

伝染性腭臓壊死症
病原体:RNAウイルス

伝染性腭臓壊死症原因ウイルス (IPNV)

ビルナウイルス科、アクアビルナウイルス属 類似ウイルス; YTAV, VDV

宿主:サケ科魚類

| 区分 | 手法名 (文献) | プライマー | | 反応温度条件 | 増幅 産物 | 備考 | 推奨 度 |
|--|--|-------------------------------|--|---|---|--|---------|
| | | 名称 | 配列(5'-3') | | | | |
| RT-PCR | III/V (1st-RT-PCR) I/II (2nd-PCR) Lopez-Lastra et al., (1994) | III | CGG AAA TAC GAC ATC CAG AGC | 94°C6分→(92°C1分, 55°C2分, 72°C3分)× 40サイクル→72°C5分 | 657 | 原報のRT-PCRは2ステップ法で行う。VP領域を増幅し、 検出限界は1pgウイルスRNA量である。 | — |
| | | V | GCG GTC TGC TGG TTG AGC TGG | | | | |
| | | I | CCA ACT GGG TTT GAC AAG CC | | 263 | III/Vのnested PCR | — |
| | | II | GTC TCA TTG ACG GGT TCG GC | | | | |
| | Pr D1/Pr D2 Blake et al., 1995 | Pr D1 | AAA GCC ATA GCC GCC CAT GAA C | (94°C30秒, 58°C30秒, 72°C1分)×35サイク ル | 174 | 原報は2ステップ法。NSからVP3領域を増幅。検出限界 は1-10 TCID ₅₀ /mL。 | — |
| | | Pr D2 | TCT CAT CAG CTG GCC CAG GTA C | | | | |
| | Pr D Wang et al., 1997 | Pr D プライ マーセット | CGG AAA TAC GAC ATC CAG AGC | 42°C50分→95°C5分→(94°C1分, 55°C1分, 72°C1分30秒)×35サイクル→72°C7分 | 274 | 原報はワンステップ法。VP2領域を増幅する。検出限界 は15fgウイルスRNA量。 | — |
| | | | TGG CTC CGT TCA TGG ACT GG | | | | |
| | Pr F Wang et al., 1997 | Pr Fプライ マーセット | GCC GAC ATC GTC AAC TCC AC | 42°C50分→95°C5分→(94°C1分, 55°C1分, 72°C1分30秒)×35サイクル→72°C7分 | 524 | 原報はワンステップ法。VP2領域を増幅する。検出限界 は15pgウイルスRNA量。 | — |
| | | | GAC AGG ATC ATC TTG GCA TA | | | | |
| | P1/P2 (1st-RT-PCR) P3/P4 (2nd-PCR) Suzuki et al., (1997) | P1 | AGA GAT CAC TGA CTT CAC AAG TGA C | (95°C1分, 48°C1分, 72°C1分)×30サイクル | 359 | 原報は2ステップ法。Segment Aを増幅。検出限界は1pg ウイルスRNA量である。本法は海水魚に感染するアクア ビルナウイルスも検出できる。 | — |
| | | P2 | TGT GCA CCA CAG GAA AGA TGA CTC | | | | |
| | | P3 | CAA CAC TCT TCC CCA TG | | 168 | P1/P2のnested PCR。VP2/NS結合部を増幅する。検出 限界は1fgウイルスRNA量である。本法は海水魚に感染 するアクアビルナウイルスも検出できる。 | — |
| | | P4 | AGA ACC TCC CAG TGT CT | | | | |
| | DIAIPNF/DIAIPNR Taksdal et al., (2001) | DIAIPNF | ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G | 94°C5分→(95°C30秒, 55°C15秒, 72°C30秒) ×40サイクル→72°C7分 | 224 | 原報は2ステップ法。NSからVP3領域を増幅する。ウイル ス分離法よりも感度が良い。 | ☆ |
| | | DIAIPNR | TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC | | | | |
| DIAIPNF/DIAIPNR Kerr et al., (2006) | DIAIPNF | ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G | (94°C1分, 60°C1分, 72°C1分)×35サイクル →72°C7分 | 224 | 原報は2ステップ法。45サイクルでは非特異的バンドが やすい。Taksdal et al., (2001)の変法。 | ☆ | |
| | DIAIPNR | TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC | | | | | |
| DIAIPNF/DIAIPNR (1st-RT-PCR) IPNNESTF/IPNNESTR (2nd-PCR) Ahmadi et al., (2013) | DIAIPNF | ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G | 94°C2.5分→(94°C50秒, 60°C45秒, 72°C50 秒)×35サイクル→72°C5分 | 224 | 原報は2ステップ法。Taksdal et al., (2001)の変法。 | ☆ | |
| | DIAIPNR | TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC | | | | | |
| DIAIPNF/DIAIPNR Soliman et al., (2009) | IPNNESTF | GAC ATC AAA GCA ATC GCA GCC C | 94°C2.5分→(94°C50秒, 55°C45秒, 72°C50 秒)×35サイクル→72°C5分 | 164 | DIAIPNF/DIAIPNRのnested-PCR。Firstと比べると、ア ニール温度が異なる。 | ☆ | |
| | IPNNESTR | AGG TAC TTG ATC CTC TTG TTG G | | | | | |
| DIAIPNF/DIAIPNR Soliman et al., (2009) | DIAIPNF | ATC TGC GGT GTA GAC ATC AAA G | 50°C1時間→94°C5分→(95°C30秒, 55°C15 秒, 72°C30秒)×40サイクル→72°C5分 | 224 | 原報はワンステップ法。Taksdal et al., (2001)の変法。検 出限界は1pgウイルスRNA量(ウイルス1.6x10 ⁵ 粒子数に 相当)である。本論文ではRT-LAMP法も開発しており、 検出限界は0.001fg(ウイルス粒子1.6粒子)である。 | ☆ | |
| | DIAIPNR | TGC AGT TCC TCG TCC ATC CC | | | | | |
| I/II Yoshinaka et al.,(1998) | I | CCA ACT GGG TTT GAC AAG CC | (94°C30秒, 44°C30秒, 72°C1分)×40サイク ル | 263 | Lopez-lastra et al., (1994)のIPNV特異プライマーI/II (VP2領域)およびIHNVの特異プライマーを用いて、1 チューブでIPNVとIHNVを同時に検出できる(Multiplex RT-PCR)。 | — | |
| | II | GTC TCA TTG ACG GGT TCG GC | | | | | |

