

移行抗体を保有する牛ウイルス性下痢ウイルス 持続感染牛の血清中遺伝子量の調査

宮根和弘^{1)†} 松田さく¹⁾ 開 理奈¹⁾ 藤本彩子¹⁾ 菅野 徹²⁾

1) 北海道上川家畜保健衛生所 (〒071-8154 旭川市東鷹栖4線15号)

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北海道研究拠点
(〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

(2018年2月17日受付・2018年9月3日受理)

要 約

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 持続感染牛 (PI 牛) の血清中 BVDV 遺伝子量 (コピー数) を調査し, RT-PCR による診断材料として移行抗体を保有する哺育期 PI 牛血清が妥当であるかを検討した。また, PI 牛摘発のスクリーニングに用いられるプール血清とした場合の影響も検討した。抗体陽性血清の最小値は 2.17×10^4 コピーと, RT-PCR の検出限界 (約 6.25×10^3 コピー) 以上であったが, 抗体価が高いほどコピー数は有意に低かった。既報による, 初乳中の抗体により BVDV 量が一過性に低下するとの結果が, 今回初めて野外材料を用いて確認された。プール血清の RT-PCR は低コピー数検体の希釈血清で不明瞭な反応となった。これらから, 哺育期 PI 牛血清を RT-PCR の診断材料とすることは妥当であるが, プール血清はコピー数の一過性低下を考慮する必要があると考えられた。

——キーワード: 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV), 移行抗体, 遺伝子量, 血清, 低下。

-----日獣会誌 72, 33~38 (2019)

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の感染は, 牛に下痢症, 呼吸器症状, 異常産等を引きこし, 農場に経済的損失をもたらしている [1-3]。BVDV の感染様式で重要となるのは胎子期での感染であり, 妊娠初期の母牛に感染した場合, 免疫寛容状態となり生まれてくるのが持続感染 (PI) 牛である [4, 5]。PI 牛は, 生涯にわたってウイルスを排泄するため農場内での感染源となる [4, 6, 7]。このため, BVDV のコントロールには PI 牛の早期摘発・淘汰が重要とされている。

BVDV は遺伝学的に BVDV-1 と BVDV-2 に分類 [8, 9] され, 北海道内で分離されているのは BVDV-1 が約 71%, BVDV-2 が約 29% と報告されている [10]。また, 海外では BVDV-1 や BVDV-2 とは異なる BVDV-3 も報告 [11] されているが, これまでのところ国内で確認の報告はない。

BVDV の診断は, PI 牛が持続感染している BVDV に対する抗体を産生しないことから, 血清を材料としてウイルス分離, 抗原検出 ELISA, RT-PCR 等が手法として用いられている [12-14]。しかし, 母牛からの移行

抗体を保有する哺育牛では, その干渉によりウイルス分離や抗原検出 ELISA の結果が偽陰性を示す可能性があり [12, 14, 15], このため白血球を用いることが常法とされてきた [13, 14]。一方, RT-PCR は抗体の干渉を受けない [16] とされ, 哺育牛の血清を材料とした診断が可能と考えられるが, 移行抗体を保有する PI 牛の血清及びリンパ球中の BVDV 量は一時的に低下するとの報告 [17] がある。しかし, 野外材料での検証が実施されていないことから, われわれはリアルタイム RT-PCR により PI 牛の血清中 BVDV 遺伝子を定量することにより, 移行抗体を保有する哺育期 PI 牛の血清中 BVDV 量を調査し, 哺育期 PI 牛の RT-PCR による診断材料として血清が妥当であるかを検討したので報告する。また, あわせて PI 牛摘発の有効なスクリーニング方法 [18, 19] とされるプール血清を用いた RT-PCR が, 哺育期血清でも有用であるかについても検討したので報告する。

† 連絡責任者(現所属): 宮根和弘 (北海道十勝家畜保健衛生所)

