

*Flavobacterium columnare*

Flavobacteriaceae科 フラボバクテリウム属 グラム陰性菌  
淡水魚のカラムナリス病原菌

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	(Welker et al., 2005)	FCISRFL	TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGACA	94°C5分→(94°C30分、55°C45秒、72°C1分)×40サイクル→72°C7分	450~550	このプライマーセットは、 <i>F. columnare</i> の16Sと23SのISR(遺伝子間スペーサー領域)をターゲットとしている。 PCR産物のサイズ: 500~550bp(アメリカ、フランス、イスラエル株) 450~475bp(ブラジル株) 日本の <i>F. columnare</i> においても、500bp前後の増幅産物を確認(ただし、実験に用いた検体は1検体)。	☆☆
		FCISRR1	TAATYRCTAAAGATGTTCTTTCTACTTGTTTG				
	(Bader et al., 2003a, Bader et al., 2003b)	FvpF1	GCCCAGAGAAATTTGGAT	(95°C30秒、59°C30秒、72°C1分)×25サイクル→72°C6分	1193	16SrRNA遺伝子を検出。 引用文献には無いが初期変性を数分行い、サイクル数を40回にするのがよいと思われる。 <i>F. columnare</i> だけでなく、 <i>F. ponti</i> , <i>F. psychrophilum</i> , <i>F. branchiophilum</i> 等の他のフラボバクテリウム属の細菌からもターゲットサイズのバンドが検出される。	—
		FvpR1	TGCGATTACTAGCGAATCC				
	(Toyama et al., 1996)	COL1	TATIGCCTCATTGATT	94°C5分→(94°C1分、56°C1分、72°C2分)×35サイクル→72°C5分	1100	16SrRNA遺伝子を検出。1500Rはユニバーサルプライマーであり、他の細菌も検出される。	—
		1500R	GGTTACCTTGTTACGACTT				
		COLa	AATCGCATGATTCTACT	94°C5分→(94°C1分、56°C1分、72°C2分)×35サイクル→72°C5分	1100	16SrRNA遺伝子を検出。限られた株しか検出できず、特異性も低く、 <i>Pseudomonas</i> 属や <i>Vibrio anguillarum</i> も検出する。	—
		COLb	CGCTCCTGGTCGCCAG				
	(Bader and Shotts, 1998)	Col1	CTGCTTCGTGAAGCAGCT	94°C10分→(94°C2分、58°C2分、72°C2分)×39サイクル→72°C2分	800	16SrRNA遺伝子を検出。	—
		Col2	TACATTTGAATGGCATCATTC				
	(Triyanto et al., 1999)	Col-72F	GAAGGAGCTTGTTCTTT	(94°C30秒、54°C1分、72°C1分)×30サイクル	情報無	16SrRNA遺伝子を検出。 <i>F. columnare</i> の3つの遺伝子型を全て検出する。	—
		Col-1260R	GCCTACTTGCGTAGTG				
		Col-Ta	TTCAGATGGCTTCATTG	(94°C30秒、52°C1分、72°C1分)×30サイクル	情報無	16SrRNA遺伝子を検出。 <i>F. columnare</i> Genomovar1のみを特異的に検出する。	—
		Col-Tb	CCGTTTACGGGCGTTGGAATACAG				
Col-T1		ATTAATGGCATCATTTA	(94°C30秒、56°C1分、72°C1分)×30サイクル	情報無	16SrRNA遺伝子を検出。 <i>F. columnare</i> Genomovar 2のみを特異的に検出する。	—	
Col-T2		TCGTTTACGGCGTGGACTACCA					
Col-T11		GATGTGGCCTCACATTGTG	(94°C30秒、60°C1分、72°C1分)×30サイクル	情報無	16SrRNA遺伝子を検出。 <i>F. columnare</i> Genomovar 3のみを特異的に検出する。	—	
Col-Tb	CCGTTTACGGGCGTTGGAATACAG						

*Flavobacterium columnare* 続き

PCR	(Darwish et al., 2004)	ColF	CAGTGGTCAAATCTGGT	94°C10分→(94°C30秒、45°C30秒、72°C1分)×30サイクル→72°C8分	675	16SrRNA遺伝子を検出。	—
		ColR	GCTCCTACTTGCGTAGT				
	(Yeh et al., 2006)	161F3	CAAGGCAACGATGGGTAGG	94°C2分→(94°C15秒、58°C1分、72°C1分)×40サイクル→72°C10分	204	16SrRNA遺伝子を検出。プライマーセットは、アクセッション番号AY095342の配列をもとに設計されている。	—
		161B3	GCACGGAGTTAGCCGATC				
	(Suebsing et al., 2015)	Fla-F3	CGTTGTATACACATCCGAAGT	95°C5分→(95°C30秒、65°C30秒、72°C30秒)×35サイクル→72°C5分	203	cslA遺伝子を検出。プライマーセットは、アクセッション番号CP003222の配列をもとに設計されている。	—
		Fla-B3	CCTGTACCTAATTGGGGAA				
リアルタイムPCR	TaqMan (Panangala et al., 2007)	FcFp	CCTGTACCTAATTGGGGAAAAGAGG	95°C10分→(95°C15秒、60°C1分)×45サイクル→72°C10分	113	16SrRNA遺伝子を検出。	—
		FcRp	GCGGTTATGGCCTTGTATCATAGA				
		Probe	FAM-ACAACAATGATTTTGCAGGAGGAGTATCTGATGGG-TAMRA				

文献

- Bader, J. A. and E. B. Shotts, Jr. (1998): Identification of flavobacterium and flexibacter species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16s ribosomal rna gene. *J. Aquat. Anim. Health*, 10, 311-319.
- Bader, J. A., K. E. Nusbaum and C. A. Shoemaker (2003a): Comparative challenge model of *Flavobacterium columnare* using abraded and unabraded channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, 26, 461-467.
- Bader, J. A., C. A. Shoemaker and P. H. Klesius (2003b): Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. *J. Microbiol. Methods*, 52, 209-220.
- Darwish, A. M., A. A. Ismaiel, J. C. Newton and J. Tang (2004): Identification of *Flavobacterium columnare* by a species-specific polymerase chain reaction and renaming of ATCC43622 strain to *Flavobacterium johnsoniae*. *Mol. Cell. Probes*, 18, 421-427.
- Panangala, V. S., C. A. Shoemaker and P. H. Klesius (2007): TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Flavobacterium columnare*. *Aquacult. Res.*, 38, 508-517.
- Suebsing, R., R. Suebsing, J. Kampeera, J. Kampeera, S. Sirithammajak, S. Sirithammajak, B. Withyachumnarnkul, B. Withyachumnarnkul, W. Turner and W. Kiatpathomchai (2015): Colorimetric method of loop-mediated isothermal amplification with the pre-addition of calcein for detecting *flavobacterium columnare* and its assessment in tilapia farms. *J. Aquat. Anim. Health*, 27, 38-44.
- Toyama, T., K. Kita-Tsukamoto and H. Wakabayashi (1996): Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16s ribosomal DNA. *Fish Pathol.*, 31, 25-31.
- Triyanto, A. Kumamaru and H. Wakabayashi (1999): The use of PCR targeted 16S rDNA for identification of genomovars of *Flavobacterium columnare*. *Fish Pathol.*, 34, 217-218.
- Welker, T. L., C. A. Shoemaker, C. R. Arias and P. H. Klesius (2005): Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Dis. Aquat. Org.*, 63, 129-138.
- Yeh, H. Y., C. A. Shoemaker and P. H. Klesius (2006): Sensitive and rapid detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 919-925.