

## 毛包を用いた免疫ペルオキシダーゼ法による牛ウイルス性 下痢ウイルス持続感染牛の簡易検出法

福成和博<sup>1)†</sup>八重樫岳司<sup>1)</sup>亀山健一郎<sup>2)</sup>

1) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0605 滝沢市砂込 390-5)

2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2017年10月12日受付・2017年12月22日受理)

### 要 約

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の持続感染 (PI) 牛を簡易に検出可能な毛包を用いた免疫ペルオキシダーゼ (毛包 IPO) 法を確立した。PI 牛 41 頭、非感染牛 60 頭の尾房部から得た毛包材料の毛包 IPO 法の成績は、血液を用いたウイルス分離 (VI) 及び RT-PCR のそれらと高い一致率を示したが、ウイルス血症を呈した急性感染牛 2 頭では陰性となり、RT-PCR の成績とは異なった。毛包 IPO 法は、高い移行抗体の影響により VI 陰性となった PI 子牛においても陽性であった。また、毛包材料は -20℃ 以下の長期保存が可能であった。毛包 IPO 法による PI 牛の検出は、VI 及び RT-PCR と同等の精度で、安価かつ短時間での実施が可能であった。本法の活用は、PI 疑い牛及び移行抗体保有牛などの個体検査に適していると考えられ、既存の検査法との組み合わせにより、PI 牛の検出が効率的に行えることが示唆された。

——キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)、毛包、免疫ペルオキシダーゼ (IPO) 法、持続感染 (PI)。

-----日獣会誌 71, 179~184 (2018)

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) は、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類され [1]、牛への感染により繁殖障害、先天性の奇形、持続感染 (PI) 牛の出生、粘膜病及び急性感染 (TI) を含むさまざまな症状を引き起こす [2, 3]。PI 牛は生涯にわたり分泌物及び排泄物に多量のウイルスを排出し、他の牛への主要な感染源となる [4]。畜産経営に大きな経済的損失を及ぼす本病の対策として、ワクチン接種並びに PI 牛の早期診断及び牛群からの早期排除が重要である [5-7]。

PI 牛の検出には、ウイルス分離 (VI)、RT-PCR、抗原検出用 ELISA 及び免疫組織化学 (IHC) などの種々の検査が利用されている [8]。抗ペスチウイルスモノクローナル抗体 (MAb) を用いた免疫ペルオキシダーゼ (IPO) 法 [9] は、BVDV 抗原を簡便・迅速に検出することが可能であり、VI の変法として多くの BVDV 検査に利用されている。VI は、BVDV の非細胞病原性 (NCP) 株及び細胞病原性 (CP) 株の区別のために必要な検査であるが、結果の判定に数日を要する。RT-PCR

及び抗原検出用 ELISA は、他の検査に比べてコストがかかり、特殊な機器が必要である。また、BVDV 検査には、対象牛の生死及び移行抗体の保有の有無によって異なる材料が要求される [8, 10, 11]。

PI 牛における皮膚の毛包上皮細胞は、BVDV が局在する最も共通した部位であり [12]、その IHC は移行抗体の影響を受けない。海外では子牛に耳刻をする際に得られる皮膚組織が、新生子牛の BVDV スクリーニングに利用されている [7]。また、Singh ら [13] は、PI 牛の耳から採取した毛を 30 本以上用いた定量リアルタイム RT-PCR の成績は、白血球を用いた同 PCR または皮膚組織を用いた IHC の成績と同等であることを報告している。毛の採取には特殊な器具や技術を必要としないため、利便性が高く、輸送も容易である。皮膚から抜かれた毛には、毛包上皮細胞が残存していることが予想されるため、BVDV 抗原を簡便・迅速に検出する IPO 法の材料として毛包が利用できると考えられる。

この報告の目的は、毛包を用いた IPO (毛包 IPO) 法、

† 連絡責任者：福成和博 (岩手県中央家畜保健衛生所)

〒020-0605 滝沢市砂込 390-5 ☎019-688-4111 FAX 019-688-4012 E-mail: k-fukunari@pref.iwate.jp