〒089-1182 帯広市川西町基線 59 番地 6

☎ 0155-59-2021 FAX 0155-59-2571

E-mail: miyane.kazuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

材料及び方法

材料：材料として用いた PI 牛血清は 52 検体で、そのうち BVDV に対する抗体陽性は 24 検体、抗体陰性は 28 検体であった。抗体陽性血清の採材時日齢は、2～36 日齢であり保有する抗体はすべて移行抗体と考えられた。抗体の有無の判定は、持続感染している BVDV と同一遺伝子型の指示ウイルスを使用した中和試験の値から抗体価を求め、2 倍以上を陽性と判定した。また、血清との比較のため、白血球についても 18 検体を材料として用いた。血液からの白血球単離は、EDTA 血液 1ml を 0.83% 塩化アンモニウム液で溶血し、PBS(-) で洗浄・遠心を 3 回繰り返した沈査を PBS(-) 1ml に浮遊し検体とした。

RNA 抽出：検体からの RNA 抽出は、血清、白血球ともに 200 μ l から市販キット (High Pure Viral RNA Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス株, 東京) を用いて抽出を実施し、最終液量を 50 μ l とした。

RT-PCR 及び遺伝子型別：RT-PCR は、市販キット (PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2, タカラバイオ株, 滋賀) を用い、324 及び 326 のプライマーペア [20] で 5' 末端非翻訳領域 (UTR) の 288 塩基を増幅した。反応パターンは、50°C 30 分、94°C 2 分反応後、94°C 30 秒、52°C 30 秒、72°C 45 秒の反応を 35 サイクル、その後 72°C 10 分とした。増幅産物の確認はアガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色を実施した。

BVDV 遺伝子型別は、制限酵素断片長多型 (RFLP) により実施し、RT-PCR の増幅産物を制限酵素 *Pst* I で 37°C 60 分感作し、増幅産物の切断の有無により BVDV-1 または BVDV-2 と判定した [21]。

BVDV 遺伝子の定量：BVDV 遺伝子の定量は、新たにリアルタイム RT-PCR による 5'UTR をターゲットとした SYBR I 法による定量検査系を作成した。プライマーペアは、BVDV-1 及び BVDV-2 の両遺伝子型に対応するようセンスプライマーを 324 [20]、アンチセンスプライマーを Pesti-R [22] とした 101 塩基の領域をターゲットとした。反応試薬は市販キット (One Step SYBR® PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit II (Perfect Real Time), タカラバイオ株, 滋賀) を用いた。反応パターンは、使用機器 (Applied Biosystems 7500 または 7500 Fast Real-Time PCR System, ライフテクノロジーズジャパン株, 東京) ごとに反応試薬の指定に従い実施した。

定量の指標となる標準 RNA の作成は、BVDV・Nose 株から抽出した RNA を 324 及び 326 のプライマーペア [20] で増幅した RT-PCR 産物を用いて市販キット (TOPO® TA Cloning® Kit, ライフテクノロジーズジャ

パン株, 東京) でクローニングを実施し、制限酵素 *Bam*H I により直鎖状とした後、市販キット (RiboMAX™ Large Scale RNA Production System T7, プロメガ株, 東京) を用いて RNA を合成した。合成した RNA は、ホルムアルデヒドを添加した変性アガロースゲルを用いた電気泳動により産物サイズを確認後、吸光光度計で濃度を測定しコピー数を算出した。リアルタイム RT-PCR により定量した BVDV 遺伝子量はコピー数として算出し、各検体 100 μ l 当たりの値とした。

プール血清での RT-PCR：BVDV 遺伝子の定量を実施した検体のうち、抗体陽性血清で中央値に近いコピー数と低コピー数の各 1 検体について、BVDV に対する抗体及び遺伝子がともに陰性を確認した市販の牛胎子血清 (FBS) を希釈液として、5 倍、10 倍、20 倍の擬似的なプール血清を作成し RT-PCR を実施した。また、低コピー数の検体については BVDV 遺伝子陰性であり、BVDV に対する抗体を保有 (BVDV-1, 2 とともに 1,024 倍) する哺育牛血清 (3 日齢) を希釈液として同様のプール血清を作成し RT-PCR を実施した。

抗体検査：抗体検査は定法により中和試験を実施し、CPE を抑制した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とした。細胞は MDBK-SY [23]、指示ウイルスは BVDV-1 は Nose 株、BVDV-2 は KZ-91CP 株を使用した。

