コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

一般研究用キット

Dembo (Detection of microbes from bovine diseases) -PCR: Primer/Probe/Positive Control Set

ウシ疾患病原体検出用 PCR: プライマー / プローブ / 陽性コントロールセット

Cat. No. DEMBO-P01~P18（Cat. No. は対象病原体ごとに異なります）

2023 年 10 月 30 日作成

www.cosmobio.co.jp

【Ⅰ -1】背景

牛の下痢症、呼吸器疾病、流産は主要な感染性疾患として牛畜産業に甚大な経済的損失をもたらします [1,2,3]。牛の下痢症は牛乳の生産量などを減少させます。特に、子牛は下痢の影響を強く受け、栄養失調と脱水のために死亡し、米国では死亡した離乳子牛の約 57%が下痢によることが報告されています [4]。同じく米国において、呼吸器疾病の罹患率は全ての肥育牛の 70 ～ 80%であり、全ての牛の死亡原因の 40 ～ 50%に達しています [3]。また後期流産のコストは一件あたり 500 ～ 900 US ドルと推定されます [5]。これらの経済的損失については日本を含む全世界で同様の傾向がみられます。主要な感染性疾病の原因微生物を網羅的に特定する検出法は構築されていませんでしたが、近年、東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授のグループにより

（1） 下痢症の原因となる 16 種類のウイルス・細菌・原虫 :
Bovine viral diarrhea virus, Bovine Enterovirus, Rotavirus A, Rotavirus B, Rotavirus C, Bovine torovirus, Mammalian orthreovirus, Bovine leukemia virus, Bovine herpesvirus 1, Bovine Adenovirus 4-7, Pan-*Salmonella*, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberuclosis*, *Clostridium perfringens*, *Enterotoxigenic Escherichia coli*, *Eimeria zuernii*, *Eimeria bovis*

（2） 呼吸器疾病の原因となる 13 種類のウイルス・細菌・原虫 :
Bovine coronavirus, Bovine parainfluenza virus 3, Bovine respiratory syncytial virus, Influenza D virus, Bovine rhinitis A virus, Bovine rhinitis B virus, Bovine adenovirus-3, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*

（3） 流産誘発の原因となる 16 種類のウイルス・細菌・原虫 :
Bluetongue virus, Akabane virus, Chuzan virus, Aino virus, Ibaraki virus, Simbu group, *Chlamydia abortus*, *Neospora caninum*, *Campylobacter fetus* subsp. *Venerealis*, *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Brucella abortus*, *Tritrichomonas foetus*, *Listeria monocytogenes*, Pan-*Aspergillus*, *Leptospira*

を同一反応条件で簡便に検出できるリアルタイム PCR の検出系を開発しました [4,6,7]。
本製品は上記の合計 45 種類の牛感染性疾病病原体のうち、患畜における病原体の把握が特に重要と考えられる 18 種類をそれぞれ特異的かつ定量的に検出可能なリアルタイム PCR 用のプライマー / プローブ / 陽性コントロールのセットです。

* 本品は東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授の技術指導の下に製品化されました

本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。
本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。

【Ⅰ -2】製品の特長

本製品は、リアルタイム PCR 装置を用いてウシ下痢症、呼吸器疾病、流産誘発の病原体由来核酸を検出するために必要なプライマー / プローブおよび陽性コントロールからなるセットです。検出は、PCR の伸長反応の際に Taq DNA polymerase の 5′ → 3′ エキソヌクレアーゼにより鋳型にハイブリダイズした加水分解プローブ (いわゆる TaqMan プローブ) が分解され、解離した標識物質である FAM の蛍光によりおこなわれます。プライマー / プローブの優れた配列デザインにより、各病原体由来核酸を特異的に検出可能であるとともに日本国内で見られる主要な病原体サブタイプは網羅的に検出することができます。すべてのセットは少なくとも 10 コピーの対象病原体核酸を検出可能であることが確認されています。

