

病名：真菌性肉芽腫症 (Epizootic ulcerative syndrome)

病原体： *Aphanomyces invadans*

卵菌門 (phylum Oomycota) , 卵菌綱 (class Oomycetes) , ミズカビ目 (order Saprolegniales) , family Leptolegniaceae

宿主：多くの魚類。

区分	手法名 (文献)	プライマー		反応温度条件	増幅産物bp	備考	推奨度
		名称	配列 (5'-3')				
PCR	(Buller, 2004)	AIFP14	CTG ACT CAC ACT CGG CTA GC	94°C 5分 → (95°C 60秒, 55°C 1分, 72°C 1分) x 30サイクル → 72°C 10分	554	リボソーム遺伝子のITS領域の一部を増幅する。原報ではPromegaのPCR master mixとPE Applied BiosystemsのTaq DNA polymeraseを使用。特異性は高く、細菌や <i>Achlyna</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Saprolegnia</i> など菌類、さらには同属の <i>A. astaci</i> , <i>A. frigidophilus</i> も増幅しないが、 <i>A. invadans</i> と同定された株のなかには本プライマーセットで増幅されないものもある。	-
		AIRP10	ATT ACA CTA TCT CAC TCC GC				
	(Phadee et al 2004a)	ITS11	GCC GAA GTT TCG CAA GAA AC	94°C 5分 → (94°C 30秒, 65°C 30秒, 72°C 1分) x 25サイクル → 72°C 5分	550	リボソーム遺伝子のITS1およびITS2領域にプライマーを設計している。原報ではPromegaのTaq polymerase使用。 <i>A. frigidophilus</i> (ITS23で1塩基異なるのみ) を除き <i>A. invadans</i> に特異的。原報では同じく <i>A. invadans</i> のPCRによるプライマーセットを設計した Phadee et al (2004b) を引用しているが、それとは異なるプライマーセットを新たに設計しており、なぜPhadee et al (2004b) のプライマーセットを採用しなかったのか言及がない。	-
		ITS23	CGT ATA GAC ACA AGC ACA CCA				
	(Phadee et al 2004b)	1APM 1F	ATC GCT GCA CTC GTC GTG AA	94°C 5分 → (94°C 30秒, 65°C 30秒, 72°C 1分) x 25サイクル → 72°C 5分	400	ガラクトース結合タンパク遺伝子を標的とする。原報ではタカラTaq polymeraseを使用。同属の他の菌類や <i>Achlya</i> , <i>Dictyuchus</i> , <i>Saprolegnia</i> 等を増幅しない。ただし同一筆頭著者による別の論文 (Phadee et al 2004a) では <i>A. invadans</i> 検出のために別のプライマーセットが使用されている。	-
		1APM 6R	CCA GTT GCA CCA TAA CTT GTG				
	(Oidtman et al 2008)	B073	CTT GTG CTG AGC TCA CAC TC	96°C 5分 → (96°C 1分, 58°C 1分, 72°C 1分) x 50 (20) サイクル → 72°C 5分	564	リボソーム遺伝子のITS1およびITS2領域にプライマーを設計している。 <i>A. invadans</i> 特異的。細菌や他の菌類、同属の他種を増幅せず。原報では下記の semi-nested PCR を続けて行うときは20サイクル、本PCRのみで検出するときは50サイクルを行っており、semi-nested と同等以上の感度が得られている。	-
			BO639				
		BO487	TGT GTT GAT ATT ACA CGA CT	96°C 5分 → (96°C 1分, 56°C 1分, 72°C 1分) x 30サイクル → 72°C 5分	152	上記PCRと共通のリバースプライマー BO639 を用いた semi-nested PCR。 <i>A. frigidophilus</i> も増幅する。	-
			BO639				
(Vandersea et al 2006)	AINVAD-2F	TCA TTG TGA GTG AAA CGG TG	95°C 2分 → (95°C 20秒, 54°C 30秒, 72°C 45秒) x 35サイクル → 72°C 5分	234	原報はDneasy Tissue Kit (QIAGEN) で抽出、InvitrogenのTaq polymeraseを使用。同属の他種、他の菌類や細菌を増幅せず。	-	
	AINVAD-ITSR1	GGC TAA GGT TTC AGT ATG TAG					

文献

Buller, N. (2004) Molecular diagnostic tests to detect epizootic ulcerative syndrome (*Aphanomyces invadans*) and Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). FRDC Project Number 2001/621. Fisheries Research and Development Corporation, Deakin West, Australia.

Oidtman, B., Steinbauer, P., Geiger, S., and Hoffmann, R. W. (2008) Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. Diseases of Phadee, P., Kurata, O., Hatai, K., Hirono, I., and Aoki, T. (2004a) Detection and Identification of Fish-Pathogen *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. Journal of Aquatic Animal Health 16, 220-230.

Phadee, P., Kurata, O., and Hatai, K., (2004b) A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. Fish Pathology 39, 25-31.

Vandersea, M. W., Litaker, R. W., Yonish, B., Sosa, E., Landserg, J. H., Pullinger, C., Moon-Butzin, P., Green, J., Morris, J. A., Kator, H., Noga, E. J., and Tester, P. A. (2006) Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. Applied and Environmental Microbiology 72, 1551-1557.