成 績

BVDV 遺伝子の定量：作成したリアルタイム RT-PCR による定量検査系は、標準 RNA を 10⁷～10³ コピー/ μ l になるよう 10 倍階段希釈し反応を実施した。反応は 10³ コピー/ μ l 以上で得られ、10⁷～10³ コピー/ μ l で反応が得られた成績から作成した検量線の相関係数は R²=0.99 (データ示さず) となり、正確な定量検査系として用いることができると判断した。なお、解離温度は約 82°C となった。

各検体の定量結果は、抗体陽性血清 100 μ l 当たりのコピー数は 2.17×10⁴～4.06×10⁷ コピー、中央値 2.01×10⁶ コピーとなった。抗体陰性血清 100 μ l 当たりのコピー数は 2.88×10⁵～6.27×10⁸ コピー、中央値 6.40×10⁵ コピーとなった。白血球 100 μ l 当たりのコピー数は、3.62×10⁶～3.61×10⁸ コピー、中央値 6.18×10⁷ コピーとなった (図 1, 表)。

RT-PCR の検出限界：10⁴～10² コピー/ μ l の標準 RNA をテンプレートとして RT-PCR を実施した結果、5×10² コピー/ μ l 以上で増幅産物を確認できた (図 2)。この結果から検体 100 μ l 当たりに換算した検出限界は、約 6.25×10³ コピーとなった。

同一牛でのコピー数の推移：10 頭 (個体 No. 4, 5, 7～11, 17, 18, 38) について 4～24 日間隔で複数回採

表 各検体の BVDV コピー数, 抗体検査成績, 遺伝子型

個体 No.	検体 No.	日齢	コピー数/ 血清 100ul	コピー数/ 白血球 100ul	中和抗体価		抗体の有無*	遺伝子型
					BVDV-1	BVDV-2		
1	1	2	1.39×10 ⁶	NT	512	128	+	BVDV-1
2	2	4	4.06×10 ⁷	1.40×10 ⁷	32	8	+	BVDV-1
3	3	5	1.92×10 ⁶	1.99×10 ⁷	128	32	+	BVDV-1
4	4	2	2.05×10 ⁷	7.42×10 ⁷	256	128	+	BVDV-1
	5	16	4.34×10 ⁶	2.04×10 ⁸	16	32	+	BVDV-1
5	6	17	5.03×10 ⁶	8.00×10 ⁷	32	32	+	BVDV-1
	7	36	2.10×10 ⁶	5.59×10 ⁷	2	16	+	BVDV-1
6	8	2	3.45×10 ⁵	9.46×10 ⁶	64	256	+	BVDV-2
7	9	3	8.64×10 ⁵	1.01×10 ⁶	1,024	8,192	+	BVDV-2
	10	25	6.65×10 ⁵	1.51×10 ⁷	16	128	+	BVDV-2
8	11	4	7.62×10 ⁵	NT	16,384	4,096	+	BVDV-1
	12	8	2.17×10 ⁴	6.45×10 ⁷	8,192	2,048	+	BVDV-1
9	13	26	5.50×10 ⁴	3.62×10 ⁶	32	256	+	BVDV-2
	14	34	1.06×10 ⁶	3.61×10 ⁸	4	4	+	BVDV-2
10	15	47	2.05×10 ⁶	1.71×10 ⁸	2	<2	-	BVDV-2
	16	6	9.78×10 ⁶	5.91×10 ⁷	256	512	+	BVDV-1
11	17	14	5.74×10 ⁶	2.45×10 ⁸	128	512	+	BVDV-1
	18	27	9.90×10 ⁶	1.74×10 ⁸	32	256	+	BVDV-1
12	19	8	7.51×10 ⁵	NT	256	8	+	BVDV-2
	20	30	8.48×10 ⁶	4.37×10 ⁷	16	2	+	BVDV-2
13	21	5	1.07×10 ⁷	NT	128	8	+	BVDV-2
14	22	27	1.41×10 ⁷	NT	4	16	+	BVDV-1
15	23	3	1.07×10 ⁷	NT	128	128	+	BVDV-1
16	24	8	1.22×10 ⁵	NT	8,192 ≤	4,096 ≤	+	BVDV-1
17	25	4	1.18×10 ⁵	NT	4,096 ≤	512	+	BVDV-1
	26	348	2.04×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-1
18	27	363	6.27×10 ⁸ **	NT	<2	<2	-	BVDV-1
	28	183	2.88×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
19	29	207	3.46×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
	30	549	5.89×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
20	31	28	5.62×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-1
21	32	29	7.78×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-1
22	33	416	4.43×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
23	34	510	6.92×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
24	35	628	4.43×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
25	36	690	5.57×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
26	37	386	4.62×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
27	38	904	4.93×10 ⁵	NT	<2	2	-	BVDV-1
28	39	640	5.20×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
29	40	119	1.07×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-1
30	41	77	7.32×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
31	42	320	5.20×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
32	43	934	3.92×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
33	44	915	3.77×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
34	45	890	3.35×10 ⁵	NT	<2	16	-	BVDV-1
35	46	198	5.76×10 ⁵ **	NT	<2	<2	-	BVDV-1
36	47	944	9.96×10 ⁵	NT	<2	<2	-	BVDV-1
37	48	636	7.40×10 ⁵	1.68×10 ⁷	<2	<2	-	BVDV-2
38	49	96	1.45×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-2
	50	112	1.01×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-2
39	51	1	2.64×10 ⁶	NT	<2	<2	-	BVDV-2
40	52	28	3.40×10 ⁶	NT	64	<2	-	BVDV-2