対象病原体名、検出核酸タイプ、ターゲット領域および参照文献は下表のとおりです。

メーカー略号：CSR

Cat. No.	疾病タイプ	病原体名	検出核酸タイプ	ターゲット領域	Reference No.
DEMBO-P01	下痢	Bovine viral diarrhea virus	RNA	5' UTR	8
DEMBO-P02	下痢	Pan-*Salmonella*	DNA	InvA	9
DEMBO-P03	下痢	*Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberuclosis*	DNA	IS900	10
DEMBO-P18	呼吸器	Bovine coronavirus	RNA	Nucleocapsid	6
DEMBO-P04	呼吸器	Bovine parainfluenza virus 3	RNA	M protein	11
DEMBO-P05	呼吸器	Bovine respiratory syncytial virus	RNA	Nucleocapsid	12
DEMBO-P06	呼吸器	*Mannheimia haemolytica*	DNA	sodA	6
DEMBO-P07	呼吸器	*Pasteurella multocida*	DNA	kmt-1	6
DEMBO-P08	呼吸器	*Mycoplasma bovis*	DNA	oppD	13
DEMBO-P09	呼吸器	*Ureaplasma diversum*	DNA	16S rRNA	14
DEMBO-P10	流産誘発	Akabane virus	RNA	S segment	15
DEMBO-P11	流産誘発	Chuzan virus	RNA	VP7	7
DEMBO-P12	流産誘発	Aino virus	RNA	M polyprotein	7
DEMBO-P13	流産誘発	Ibaraki virus	RNA	Vp3	7
DEMBO-P14	流産誘発	*Neospora caninum*	DNA	NC5	7
DEMBO-P15	流産誘発	*Listeria monocytogenes*	DNA	iap	16
DEMBO-P16	流産誘発	Pan-*Aspergillus*	DNA	18S rRNA	17
DEMBO-P17	流産誘発	*Leptospira*	DNA	lipL32	18

【Ⅰ -3】製品構成品　(Cat. No. DEMBO-P01~P18　共通)

保存温度：-20℃
[20ul 反応系、100 反応分]

内容	容量	仕様
Primer/Probe mix	40μL	10μM each mixture (反応終濃度 0.2μM each)
Positive control template DNA	10μL	1 X 10^7 コピー /μL

* 融解後、数日で使い切らない場合は適量に小分けの上、-20℃で保存してください。
* Primer/Probe mix は蛍光標識プローブを含みますので遮光に留意してください。
* 開封後は Positive control による汚染を避けるため、別な箱での保管を推奨します。

【Ⅱ】本製品以外に必要な主な試薬・機器類

[試薬]

■ 核酸抽出試薬 (推奨)
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) 下痢・呼吸器 (鼻腔拭い液試料)・流産 / ウイルス核酸用
- QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)　下痢・流産 / 細菌・プロトゾア核酸用
- QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (Qiagen)　呼吸器 (鼻腔拭い液試料) / 細菌・プロトゾア核酸用
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)　呼吸器 (臨床試料) / ウイルス核酸用
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)　呼吸器 (臨床試料) / 細菌・プロトゾア核酸

■ 酵素類 (動作確認済み、推奨)
- One step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real time) (TaKaRa Bio)　RNA ウイルス用
- TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher Scientific)　RNA ウイルス用
- Premix Ex Taq (Perfect Real time) (TaKaRa Bio)　DNA ウイルス・細菌・プロトゾア用
- TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific)　DNA ウイルス・細菌・プロトゾア用

[器具]
- マイクロピペット (200μL ～ 2μL)
- マイクロピペット用フィルター付チップ
- マイクロチューブ (2mL ～ 0.5mL)
- 96 ウェル PCR プレート / PCR チューブ

[機器]

■ リアルタイム PCR 装置 (動作確認済み)
- QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics)
- LightCycler Nano (Roche Diagnostics)

【 III 】操作上の注意

(1) Primer/Probe mix および Positive control template DNA を分注する際は必ず新しいディスポーザブルチップを用い、コンタミネーションを避けてください。
(2) 同じくコンタミネーション防止の点から、検体からのサンプルの調製と反応液の調製は別のエリアでおこなうことを推奨します。また汚染のリスクが非常に高くなりますので、反応後の増幅産物を同じエリアで扱わないようにしてください。
(3) 検体からの核酸の抽出、PCR 反応液の調製に関してはそれぞれの試薬の取扱説明書に従ってください。
(4) リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。

【 IV 】操作

【IV-1】サンプルの調製

本製品のうちのいくつかのセットは RNA サンプル用のものです。逆転写による cDNA 合成において良好な結果を得るためには外部からの RNase の混入を避ける必要があります。試験操作は清潔なディスポーザブルグローブを着用し、実験器具に関しては可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。実験台、実験器具の RNase 除去には RNase DNase Away Solution (製品番号 : GD0339-500) 等 RNase 除去試薬の使用をおすすめします。

以下、検体からの鋳型核酸調製例を示します。

[下痢症セット（P01~P03）、流産誘発セット（P10~P17）：糞便検体]

1	牛の糞便検体 (被検牛個体由来およびコントロールとなる健常牛個体由来) を採取し、糞便の重量比率 10% となるように PBS(-) で懸濁する 検出対象がウイルスの場合は 2 ~ 3 、細菌およびプロトゾアの場合は 4 ~ 5 へ
2	1 の 10% 糞便懸濁液から 200μL をマイクロチューブへ分取し、卓上型遠心分離機で 10,000rpm、15 分間遠心、上清の全量を High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) による核酸抽出に供する
3	抽出は High Pure Viral Nucleic Acid Kit のプロトコルにしたがっておこない、最終的な溶出バッファーの液量は 50μL とする
4	1 の 10% 糞便懸濁液から 200μL をマイクロチューブへ分取し、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) による核酸抽出に供する
5	抽出は QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit の「Isolation of DNA from Stool for Pathogen Detection」プロトコルにしたがっておこない、最終的な溶出バッファーの液量は 200μL とする