VI 及び RT-PCR の BVDV 検査成績を比較し、PI 牛を簡易に検出するための検査法を確立することである。

### 材料及び方法

**検査材料 (表 1) :** 2012 年 10 月～2015 年 2 月に岩手県内で確認された 1 日齢～5 歳齢の PI 牛 41 頭 (ホルスタイン種 31 頭, 黒毛和種 7 頭, 交雑種 3 頭) 及び 1～27 日齢の非感染子牛 60 頭 (ホルスタイン種 8 頭, 交雑種 52 頭) の計 101 頭を本研究に供した。PI 牛 41 頭は、3 週間隔で採取された血液を用いた VI [9] または RT-PCR [14] により、いずれも陽性となることを確認した。PI 及び非感染の確認後、毛包が付着した毛を採取した。PI 牛 41 頭のうち 3 頭 (No. 11, 19 及び 25) は粘膜病を発症しており、発育不良、持続的な下痢及び口唇または蹄にび爛が認められた。残りの PI 牛 37 頭は粘膜病を発症しておらず、血便 (No. 15) を呈した 1 頭以外に臨床症状は認められなかった。

**ウイルス学的検査 :** PI 牛 41 頭及び非感染牛 60 頭の血清または白血球を用いて、VI 及び RT-PCR を実施した。また、既報 [15] と同様に PCR 産物を用いたダイレクトシーケンスを行い、分子系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。抗体検査は非働化血清、BVDV 1 型 (Nose 株) 及び BVDV 2 型 (KZ-91CP 株) を用いた中和試験により実施した [16]。

**急性感染試験 :** BVDV に対する抗体をもたない 3 頭の子牛のうち、2 頭に BVDV 1 型の NCP 株である Tochigi/11/09 株 ( $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/2ml/頭) を経鼻内に噴霧接種した。残り 1 頭の子牛は、陰性対照として MEM を同部位に噴霧接種した。接種 2, 4～11, 14, 21, 28 及び 35 日後に毛包及び血液材料を採取し、感染の成立について血清を用いた RT-PCR 及び中和試験で確認した。

**毛包材料の処理 :** 毛包 IPO 法に用いる毛包材料の採取部位の選定に際しては、PI 牛の耳、体表及び尾房部の毛を採取して検討した。耳及び体表の毛は短毛で、休止期にある状態が多く、棍棒状を示し、そこに毛包上皮が確認された。他方、尾房部の毛は長毛で、成長期の状態が多く、毛包上皮及び毛乳頭が確認され、それらのサイズは他に比べ大きかったことから、以降の検査には同部位を採用した。同材料は、1 頭につき 5 本の毛を紙テープ (Labeling tape, Shamrock Scientific Specialty Systems, U.S.A.) に巻き付けて使用した。

**毛包 IPO 法 :** 紙テープに巻き付けた毛包材料を 4℃ で 10 分間、20% アセトン溶液に浸漬後、蒸留水で 3% に希釈した過酸化水素水に室温で 5 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。同材料を PBS で 1 回洗浄し、常法 [9] を応用した IPO 法を行った。詳細には、同材料を抗体希釈液 (1% 牛血清アルブミン及び

0.1% Tween 20 添加 PBS) で 500 倍希釈した 1 次抗体 (JCU/BVD/CF10, TropBio, Australia) で 37℃, 30 分間反応させた。この JCU/BVD/CF10 は、国内で分離される BVDV 株に広く反応することを確認している (データ示さず)。1 次抗体の反応後、0.1% Tween 20 添加 PBS (PBST) で 2 回洗浄し、同希釈液で 1,000 倍希釈した 2 次抗体 (Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate, バイオ・ラッドラボラトリーズ株, 東京) で 37℃, 30 分間反応させた。再度 PBST で 1 回洗浄し、発色基質液 (pH5 の 0.05M 酢酸緩衝液 10ml に 4mg の 3-Amino-9-ethylcarbazole 及び 5 $\mu$ l の 30% 過酸化水素水を添加) で 37℃, 30 分間反応させた。PBS を滴下したスライドガラス上に染色した毛包材料を浸漬し、顕微鏡下で毛包上皮及び毛乳頭の細胞質内に BVDV 抗原が特異的に認められた検体を陽性とした。PI 牛及び非感染牛の毛包 IPO 法による成績は、それらの血液を用いた VI 及び RT-PCR によって得られたそれぞれの成績と比較した。