■: 同一個体で, コピー数が 10 倍以上変動した検体 NT: 実施せず * : + (陽性), - (陰性) ** : CPE 株を有意に分離

材を実施し, 血清中のコピー数に 10 倍以上の変動を認められたのは, 個体 No. 8 の 4~8 日齢, 個体 No. 9 の 26~34 日齢, 個体 No. 11 の 8~30 日齢, 個体 No. 17 の 348~363 日齢の間で 4 個体であった。白血球中のコ

ピー数で同様の変動を認めたのは, 個体 No. 9 の 26~34 日齢の間の 1 個体であった (表)。

各検体のコピー数の比較: 抗体の有無による血清中コピー数は, 統計学的には有意差は認められなかったが

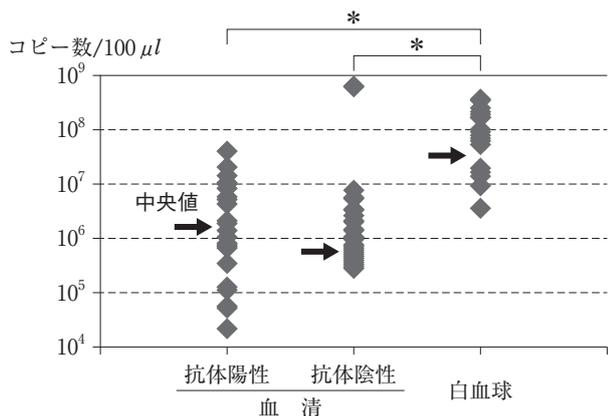


図1 各検体のコピー数
* $P < 0.01$ Mann-Whitney U 検定

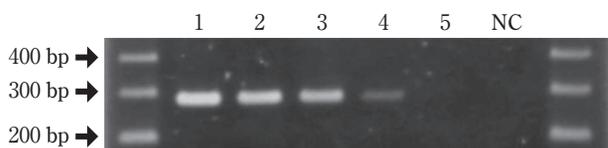


図2 RT-PCR の検出限界

1: 10^4 コピー/μl 4: 5×10^2 コピー/μl
2: 5×10^3 コピー/μl 5: 10^2 コピー/μl
3: 10^3 コピー/μl NC: 陰性コントロール

($P = 0.0523$, Mann-Whitney U 検定), 抗体陽性血清のコピー数は陰性血清と比較し, 中央値で約 3.6 倍高い結果となった. 一方, 白血球のコピー数は抗体陽性及び陰性血清のコピー数と比較し, 有意に高い結果となった ($P < 0.01$, Mann-Whitney U 検定).

コピー数と抗体価及び採材時日齢の比較: 抗体陽性血清のコピー数と抗体価及び採材時日齢の関連を単変量線型モデルにより評価した結果, コピー数は抗体価が高いほど有意に低かった (図 3, $P = 0.003$) が, 日齢とは有意な関連は認められなかった ($P = 0.835$).

プール血清での RT-PCR: 中央値に近いコピー数の検体 No. 7 (2.10×10^6 コピー) は, プール血清を作成した 5 倍, 10 倍, 20 倍の各希釈倍率すべてで明瞭な反応が得られた. 一方, 低コピー数の検体 No. 13 (5.50×10^4 コピー) は, FBS 及び哺育牛血清を希釈液として作成したプール血清の各希釈倍率とともに反応は得られたが, 検体 No. 7 と比較して不明瞭な反応となった (図 4).

考 察

BVDV が牛飼養農場で確認された場合, 同居牛検査による PI 牛摘発淘汰以降に, 当該農場で生まれた新生子牛について, 出生後, 速やかに抗原検査を実施することが推奨されている (農林水産省, 平成 28 年 4 月 28 日公表: 牛ウイルス性下痢・粘膜病に関する防疫対策が

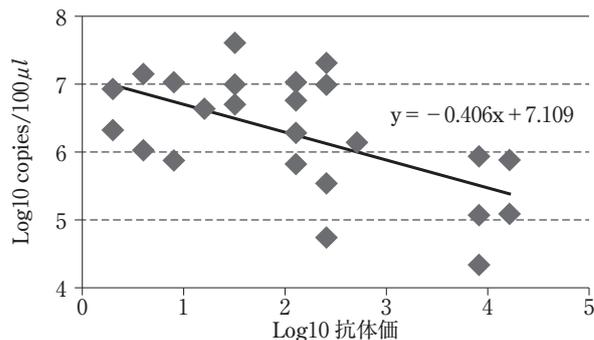


図3 単変量線型モデルを用いた血清中ウイルスコピー数と血清抗体価の関係
ウイルスコピー数及び血清抗体価は常用対数値
抗体価 $8,192 \leq$ は $16,384$, $4,096 \leq$ は $8,192$ として解析を実施

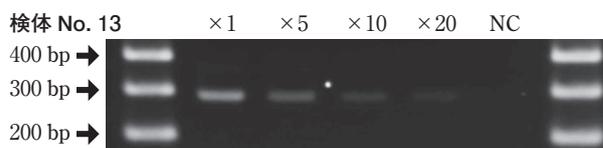
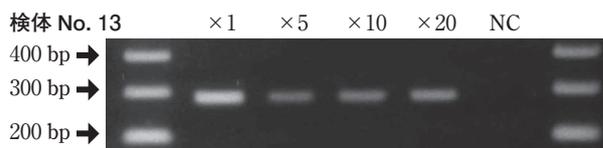
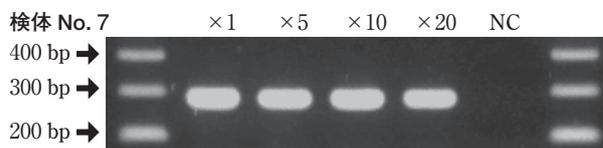


図4 疑似プール血清を用いた RT-PCR 検出感度の検討
×1~20: 希釈倍数, NC: 陰性コントロール
上図: 2.10×10^6 コピー/血清 100μl (希釈液 FBS)
中図: 5.50×10^4 コピー/血清 100μl (希釈液 FBS)
下図: 5.50×10^4 コピー/血清 100μl (希釈液 哺育牛血清)

イドライン). また, 近年, 生産現場において BVDV 感染症への防疫対策の意識は向上し, 若齢時での BVDV 検査の依頼件数が当所では増加している. それに対する抗原検査の方法については, 母牛からの移行抗体の影響や迅速性を考慮した場合, RT-PCR が最適な方法と考えられ, そのための検査材料としては過去の報告 [13, 14] から白血球が最適と考えられるが, 血液からの白血球単離は煩雑であるため多検体処理に不適である. このため, 煩雑な材料処理を必要としない血清を材料とすることについて野外検体での調査が必要であった.