[呼吸器疾病セット（P04~P09、P18）: 鼻腔拭い液検体]

1	牛の鼻腔拭い液検体（被検牛個体由来およびコントロールとなる健常牛個体由来）を採取し、PBS へ懸濁、懸濁液 1mL をマイクロチューブへ分取、卓上遠心分離機で 14,000g、5 分間遠心する 検出対象がウイルスの場合は 2 ~ 3 、細菌およびプロトゾアの場合は 4 ~ 5 へ
2	1 の検体上清から 200μL を High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) による核酸抽出に供する
3	抽出は High Pure Viral Nucleic Acid Kit のプロトコルにしたがっておこない、最終的な溶出バッファーの液量は 25μL とする
4	1 の検体上清を除去し、沈殿物を QIAamp UCP Pathogen Mini Kit (Qiagen) による核酸抽出に供する
5	抽出は QIAamp UCP Pathogen Mini Kit の「Pretreatment of Microbial DNA from Biological Fluids or Cultures (up to 2 x 10^9 Bacterial or 5 x 10^7 Yeast Cells) (Protocol without Pre-lysis)」プロトコルにしたがっておこない、最終的な溶出バッファーの液量は 50μL とする

【IV-2】リアルタイム PCR 反応液の調製と反応

製品に含まれる Positive control template DNA 溶液 1μL を nuclease free H_2O 99μL に添加し、$1X10^5$ コピー /μL 濃度の溶液 100μL を調製する。この $1X10^5$ コピー /μL 溶液 10μL に nuclease free H_2O 90μL を加え (10 倍希釈)、$1X10^4$ コピー /μL 溶液を調製する。同様の操作で 10 倍希釈溶液の調製を繰り返し、$1X10^3$ コピー /μL、$1X10^2$ コピー /μL、$1X10^1$ コピー /μL、0 コピー /μL(nuclease free H_2O) の標準液を準備する。

上記で調製した各濃度の標準液を【IV-1】で調製した健常牛由来の核酸サンプル (健常牛由来サンプルの用意がない場合は nuclease free H_2O) を等量混合し、検量線作成用の陽性コントロール溶液と陰性コントロール溶液とする。

* コントロール溶液は 2μL/ 反応使用しますので、n=2 で試験する場合は最低 4μL 必要です。調製量は必要に応じて調整してください。

以下、本製品の RNA 用検出セットと One step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real time) (TaKaRa Bio) を用いた実施例、DNA 用検出セットと Premix Ex Taq (Perfect Real time) (TaKaRa Bio) を用いた実施例を示します。

* 反応液は必要な反応数分を Master Mix (バッファー、nuclease free H_2O、Probe/Primer mix、酵素の混液) としてまとめて調製することを推奨します。ピペッティング、分注などの操作を減らすことで実験間のばらつきを防ぐことができます。

（1） 下記に示す反応液を氷上で調製する
鋳型核酸溶液 (抽出核酸液またはコントロール標準溶液) 以外の Master mix を調製し、PCR プレートのウェルに 18μL ずつ分注する

[RNA 用検出セット]

試薬	内容	最終濃度
2 X One step RT-PCR Buffer III	10 μL	1 X
Takara Ex Taq HS (5U/μL)	0.4 μL	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 μL	
Probe/Primer mix	0.4 μL	0.2μM each
Nuclease Free H_2O	6.8 μL	
Total	18 μL	

[DNA 用検出セット]

試薬	内容	最終濃度
Premix Ex Taq (2X)	10 μL	1 X
Probe/Primer mix	0.4 μL	0.2μM each
Nuclease Free H_2O	7.6 μL	
Total	18 μL	

(2) 各ウェルに該当する鋳型核酸溶液を 2μL 分注する*
プレートをシール後、プレートシェイカー等で軽く混和、スピンダウンをおこなってリアルタイム PCR 装置にセットし、下記の温度条件で反応を開始する

* 抽出核酸液の添加量を変更する場合は、最終液量が変わらないように希釈の変更や nuclease free H_2O 量の増減をおこなってください

温度	時間	
45℃	5 min	
95℃	30 sec	
95℃	10 sec	40 cycles
55℃	20 sec	
72℃	20 sec	

(3) 反応終了後、陰性コントロールで増幅曲線が立ち上がっていないことを確認する
陽性コントロールの結果をもとに検量線を作成し、検体サンプルにおける病原体核酸量を判断する