**毛包内 BVDV 抗原の安定性 :** PI 牛 10 頭から 1 頭につき 5 本の毛を採取し、各検体を 1.5ml チューブに入れて保存した。保存温度は 37℃, 20℃, 4℃, -20℃ 及び -80℃ とし、保存後 1 週, 2 週, 1 カ月, 2 カ月及び 3 カ月の時点で毛包 IPO 法を実施した。各保存温度における陽性検体数を比較した。

### 成 績

**ウイルス学的検査成績 (表 1) :** PI と診断された牛 41 頭から 40 株の BVDV が分離された。40 株のうち 37 株は NCP 株で、他の 3 株は CP 株であった。CP 株が分離された 3 頭 (No. 11, 19, 25) は粘膜病と診断された。RT-PCR は、PI 牛 41 頭すべて陽性であった。各ウイルスの遺伝子型は 1 型が 38 株、2 型が 3 株であった。41 頭中 2 頭 (No. 36, 38) の PI 牛は BVDV 1 型及び BVDV 2 型を中和する抗体 (中和抗体) を保有しており、1 頭 (No. 7) は BVDV 1 型の中和抗体のみ保有していた。他の 38 頭の PI 牛は BVDV 1 型及び BVDV 2 型の中和抗体を保有していなかった。BVDV 感染を否定した 60 頭の白血球材料を用いた VI または RT-PCR はすべて陰性であった。

**各検査成績の比較 (表 1) :** 41 頭の PI 牛から得た検体の毛包 IPO 法は、すべて陽性を示した。同法陽性検体では、毛包を構成する外毛根鞘の細胞質内が特異的に染色された (図)。PI 牛の血清を用いた RT-PCR はすべて陽性を示した。血液を用いた VI では、血清中に BVDV 1 型及び BVDV 2 型の高い中和抗体を保有する PI 牛 1 頭 (No. 38) のみ陰性であった。白血球を用いた VI または RT-PCR により陰性が確認された 60 頭の

表1 試験に用いた個体及びBVDV検査成績

No.	品種*	日齢・月齢	病態**	毛包IPO法		ウイルス分離		RT-PCR		中和試験		遺伝子型
				毛包	血清	白血球	血清	白血球	BVDV 1型	BVDV 2型		
1	H	66カ月齢	PI	+	NCP	NT***	+	NT	<1:2	<1:2	1	
2	B	64カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
3	H	48カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	+	<1:2	<1:2	1	
4	H	37カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
5	H	36カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
6	H	31カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	+	<1:2	<1:2	1	
7	H	28カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	+	1:8	<1:2	1	
8	H	24カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
9	B	23カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	+	<1:2	<1:2	1	
10	H	22カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
11	B	22カ月齢	MD	+	CP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
12	H	19カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	+	<1:2	<1:2	1	
13~14	H	18カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	+	<1:2	<1:2	1	
15~16	H	17カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	+	<1:2	<1:2	1	
17~18	H	16カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	+	<1:2	<1:2	1	
19	H	13カ月齢	MD	+	CP	CP	+	+	<1:2	<1:2	1	
20	H	13カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	NT	<1:2	<1:2	1	
21~22	H	12カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	+	<1:2	<1:2	1	
23~24	H	11カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	+	<1:2	<1:2	1	
25	F1	10カ月齢	MD	+	CP	NT	+	+	<1:2	<1:2	1	
26	H	10カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
27	H	9カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
28	H	7カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
29~30	H	5カ月齢	PI	+	NCP	NCP	NT	+	<1:2	<1:2	1	
31~32	H	4カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	NT	<1:2	<1:2	1	
33	B	3カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	1	
34	H	2カ月齢	PI	+	NCP	NCP	NT	+	<1:2	<1:2	1	
35	B	1カ月齢	PI	+	NCP	NCP	+	+	<1:2	<1:2	1	
36	F1	25日齢	PI	+	NCP	NCP	NT	+	1:32	1:64	1	
37	H	8日齢	PI	+	NCP	NCP	NT	+	<1:2	<1:2	1	
38	F1	1日齢	PI	+	-	-	NT	+	≥1:4,096	≥1:4,096	1	
39	H	25カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	2	
40~41	B	13カ月齢	PI	+	NCP	NT	+	NT	<1:2	<1:2	2	
42~101	F1	1~27日齢	非感染	-	-	-	-	-	NT	NT		

\*: H=ホルスタイン種, B=黒毛和種, F1=交雑種 (H×B)

\*\* : PI=持続感染, MD=粘膜病

\*\*\* : NT=未試験

非感染牛から得た検体の毛包IPO法は、すべて陰性であった(図)。毛包IPO法の検査所要時間(2時間)は、VIのそれ(4日間)と比べて短かった。1検体当たりの検査試薬費用は、毛包IPO法(約31円)が、RT-PCR(約1,505円)と比べて安価であった。

**急性感染牛の検査成績(表2):** BVDV 1型のNCP株を経鼻接種した子牛2頭は、接種4~8日後に血清中からBVDV遺伝子が検出され、14~21日後にはBVDV 1型の中和抗体が検出された。ウイルス血症を呈した時期を含め、試験期間内に採取された毛包を用いたIPO法は全例陰性であった。

**毛包内BVDV抗原の安定性(表3):** 37℃で保存された検体は毛包IPO法により、すべて陰性となった。20℃では保存後1週まで、4℃では1カ月まで陽性であっ

た。さらに、-20℃以下では保存後3カ月においても全検体陽性であった。

## 考 察

毛包IPO法の成績は、VI及びRT-PCRのそれらと高い一致率を示した。血液からウイルスが分離されなかったPI子牛1頭(No. 38)は、BVDVの高い移行抗体を保有していた。培養細胞におけるウイルスの増殖に干渉する移行抗体を有する可能性のあるおおむね3カ月齢未満の子牛から得られた血清はVI材料として適切ではない[8, 17]。この理由から、若齢子牛の検査には、白血球を用いたVI及びRT-PCR並びに皮膚生検材料を用いたIHCが使用されている[8, 18, 19]。VI陰性のPI子牛を含むBVDVの中和抗体を保有した3頭が、毛

毛包 IPO 法による BVDV 簡易検出法

表2 BVDV を経鼻接種した子牛の検査成績

No.	感染状態	接種後日数						
		0, 2	4	5~7	8	9~11	14	21, 28, 35
1	TI**	-/-/-*	-/+/-	-/+/-	-/-/-	-/-/-	-/-/+	-/-/+
2	TI	-/-/-	-/-/-	-/+/-	-/+/-	-/-/-	-/-/-	-/-/+
3	非感染	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-

\*: +及び-は, 毛根 IPO/RT-PCR/ 中和試験の各結果を示す.  
 \*\*: TI=急性感染

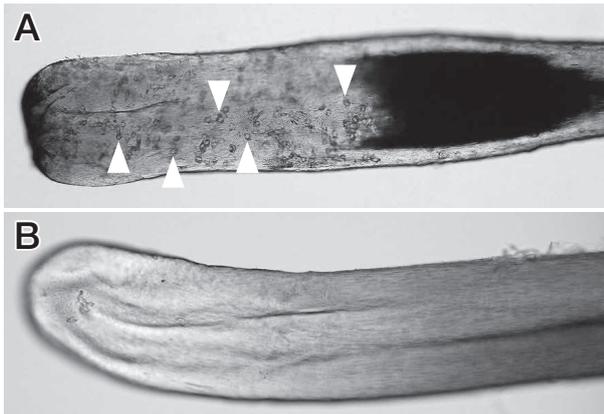


図 毛包 IPO 法の染色像 (×200)  
 A: PI 牛の毛包. 毛包を構成する外毛根鞘の細胞質内に BVDV 抗原 (矢頭) が認められる.  
 B: BVDV 非感染牛の毛包. 毛包を構成する外毛根鞘の細胞質内に BVDV 抗原は認められない.

包 IPO 法及び RT-PCR によって, ともに陽性となった成績は, 両法が IHC 同様に中和抗体の影響を受けないことを示唆した. IHC は, 材料の調整に数日を要すること及び複数の処理過程により, 技術的なエラーを起こしやすい [10, 11]. 毛包 IPO 法は IHC に比べ処理過程も少なく, 判定も簡易であった. 粘膜病を発症した牛3頭の毛包 IPO 法の染色像は, 同病未発症の PI 牛におけるそれらと同一であり, 両病態の区別はできなかった.