伝染性豚臓壊死症 続

| | | | | | | | |
|-----------------------------------|--|--|--|---|--|---|---|
| RT-PCR | WB1/WB2 Williams et al.,(1999) | WB1 | CCG CAA CTT ACT TGA GAT CCA TTA TGC | 94°C4分→(94°C30秒, 60°C30秒, 72°C1分30秒)×40サイクル→72°C10分 | 206 | IPNV特異プライマー-WB1/WB2(VP2領域)およびIHNV, VHSVそれぞれの特異プライマーを用いて、1チューブで3種類のウイルスを同時に検出できる(Multiplex RT-PCR)。 | - |
| | | WB2 | CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG | | | | |
| リアルタイムRT-PCR | SYBR 1916F/1999R Bowers et al.,(2008) | 1916F | AGG AGA TGA CAT GTG CTA CAC CG | 95°C10分→(95°C10秒, 60°C60秒)×40サイクル | 84 | 原報は2ステップ法で行う。SYBR® Green (iQ SYBR® Green Supermix)を使用する。検出限界はウイルスRNA量0.01fg(ウイルスゲノム10コピー)である。 | - |
| | | 1999R | CCA GCG AAT ATT TTC TCC ACC A | | | | |
| | TaqMan IPNVSP McBeath et al.,(2007) | IPNVSP-F | GCC AAG ATG ACC CAG TCC AT | 50°C2分→95°C10分→(95°C15秒, 60°C1分)×45サイクル(サイクル毎に蛍光を検出) | 66 | 原報は2ステップ法で行う。VP領域を標的とする。TaqMan® (Applied Biosystems)を使用する。 | - |
| | | IPNVSP Probe | 6FAM- CCG ACC GAG AAC AT -MGB | | | | |
| | | IPNVSP-R | TGA CAG CTT GAC CCT GGT GAT | | | | |
| | TaqMan VP2 Ellis et al.,(2010) | VP2-F | GCC TAC CCC CCG TTC CT | 50°C2分→95°C10分→(95°C15秒, 60°C1分)×45サイクル(サイクル毎に蛍光を検出) | 66 | 原報は2ステップ法で行う。VP領域を標的とする。TaqMan® (Applied Biosystem)を使用する。 | - |
| | | VP2 Probe | 6FAM-CGA CAG GAG CCC TCA C -MGB | | | | |
| | | VP2-R | CCC GTC ACT GTT GTT GAG TTG A | | | | |
| | Sp8 Calleja et al.,(2012) | Sp8 #8 Probe Sp8-R | CTG AAC GGG ACG CTC AAC | 60°C3分→95°C30秒→(95°C15秒, 60°C1分, 72°C10秒)×45サイクル→40°C10秒(サイクル毎に蛍光を検出) | 情報無 | IPNVの40株を材料とし、TaqManを用いて、血清型Sp1に属する株とWB1に属する株のそれぞれの検出系を確立している。LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Diagnostics)を用いて、ワンステップで定量RT-PCRを実施する。 | - |
| | | | GAA GGC AG | | | | |
| | | | TCA GGC TCT CCA CCT CAG AC | | | | |
| | WB117 Calleja et al.,(2012) | WB117-F #117 Probe WB117-R | GCG GTT CGA CTT CAT TCT ACA | 60°C3分→95°C30秒→(95°C15秒, 60°C1分, 72°C10秒)×45サイクル→40°C10秒(サイクル毎に蛍光を検出) | 情報無 | IPNVの40株を材料とし、TaqManを用いて、血清型Sp1に属する株とWB1に属する株のそれぞれの検出系を確立している。LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes (Roche Diagnostics)を用いて、ワンステップで定量RT-PCRを実施する。 | - |
| | | | CTT GGG CT | | | | |
| | | | GAG CTT GTC ACG GAG ACC AC | | | | |
| VP1 Tapia et al., (2015) | VP1F Probe VP1 VP1R | GTT GAT MMA STA CAC CGG AG | 48°C10分→95°C10分→(95°C15秒, 59°C45秒)×40サイクル(サイクル毎に蛍光を検出) | 152 | 原報はワンステップで定量RT-PCRを実施する。AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems)を用いて、segment BのVP1を標的として検出する。 | - | |
| | | 56FAM-TACATAGGC-ZEN-AAAACCAAAGGAGACAC-IABkFQ | | | | | |
| | | AGG TCH CKT ATG AAG GAG TC | | | | | |
| qRT-PCR 2 Tapia et al., (2015) | WB1 WB2 | CCG CAAC TTA CTT GAG ATC CAT TAT GC | 50°C5分→95°C3分→(95°C5秒, 60°C10秒)×40サイクル、70-95°Cで分析する。 | 206 | qRT-PCR 2とqRT-PCR 3はsegment AのVP2を標的とし、2× Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene)を用いて、検出する。 | - | |
| | | CGT CTG GTT CAG ATT CCA CCT GTA GTG | | | | | |
| qRT-PCR 3 Tapia et al., (2015) | VP2F VP2R | TCCAACACTACGAGCTGATCCC | | 164 | | - | |
| | | GTCCTCTCCTTGTACTCCTC | | | | | |

伝染性造血器壊死症 文献

- Ahmadi, N., Oryan, A., Akhlaghi, M. and Hosseini, A. (2013) Tissue distribution of infectious pancreatic necrosis virus serotype Sp in naturally infected cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): an immunohistochemical and nested-PCR study. *J. Fish Dis.*, 36, 629–637.
- Blake, S. L., Schill, W. B., McAllister, P. E., Lee, M., Singer, J. T. and Nicholson, B.L. (1995) Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 835–839.
- Bowers, R. M., Lapatra, S. E. and Dhar, A. K. (2008) Detection and quantitation of infectious pancreatic necrosis virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction using lethal and non-lethal tissue sampling. *J. Virol. Methods*, 147, 226–234.
- Calleja, F., Godoy, M. G., Cárcamo, J. G., Bandín, I. and others (2012) Use of reverse transcription-real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) assays with universal probe library (UPL) probes for the detection and genotyping of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated in Chile. *J. Virol. Methods*, 183, 80–85.
- Ellis, A. E., Cavaco, A., Petrie, A., Lockhart, K., Snow, M. and Collet, B. (2010) Histology, immunocytochemistry and qRT-PCR analysis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., postsmolts following infection with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Fish Dis.*, 33, 787–863.
- Kerr, C. R. C. and Cunningham, C. O. (2006) Moving molecular diagnostics from laboratory to clinical application: a case study using infectious pancreatic necrosis virus serotype A. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 98–104.
- Lopez-Lastra, M., Gonzales, M., Jashes, M. and Sandino, A. M. (1994) A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.*, 17, 269–282.
- McBeath, A. J. A., Snow, M., Secombes, C. J., Ellis, A. E. and Collet, B. (2007) Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 22, 230–241.
- Soliman, H., Midtlyng, P. J. and EL-matbouli, M. (2009) Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, 158, 77–83.
- Suzuki, S., Hosono, N. and Kusuda, R. (1997) Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription- and nested PCR. *J. Mar. Biotechnol.*, 5, 205–209.
- Tapia, D., Eissler, Y., Torres, P., Jorquera, E., Espinoza, J. C. and Kuznar, J. (2015) Detection and phylogenetic analysis of infectious pancreatic necrosis virus in Chile. *Dis. Aquat. Org.*, 116, 173–184.
- Taksdal, T., Dannevig, B. H. and Rimstad, E. (2001) Detection of infectious pancreatic necrosis (IPN)-virus in experimentally infected Atlantic salmon parr by RT-PCR and cell culture isolation. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 21, 214–219.
- Wang, W.S., Wi, Y. L. and Lee, J. S. (1997) Single-tube, non-interrupted reverse transcription PCR for detection of infectious pancreatic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 28, 229–233.
- Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J. T. and Nicholson, B. L. (1999) Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *J. Clin. Microbiol.* 37, 4139–4141.
- Yoshinaka, T., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. (1998) Simultaneous detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *Fish. Sci.*, 64, 650–651.