【V】参考文献

[1] Givens MD. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. Theriogenology (2006) 66, 648-654.
[2] Heuer C, Healy A, Zerbini C. Economic effects of exposure to bovine viral diarrhea virus on dairy herds in New Zealand. J Dairy Sci (2007) 90, 5428-5438.
[3] Miles DG. Overview of the North American beef cattle industry and the incidence of bovine respiratory disease (BRD). Anim Health Res Rev (2009) 10, 101-103.
[4] Tsuchiaka S, Masuda T, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Furuya T, Oba M, Katayama Y, Kanda S, Yokoyama T, Mizutani T. Development of a novel detection system for microbes from bovine diarrhea by real-time PCR. J Vet Med Sci (2016) 78, 383-389.
[5] Hilton WM. BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? Anim Health Res Rev (2014) 15, 120-122.
[6] Kishimoto M, Tsuchiaka S, Rahpaya SS, Hasebe A, Otsu K, Sugimura S, Kobayashi S, Komatsu N, Nagai M, Omatsu T, Naoi Y, Sano K, Okazaki-Terashima S, Oba M, Katayama Y, Sato R, Asai T, Mizutani T. Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with bovine respiratory disease complex. J Vet Med Sci (2017) 79, 517-523.
[7] Rahpaya SS, Tsuchiaka S, Kishimoto M, Oba M, Katayama Y, Nunomura Y, Kokawa S, Kimura T, Kobayashi A, Kirino Y, Okabayashi T, Nonaka N, Mekata H, Aoki H, Shiokawa M, Umetsu M, Morita T, Hasebe A, Otsu K, Asai T, Yamaguchi T, Makino S, Murata Y, Jan Abi AJ, Omatsu T, Mizutani T. Dembo polymerase chain reaction technique for detection of bovine abortion, diarrhea, and respiratory disease complex infectious agents in potential vectors and reservoirs. J Vet Sci (2018) 19, 350-357.
[8] Mahlum CE, Haugerud S, Shivers JL, Rossow KD, Goyal SM, Collins JE Faaberg KS. Detection of bovine viral diarrhea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest (2002) 14, 120–125.
[9] Suo B, He Y, Tu SI, Shi X. A Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157, and Listeria monocytogenes in Meat Products. Foodborne Pathogens and Disease (2010) 7, 619-628.

[10] Logar K, Kopinč R, Bandelj P, Starič J, Lapanje A, Ocepek M. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in subclinically infected dairy cattle: comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. BMC Vet Res (2012) 8, 1-10.

[11] Horwood PF, Mahony TJ. Multiplex real-time RT-PCR detection of three viruses associated with the bovine respiratory disease complex. J Virol Methods (2011) 171, 360–363.

[12] Boxus M, Letellier C, Kerkhofs P. Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus. J Virol Methods (2005) 125, 125–130.

[13] Sachse K, Salam HSH, Diller R, Schubert E, Hoffmann B, Hotzel H. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate Mycoplasma bovis infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. Vet J (2010) 186, 299–303.

[14] Marques LM, Amorim AT, Martins HB, Rezende IS, Barbosa MS, Lobão TN, Campos GB. Timenetsky J. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of Ureaplasma diversum. Vet Microbiol (2013) 167, 670–674.

[15] Shirafuji H, Yazaki R, Shuto Y, Yanase T, Kato T, Ishikura Y, Sakaguchi Z, Suzuki M, Yamakawa M. Broad-range detection of arboviruses belonging to Simbu serogroup lineage 1 and specific detection of Akabane, Aino and Peaton viruses by newly developed multiple TaqMan assays. J Virol Methods (2015) 225, 9-15.

[16] Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Scortti M, Esteve T, Vázquez-Boland JA, Pla M. Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by real-time PCR: assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology. Appl Environ Microbiol (2004) 70, 1366-1377.

[17] Luong ML, Clancy CJ, Vadnerkar A, Kwak EJ, Silveira FP, Wissel MC, Grantham KJ, Shields RK, Crespo M, Pilewski J, Toyoda Y, Kleiboeker SB, Pakstis D, Reddy SK, Walsh TJ, Nguyen MH. Comparison of an Aspergillus real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalvelolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. Clin Infect Dis (2011) 52, 1218-1226.

[18] Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis (2009) 64, 247-255.

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただいて投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法		
	郵　送	〒047-0261　北海道小樽市銭函 3 丁目 513 番 2 コスモ・バイオ株式会社　札幌事業所 宛
	E-mail	primarycell@cosmobio.co.jp　※ PDF ファイルにてお送りください。

13224

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : http://www.cosmobio.co.jp/
● 営業部（お問い合わせ）
TEL : (03) 5632-9610　FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）
TEL : (0134) 61-2301　FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp