遺伝子型1aと1bの患者を比較したところ、HAV排泄期間および黄疸の期間に有意差はなかった。結論として、発症後最初の1ヶ月間は便中に排泄されるHAVの力価が高く、このため患者が感染性を持つ期間はおそらく現在考えられているより長いであろう。血液銀行は、ウイルス血症が1ヶ月以上存続すること、ならびにウイルスの排泄や黄疸の期間に遺伝子型が影響しないことを認識する必要がある。</p>				<p>使用上の注意記載状況・ その他参考事項等</p> <p>合成血「日赤」 照射合成血「日赤」 合成血-LR「日赤」 照射合成血-LR「日赤」</p> <p>血液を介するウイルス、 細菌、原虫等の感染 vCJD等の伝播のリスク</p>
	報告企業の意見	今後の対応			
免疫正常者において、A型肝炎発症後から81日間(中央値)便中にHAVが排泄され、最初の1ヶ月間は便中に排泄されるHAVの力価が高く、ウイルス血症期間の中央値は発症後42日間であったとの報告である。	日本赤十字社は、輸血感染症対策として、問診で肝炎の既往があった場合、A型肝炎については治癒後6ヶ月間、家族に発症した人がいる場合は1ヶ月間献血不可としている。今後も引き続き情報の収集に努める。				

High and Persistent Excretion of Hepatitis A Virus in Immunocompetent Patients

Grace M.S. Tjon,¹ Roel A. Coutinho,^{2,3} Anneke van den Hoek,¹ Sylvia Esman,¹ Clementine J. Wijkmans,⁴ Christian J.P.A. Hoebe,⁵ Bert Wolters,⁶ Corien Swaan,⁷ Ronald B. Geskus,^{1,8} Nicole Dukers,^{1,2} and Sylvia M. Bruisten^{1,2*}

¹Department of Infectious Diseases, Public Health Service of Amsterdam, 1000 CE, Amsterdam, The Netherlands

²Department of Human Retrovirology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 15, Amsterdam, The Netherlands

³Center for Infectious Diseases Control, National Institute of Public Health and the Environment, A. van Leeuwenhoeklaan 9, Bilthoven, The Netherlands

⁴Municipal Health Service "Hart voor Brabant", Den Bosch, The Netherlands

⁵Department of Infectious Diseases, Municipal Health Service of South Limburg, Heerlen, The Netherlands

⁶Municipal Health Service of Groningen, Groningen, The Netherlands

⁷Municipal Health Service of Zuid-Holland Noord, Leiden, The Netherlands

⁸Department of Clinical Epidemiology & Biostatistics, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 15, Amsterdam, The Netherlands

The duration and level of virus excretion in blood and faeces of patients with hepatitis A virus (HAV) infection were studied in relation to levels of alanine aminotransferase (ALT), disease severity and HAV genotype. Clinical data, blood and faeces were collected from 27 patients with acute hepatitis A (median age: 33 years) for a maximum of 26 weeks. Single blood donations from 55 other patients with acute HAV (median age: 32 years) were also used. Virus loads were quantified by competitive nested RT-PCR. HAV was excreted in faeces for a median period of 81 days after disease onset, with 50% of patients still excreting high levels at Day 36 (2×10^6 – 2×10^8 copies/ml faeces suspension). Viraemia was detected, but not quantifiable, for a median period of 42 days. In the first 10 days of illness, higher ALT levels were correlated with higher viraemia levels. Comparison of patients infected with genotype 1a with those infected with type 1b did not differ significantly in terms of the duration of HAV excretion or jaundice. In conclusion, faecal excretion of HAV is at a high titre in the first month, perhaps making patients infectious for a longer period than assumed currently. Blood banks should be aware that viraemia may be present for more than 1 month, and genotype did not affect the duration of virus excretion or jaundice. *J. Med. Virol.* 78:1398–1405, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HAV excretion; HAV viraemia; HAV levels

INTRODUCTION

Hepatitis A virus (HAV) belongs to the *Picornaviridae* family and is classified in its own genus, *Hepatovirus*. Infection takes place mainly via the faecal-oral route through person-to-person contact. In the late incubation period and at onset of illness very large numbers of HAV particles are excreted in faeces until alanine aminotransferase (ALT) reaches peak elevation [Ciocca, 2000]. Therefore, patients with HAV are considered contagious from 1–2 weeks before onset of symptoms until 1–2 weeks afterward [Koff, 1998; Center for Disease Control and Prevention, 2004]. However, faecal excretion can last up to 3 months and longer [Yotsuyanagi, 1996; Costa-Mattioli et al., 2002a], indicating that patients may be contagious for a longer period than assumed previously.

In addition to faecal excretion, the virus is also present in blood [Center for Disease Control and Prevention, 2004]. HAV viraemia can exceed 3 months in immunocompetent patients [Bower et al., 2000;

Reporting and interviewing of hepatitis A cases were done at the Dutch Public Health Services of Amsterdam, Brabant, South Limburg, Groningen, South-Holland South and South-Holland North. HAV RNA isolation, detection, quantification and sequencing were performed at the Public Health Service of Amsterdam, The Netherlands.

*Correspondence to: Sylvia M. Bruisten, Public Health Service of Amsterdam (Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid), Nieuwe Achtergracht 100, 1018 WT Amsterdam, The Netherlands. E-mail: sbruisten@ggd.amsterdam.nl

Accepted 11 July 2006

DOI 10.1002/jmv.20711

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

Costa-Mattioli et al., 2002b; Sagnelli et al., 2003; Normann et al., 2004] and in one HIV-infected patient, it was detected for 256 days [Costa-Mattioli et al., 2002a]. Parenteral transmission has been reported by blood transfusion and blood products [Mannucci et al., 1994; Soucie et al., 1998] underlining the importance of detection of HAV viraemia. However, data on the duration of HAV excretion remain limited.

Because acute HAV infection is self-limiting, longitudinal studies in which clinical data are collected along with samples are uncommon. For a follow-up study, blood and faecal samples were collected from 27 patients with acute hepatitis A infection for a maximum period of 26 weeks. Our aim was to determine the median duration of HAV excretion in faeces and blood and thus the period of possible infectiousness. Additionally, in 55 other patients whose HAV had been typed [van Steenberg et al., 2004], it was investigated whether the degree of liver damage affected duration and level of HAV excretion in faeces and viraemia level, and whether HAV genotype affected the duration of HAV excretion and jaundice.

MATERIALS AND METHODS

Participants

For the follow-up study, all patients who were positive for anti-HAV immunoglobulin M (anti-HAV IgM(+)) and reported between August 2003 and August 2004 to the Public Health Services in Amsterdam, Brabant, South Limburg, Groningen, South-Holland South and South-Holland North were approached.

Participants were asked to sign an informed consent form and to donate a maximum of nine faecal samples and three blood samples over 26 weeks. To prevent distress in children younger than 12 years, they were not required to donate multiple blood samples, but only the one sample used for detecting anti-HAV IgM. The participants were divided at random into groups A and B to donate on different schedules (Table I) to obtain a maximum number of time points after infection. In weeks 1–4 after start of symptoms, participants donated three faecal samples; in weeks 5–26 they donated one faecal sample every 4 weeks. If three consecutive faecal samples were negative in the HAV PCR before the end of the 26-week period, follow-up for that patient was stopped. Adults were asked to donate three blood samples in the first 4 weeks of illness, but a few samples were received after more than 4 weeks. Participants were asked to complete a structured questionnaire each time they sent in a faecal sample. It asked about the presence and duration of symptoms such as jaundice, vomiting, nausea, fatigue, medications and co-infections. The blood samples were used to determine levels of ALT to quantify liver damage. Patients with ALT levels above normal, that is, >45 IU/L blood (37°C), were considered to have abnormal liver function.

Additionally, blood samples were used representing 55 sporadic HAV cases who participated previously in an HAV typing study [Bruisten et al., 2001; van

TABLE I. Scheme for Sample Donation

Weeks after onset of illness	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Group A	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Group B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Patients donated samples according to group A or B. In weeks 1–4 after onset of illness, they gave three blood and three faeces samples. In weeks 5–26, they donated one faeces sample every 4 weeks. If three consecutive faeces samples were negative in the HAV RT-PCR, the patient was informed that he had completed the study. F, Faeces sample; B, Blood sample.

Steenbergen et al., 2004], to study the relation between the degree of liver damage and the virus load. Patients were reported from December 2000 to February 2004 to the Amsterdam health service (HS).

Time Definition

Because the production date of the faecal samples was often unknown, the date on which it was received was used. The sampling time was calculated as the days between the first day of symptoms (jaundice) and the date the sample was received. Sampling time in blood was the number of days between the first day of symptoms and the donation date.

Blood and faecal samples from individual follow-up participants were considered to be measured in the same period (i.e. one measurement), if faeces were provided within 5 days after giving a blood sample.

RNA Isolation, Detection, Sequencing and Phylogenetic Analysis

RNA extraction, nested RT-PCR, sequencing and phylogenetic analysis were carried out as described previously [Bruisten et al., 2001; van Steenbergen et al., 2004; Tjon et al., 2005]. The detection RT-PCR was carried out in an end volume of 25 μ l with an input of 5 μ l RNA from patient material.

Random hexamer primers were used for reverse transcription. PCR primers for nested amplification of the VP3-VP1 region and the VP1-P2a region of the HAV genome were used as described previously [Bruisten et al., 2001; van Steenbergen et al., 2004; Tjon et al., 2005]. All primers were synthesised by Isogen Life Science (Maarssen, The Netherlands).

Construction of Competitor RNA

The competitor was created from RNA isolated from virus culture HAV_{Cyt/}HB1.1 [Brack et al., 1998] with Tripure isolation reagent (Roche, Almere, The Netherlands). Full-length HAV RNA was resuspended in 50 μ l Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) and stored at -80°C until use.

The method was adapted from Diviacco et al. [1992]. Two RT-PCRs were performed with the Access RT-PCR kit (Promega, Leiden, The Netherlands). The sequences of the primers used in the RT-PCR reactions are shown in Table II. The 25 μ l RT-PCR mixtures contained 0.5 μ l HAV_{Cyt/}HB1.1 RNA, 1 \times AMV/Tfi reaction buffer, 200 μ M dNTP, 1.5 mM MgSO₄, 10 ng of the sense and the

anti-sense primer, 0.1 U AMV reverse transcriptase and 0.1 U Tfi DNA polymerase. The RT step was carried out at 48°C for 45 min and 94°C for 2 min. Subsequently, 35 amplification cycles were carried out at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 68°C for 90 sec, and terminated with 68°C for 7 min. The amplification products of RT-PCR1 (175 bp) and RT-PCR2 (222 bp) contain an overlapping region of 20 bp with restriction sites EcoRI and HindIII (Table II). This region was used for 1:1 hybridisation of PCR1 and PCR2 amplimers. Subsequently, 0.2 μ l of the mixture and primers VP1-4-sense-NcoI and VP1-6-Sall (Table II) were added in a 25 μ l PCR mix and amplification was carried out [Bruisten et al., 2001]. The resulting 397 bp amplimer was verified on a 1% agarose gel, isolated with the Qiagen gel extraction kit (Qiagen Benelux B.V., Venlo, The Netherlands) and dissolved in 50 μ l Tris-HCl (10 mM, pH 8.0). The fragment was cloned into a pGEM5Zf(+) vector and grown in JM109 bacteria (Promega Benelux B.V., Leiden, The Netherlands). Plasmid DNA was isolated from a recombinant clone and linearised by incubation at 95°C for 2 min and placement on ice for 5 min. Competitor RNA was made using T7 polymerase (Promega Benelux B.V.) and contaminating DNA was removed with RQ1 Dnase (Promega Benelux B.V.) according to the manufacturers' protocols.

Quantitative RT-PCR

Serial dilutions of competitor RNA were amplified by nested PCR with and without an RT step according to Bruisten et al. [2001] to determine the presence of contaminating DNA. Dilution samples that were negative in the PCR reactions without the RT step were used for quantitative RT-PCR with patient material. Two methods were used for calculating the concentration of the competitor RNA. The first method was based on the OD260 value measured by spectrophotometer of the competitor RNA, which was 0.024, and the Avogadro formula. The total length of the competitor RNA is 443 nucleotides, resulting in a concentration of the competitor RNA starting solution of 4×10^{11} copies/ μ l. The second method was based on the fact that RNA detection by RT-PCR is possible from 10 to 20 copies per reaction, assuming a 10% efficiency of the cDNA step and the potency to detect 1–2 copies of target cDNA. Using this method we calculated that the concentration of the competitor RNA starting solution was about 4×10^{12} copies/ μ l. The average of these numbers was calculated

TABLE II. Primer Sequences Used in the Two RT-PCRs to Construct the Competitor

	Primer	Sequence 5'-3'	Nucl nr ^a
RT-PCR1	VP1-4s NcoI	<u>TAC/CATGG</u> cgttgcttcccattgctcaga	2131–2149
	VP-mut-as EcoRI/HindIII	cc <u>GAATT/C</u> cgcgAAGC/Tgcaacattctgttctgtagaaa	2259–2278
RT-PCR2	VP1-6 Sall	GCG/TCGACcattatgatctgatgtatgt	2455–2473
	VP-s-mut EcoRI/HindIII	gcA/AGCTTcgcgG/AATTCggccagatccccaagttgtat	2279–2298

^aNucleotide numbering is according to strain HAV_{Cyt/}HB1.1 [Brack et al., 1998]. The underlined part of the primer sequences written in capital letters indicates restriction sites. The EcoRI/HindIII sites are in a 20 bp region, which is present in the competitor sequence but not in wild-type HAV.