

ボナミア症(ボナミア感染症)

病原体: *Bonamia exitiosa* および *B. ostreae* ケルコゾア門アセトスポラ綱略胞子中類(Haplosporidia)

宿主: *B. exitiosa* はイタボガキ類(*Ostrea* および *Crassostrea* 属各種)を宿主とする。*C. gigas* から検出例はあるが死亡例は報告されていない。*B. ostreae* はヨーロッパヒラガキ(*O. edulis*)をはじめとする *Ostrea* 属に感染する。*C. gigas* に対する病原性は低い。

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	Protocol A (Carnegie et al. 2000)	A _F	TGT GAT GCC CTT AGA TGT YCT	(94°C60秒, 55-59°C60秒, 72°C60秒) × 35サイクル → 72°C10分	528	市販のキットでDNAを抽出。Bonamia属を含む広範囲のalveolate原生生物の18S-ITS 1 rDNA領域を検出するように設計された。増幅産物のサイズは原生生物によって異なるが、 <i>B. ostreae</i> の場合は528と予想される。原報ではPLATINUM Taq DNA polymerase (GibcoBRL)で増幅。アニーリング温度は原報では55-59°Cと記載されており、はっきりしない。	-
		A _R	GCT GCG TCC TTC ATC GWT				
	Protocol B (Carnegie et al. 2000)	B _F	CAG CCR TCT AAC TAG CTS TCG C	(94°C60秒, 55-59°C60秒, 72°C60秒) × 35サイクル → 72°C10分	122	市販のキットでDNAを抽出。18SrDNAの一部を増幅。フォワードプライマーはHaplosporidiumの共通配列に、リバースプライマーはBonamia ostreae特異的配列に対して設計してあり、 <i>B. ostreae</i> 特異的だが、特異性の実験的証明は無い。原報ではPLATINUM Taq DNA polymerase (GibcoBRL)で増幅。アニーリング温度は原報では55-60°Cと記載されており、はっきりしない。 <i>B. ostreae</i> の検出感度はProtocol Aより高い。	-
		B _R	CGG GTC AAA CTC GTT GAA CG				
	Protocol C (Carnegie et al. 2000)	C _F	CGG GGG CAT AAT TCA GGA AC	(94°C60秒, 55°C60秒, 72°C60秒) × 35サイクル → 72°C10分	760	市販のキットでDNAを抽出。18SrDNA配列を増幅。 <i>B. ostreae</i> , <i>B. exitiosa</i> を検出。原報ではPLATINUM Taq DNA polymerase (GibcoBRL)で増幅。アニーリング温度は原報では55-61°Cと記載されているがOIEマニュアルでは55°Cとなっている。 <i>B. ostreae</i> の検出感度はProtocol Bより高い。	☆
		C _R	CCA TCT GCT GGA GAC ACA G				
	(Cochennec et al. 2000)	BO	CAT TTA ATT GGT CGG GCC GC	94°C5分 → (94°C60秒, 55°C60秒, 72°C60秒) × 30サイクル → 72°C10分	300	18SrDNAを増幅。Phenol/chloroform法でDNA抽出。Taq DNA polymerase使用。OIEマニュアル記載法。 <i>B. ostreae</i> 配列特異的だが、特異性に関する実験的証明はない。	☆
		BOAS	CTG ATC GTC TTC GAT CCC CC				
	(Engelsma et al. 2000)	BoosF03	CAA TGG TGC GTT CAA CGA GT	94°C2分 → (94°C30秒, 58°C30秒, 72°C45秒) × 40サイクル → 72°C7分	352	18SrDNAを増幅。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)でDNA抽出。Taq DNA polymerase (invitrogen)使用。 <i>B. ostreae</i> 配列特異的だが、特異性に関する実験的証明はない。OIEマニュアル記載法だが、OIEマニュアル(2018版)のフォワードプライマー配列は誤り。	☆
		BoosR03	GGG TTC GCG GTT GAA TTT TA				
	(Ramilo et al. 2013)	BOSTRE-F	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	94°C2分 → (94°C30秒, 55°C45秒, 72°C60秒) × 35サイクル → 72°C1分	208	18SrDNAの一部およびITS1領域を増幅。 <i>B. ostreae</i> 特異的。 <i>B. exitiosa</i> は増幅しない。Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)でDNA抽出, Taq DNA polymeraseで増幅。	-
		BOSTRE-R	TCG CGG TTG AAT TTT ATC GT				
	(Ramilo et al. 2013)	BEXIT-F	GCG CGT TCT TAG AAG CTT TG	94°C2分 → (94°C30秒, 58°C45秒, 72°C60秒) × 35サイクル → 72°C1分	246	18SrDNAの一部およびITS2領域を増幅。 <i>B. exitiosa</i> 特異的。 <i>B. ostreae</i> は増幅しない。Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)でDNA抽出, Taq DNA polymeraseで増幅。	-
		BEXIT-R	AAG ATT GAT GTC GGC ATG TCT				
(Ramilo et al. 2013)	BOSTRE-F	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	94°C2分 → (94°C30秒, 57.5°C45秒, 72°C60秒) × 35サイクル → 72°C1分	208 330	18SrDNAの一部およびITS2領域を増幅。 <i>B. exitiosa</i> と <i>B. ostreae</i> の両方を検出するためのmultiplex PCR。Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)でDNA抽出, Taq DNA polymeraseで増幅。 <i>B. ostreae</i> は208bp, <i>B. exitiosa</i> は330bpの位置にバンドが検出される。	-	
	BOSTRE-R	TCG CGG TTG AAT TTT ATC GT					
	BEXIT-R	AAG ATT GAT GTC GGC ATG TCT					

文献

- 1) Cargegie et al. (2000) Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Diseases of Aquatic Organisms, 42, 199-206.
- 2) Cochennec et al. (2000) Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. Journal of Invertebrate Pathology 76, 26-32.
- 3) Engelsma et al. (2010) Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat oysters *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. Marine Ecology Progress Series 409, 131-142.
- 4) Ramilo et al. (2013) Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: conventional, real-time and multiplex PCR. Diseases of Aquatic Organisms, 104, 149-161.