毛包内の BVDV 抗原は, -20℃ 以下において長期間安定していたことから, PI 牛から得た毛包材料の凍結保存により, 毛包 IPO 法の陽性対照として利用可能であった. 同抗原は 20℃ で 1 週間安定しており, 材料の送付方法においても特段の配慮は必要ないように思われた. また, 気温の高い夏場を除き死亡した牛から得た毛包材料を用いて BVDV 検査が可能であることが推察された.

PI 牛の確定診断は, 経過血液を用いた 2 回の検査が必要であるため, 通常, 診断までに約 1 カ月間を要する. Njaa ら [12] は, TI 牛から得られた皮膚生検材料を用いた IHC の多くが陰性であり, その理由として TI 牛のウイルス量が PI 牛と比べて少ないためであると推察している. われわれが 2 頭の子牛を用いて実施した急性感

表3 さまざまな保存条件下における毛包 IPO 法による毛包内 BVDV 抗原の陽性数

保存温度	保存期間				
	1 週間	2 週間	1 カ月間	2 カ月間	3 カ月間
37℃	0*	5	0	0	0
20℃	50	20	15	10	0
4℃	50	50	50	40	35
-20℃	50	50	50	50	50
-80℃	50	50	50	50	50

\*: 分母 (n=50)

染試験においても, 接種 4~8 日後に両個体とも RT-PCR 陽性を示したものの, 毛根 IPO 法は試験期間を通して全検体陰性であった (表2). このため, 毛包 IPO 法により陽性となった場合, PI 牛と診断できる可能性が示唆され, 診断期間の大幅な短縮が期待されたが, 今後さらなる検証が必要である.

以上から, 確立した毛包 IPO 法は, VI 及び RT-PCR と同等に PI 牛を検出できることが示唆された. また, 毛包 IPO 法は, 特殊な機器を必要としないことから, 細胞培養及び遺伝子検査設備のない施設でも短時間内において安価に PI 牛を検出することが可能と考えられた.

毛包 IPO 法により, TI 牛の BVDV 抗原は検出されず, また, PI と粘膜病の区別はできなかった. TI 牛の検査には RT-PCR, 粘膜病の診断には VI をそれぞれ実施する必要がある. また, 多頭数を対象とした BVDV 検査には, 抗原 ELISA [8] 及びバルク乳検査 [20, 21] が適している. 毛包 IPO 法は, PI 牛摘発農場で産まれる子牛の調査や PI が疑われる発育不良牛, 虚弱牛及び死亡牛などの個体検査への活用に適していると考えられた.

本法の活用により PI 牛を早期に検出できる検査体制がより充実し, BVDV 清浄化対策の一助となることを期待する.

本稿を執筆するにあたり, 多大な指導, 助言をいただいた北海道大学の迫田義博教授に深謝する.

引用文献

[1] Simmonds P, Becher P, Collett MS, Gould EA, Heinz

- FX, Meyers G, Monath T, Pletnev A, Rice CM, Stiasny K, Thiel HJ, Weiner A, Bukh J : Family *Flaviviridae*, Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, King AMQ, et al eds, 1003-1020, Elsevier, San Diego (2012)
- [2] Baker JC : Bovine viral diarrhoea virus: a review, *J Am Vet Med Assoc*, 190, 1449-1458 (1987)
- [3] 田島誉士 : 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, *日獣会誌*, 65, 111-117 (2012)
- [4] Houe H : Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus, *Vet Clin N Am-Food A*, 11, 521-547 (1995)
- [5] Houe H : Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections, *Vet Microbiol*, 64, 89-107 (1999)
- [6] Houe H : Economic impact of BVDV infection in dairies, *Biologicals*, 31, 137-143 (2003)
- [7] 関口 敏 : 欧米における牛ウイルス性下痢ウイルス感染症のリスクアナリシスとコントロール —スイスの例を中心に—, *日獣会誌*, 65, 591-596 (2012)
- [8] Saliki JT, Dubovi EJ : Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections, *Vet Clin N Am-Food A*, 20, 69-83 (2004)
- [9] Saino H, Watanabe H, Ikehata T : Immunoperoxidase procedures for rapid detection of bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus antigen, *J Vet Med Sci*, 56, 805-807 (1994)
- [10] Cornish TE, van Olphen AL, Cavender JL, Edwards JM, Jaeger PT, Vieyra LL, Woodard LF, Miller DR, O' Toole D : Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, *J Vet Diagn Invest*, 17, 110-117 (2005)
- [11] Driskell EA, Ridpath JF, Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR : A survey of bovine viral diarrhoea virus testing in diagnostic laboratories in the United States from 2004 to 2005, *J Vet Diagn Invest*, 18, 600-605 (2006)
- [12] Njaa BL, Clark EG, Janzen E, Ellis JA, Haines DM : Diagnosis of persistent bovine viral diarrhoea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens, *J Vet Diagn Invest*, 12, 393-399 (2000)
- [13] Singh K, Miller MM, Kohrt LJ, Scherba G, Garrett EF, Fredrickson RL : Development of a novel diagnostic test for detection of bovine viral diarrhoea persistently infected animals using hair, *J Vet Sci*, 12, 295-297 (2011)
- [14] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)
- [15] 福成和博, 八重樫岳司, 千葉 伸, 亀山健一郎 : 岩手県内の農場で死亡した牛における牛ウイルス性下痢ウイルスの感染状況調査, *日獣会誌*, 66, 785-790 (2013)
- [16] Shimizu M, Satou K : Frequency of persistent infection of cattle with bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus in epidemic areas, *Jpn J Vet Sci*, 49, 1045-1051 (1987)
- [17] Brock KV, Grooms DL, Ridpath J, Bolin SR : Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, *J Vet Diagn Invest*, 10, 22-26 (1998)
- [18] Grooms DL, Keilen ED : Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples, *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 898-900 (2002)
- [19] Zimmer GM, Van Maanen C, De Goey I, Brinkhof J, Wentink GH : The effect of maternal antibodies on the detection of bovine virus diarrhoea virus in peripheral blood samples, *Vet Microbiol*, 100, 145-149 (2004)
- [20] Kozasa T, Tajima T, Yasutomi I, Sano K, Ohashi K, Onuma M : Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR, *Vet Microbiol*, 106, 41-47 (2005)
- [21] Radwan GS, Brock KV, Hogan JS, Smith KL : Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus, *Vet Microbiol*, 44, 77-91 (1995)

Detection of Persistent Bovine Viral Diarrhea Virus in Infected Cattle  
by Immunoperoxidase Method Using Hair Follicles

Kazuhiro FUKUNARI<sup>1)†</sup>, Gakuji YAEGASHI<sup>1)</sup> and Kenichiro KAMEYAMA<sup>2)</sup>

1) *Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunagome, Takizawa, 020-0605, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

In this study, a simple immunoperoxidase method using hair follicles (HF-IPO) was established for the detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in persistently infected (PI) animals. A positive result was observed for samples of hair follicles obtained from 41 cattle PI with BVDV but not for those obtained from 60 uninfected animals. These results highly agreed with those obtained by virus isolation (VI) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) performed on blood samples. However, two transiently infected calves with viremia showed a negative result by HF-IPO and a positive result by RT-PCR. Positive results were also confirmed by HF-IPO in VI-negative PI neonatal calves due to possible interference of maternal antibodies. Furthermore, BVDV antigen was detectable for a long period in hair samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . These results indicate that HF-IPO can quickly and inexpensively detect PI animals with equal sensitivity to VI and RT-PCR. This method was considered suitable for individual tests in calves with maternal antibodies and suspected PI. Therefore, it could improve the diagnostic efficacy of BVDV infection by adding to the conventional diagnostic procedure.

— Key words : Bovine viral diarrhoea virus, hair follicles, immunoperoxidase method, persistent infection.

† Correspondence to : Kazuhiro FUKUNARI (*Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center*)

*390-5 Sunagome, Takizawa, 020-0605, Japan*

*TEL 019-688-4111 FAX 019-688-4012 E-mail : k-fukunari@pref.iwate.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 179 ~ 184 (2018)*