

病名:パーキンサス症(*Perkinsus* 属原虫感染症)

病原体:*Perkinsus marinus*, *P. olsenii*, *P. chesapeaki*

(*P. qugwadi* に関しては特定疾病病勢鑑定指針を参照)

真核生物 Alveolata, Perkinsozoa門, Perkinsea綱, Perkinsida目 Perkinsideae科

宿主:カキ類, アサリなど2枚貝類。*P. olsenii* は特に宿主域が広く, アワビ類などの巻貝にも感染する。

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	(Audemard et al 2004)	PerkITS-85	CCG CTT TGT TTG GAT CCC	95°C4分→(95°C1分, 55°C1分, 72°C1分)×40サイクル→72°C10分	703	Proteinase K で56°C一晩消化した後, スピнкаラム法で市販のキットを用いDNAを抽出する。rDNAのITS領域を増幅。Taq DNA polymerase (Invitrogen)使用。 <i>Perkinsus</i> 属原虫を検出するが, <i>P. qugwadi</i> は検出しない。OIEマニュアル記載法。原報では同じプライマーセットによりSybrGreenを用いたreal-time PCRも行っている。	☆		
		PerkITS-750	ACA TCA GGC CTT CTA ATG ATG						
	(Audemard et al 2004)	PmarITS-70F	CTT TTG YTW GAG WGT TGC CAG ATG	95°C4分→(94°C1分, 57°C1分, 65°C3分)×40サイクル→65°C10分	509		Proteinase K で57°C一晩消化した後, スピнкаラム法で市販のキットを用いDNAを抽出する。rDNAのITS領域を増幅。Taq DNA polymerase (Invitrogen)使用。 <i>P. marinus</i> を特異的に検出。OIEマニュアル記載法。原報では同じプライマーセットによりSybrGreenを用いたreal-time PCRも行っている。	☆	
		PmarITS-600R	CGA GTT TGC GAG TAC CTC KAG AG						
	(Moss et al 2006)	Pols-140F	GAC CGC CTT AAC GGG CCG TGT T	95°C4分→(94°C1分, 57°C1分, 65°C3分)×40サイクル→65°C10分	450			Proteinase K で57°C一晩消化した後, スピнкаラム法で市販のキットを用いDNAを抽出する。rDNAのITS領域を増幅。Taq DNA polymerase (Invitrogen)使用。 <i>P. olsenii</i> を検出, <i>marinus</i> と <i>chesapeaki</i> は検出せず。OIEマニュアル記載法	☆
		PolsITS-600R	GGR CTT GCG AGC ATC CAA AG						
Real-time PCR	PERK (Gauthier et al 2006)	Forward	TCCGTGAACCACTAGAAATCTCAAC	95°C10分→(95°C15秒, 60°C1分)X40サイクル	86	原報によれば, PERK法は <i>Perkinsus</i> 属を区別せずに検出し, PMAR法は <i>P. marinum</i> を特異的に検出する。Proteinase K で55°Cで一晩消化した後DNAを抽出。TaqMan Universal PCR MasterMix (AmpliQ Gold DNA polymeraseを含む) で増幅。OIEマニュアルでは, 本法は特異性の検証をもっと行う必要があるとされている。ここに示したプライマー配列はJSR25巻2号の本論文の後, JSR25巻3号に掲載された正誤表によった。また, 原報ではPMAR法の増幅産物サイズは72bpとなっているが, 71bpが正しいと思われる。			-
		Reverse	GGAAGAAGAGCGACACTGATATGTA						
		Probe	CCCTTTGTGCAGTATGC-(MGB)						
	PMAR (Gauthier et al 2006)	Forward	TTGTTAACGCAACTCAATGCTTTGT		71		-		
		Reverse	AAGCGCACATAACGAACCACC						
		Probe	GCTTGAACCTAECTCT-(MGB)						
	(De Faveri et al 2009)	Forward	CGC CTG TGA GTA TCT CTC GA		50°C2分, 90°C2分→(95°C30秒, 60°C45秒)X35サイクル→21°C10分		情報無	10% Chelex (Bio-Rad)ないし, Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)でDNAを抽出。ITS領域を増幅。Platinum Quantitative PCR SuperMix UDG (Invitrogen)を使用。ChelexとQiagenのキットでは差が無く, Chelexのほうが簡単に多数のサンプルを処理できるとしている。	-
		Reverse	GTT GAA GAG AAG AAT CGC GTG AT						
		Probe	(56-FAM)-CGC AAA CTC GAC TGT GTT GTG GTG-(3BHQ1)						

文献

Audemard et al. (2004) Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. Applied and Environmental Microbiology 70, 6611-6618.

Moss et al. (2006) Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea Ariakensis* maintained under laboratory conditions. Journal of Shellfish Research 25, 65-72.

Gauthier et al. (2006) TAQMAN MGB Real-time PCR approach to quantification of *Perkinsus marinus* and *Perkinsus* spp. in oysters. Journal of Shellfish Research 25(2), 619-624

Gauthier et al. (2006) ERRATAM Journal of Shellfish Research 25 (3), 1105.

De Faveri et al. (2009) Development and validation of a real-time quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Journal of Shellfish