今回の調査結果では, 抗体陽性血清と陰性血清のコピー数は統計学的には有意な差は認められず, 中央値で抗体陽性血清は陰性血清と比較して約 3.6 倍コピー数が高い結果となった. 一般的に抗体陽性血清は, 陰性血清

と比較して低いコピー数となる結果が予想されるが、今回の調査では反する結果となった。この原因は、統計学的に有意差は認められていないことから、調査に用いた検体の個体差と考えられる。また、抗体陽性血清のコピー数はRT-PCR検出限界に対して、最低値で約3.5倍、中央値は約 3×10^2 倍を示した。既報 [17] では、血清や白血球を材料としたRT-PCRの検査感度は推測できないとされているが、今回の調査結果から移行抗体を保有する可能性のある哺育期PI牛の診断で、RT-PCRを実施する材料に血清を用いることは可能と考えられた。一方、血清との比較のために調査した白血球のコピー数は、抗体陽性血清と比較して中央値が約 3×10^1 倍、抗体陰性血清と比較した場合、中央値が約 10^2 倍を示し、従来から報告 [13, 14] されているとおり白血球は、抽出処理が煩雑ではあるが、診断材料としては最適であることが確認された。既報 [17] では、白血球も血清と同様にBVDV量が低下するとされているが、今回の調査結果では検体No. 13で低下が示唆されたが、診断に影響を及ぼすほどの低下ではなかった。

調査に用いた検体の詳細で抗体陰性血清の検体No. 27が他検体と比較して著しく高いコピー数を示したが、この理由については不明で、今後さらなる調査が必要と考えられる。

抗体の有無による血清中コピー数の比較では、統計学的には有意な差は認められなかったが、抗体陽性血清では抗体陰性血清で確認されない 10^5 コピー以下の2検体が確認された(検体No. 12(8日齢), No. 13(26日齢))。この2検体が抗体陽性血清のコピー数の中央値と比較して非常に低いコピー数を示した原因は、移行抗体の影響による一過性の低下が推測され、既報 [17] の結果と一致していた。既報では約3週齢で最もコピー数が低下するとされているが、今回の調査結果からは、必ずしもコピー数の低下する結果は得られなかった。これは子牛によって給与される初乳の量は異なり、結果として移行抗体の量も異なってくるためと考えられた。しかし、単変量線型モデルにより評価した結果、コピー数は抗体価が高いほど有意に低かった結果、及びコピー数の推移を経時的に調査した個体No. 8において4日齢では、 7.62×10^5 コピー (BVDV-1: 抗体価16,384倍)を示したが、8日齢では 2.17×10^4 コピー (BVDV-1: 抗体価8,192倍)と10倍以上低下していることから移行抗体によるコピー数の低下が示され、その過程において血清中コピー数の一過性の低下が起こったと考えられる。

血清中コピー数の一過性の低下は、今回試験に供した試葉ではRT-PCRの検出限界との差から個体での診断には影響を及ぼさないと考えられるが、PI牛摘発に有効なスクリーニング法 [18, 19] とされるプール血清でのRT-PCRでは、希釈倍率によっては検出できないこ

とが想定される。この結果から、哺育牛でPI牛摘発の検査材料として血清を使用してRT-PCRを実施する場合、プール血清での検査はコピー数の一過性の低下を考慮する必要があると考えられた。

今回の調査においてわれわれは、野外材料においてもPI牛血清中の移行抗体によるコピー数の一過性低下を示す成績を得た。このことは、哺育牛におけるPI牛摘発のための全頭検査は、BVDV防疫対策のリスクアナリシス中、最も効果的とされている [24] ことからも有用な知見である。

引用文献

- [1] Hessman BE, Fulton RW, Sjeklocha DB, Murphy TA, Ridpath JF, Payton ME : Evaluation of economic effects and the health and performance of the general cattle population after exposure to cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in a starter feedlot, *Am J Vet Res*, 70, 73-85 (2009)
- [2] Heuer C, Healy A, Zerbini C : Economic effects of exposure to bovine viral diarrhoea virus on dairy herds in New Zealand, *J Dairy Sci*, 90, 5428-5438 (2007)
- [3] Houe H : Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections, *Vet Microbiol*, 64, 89-107 (1999)
- [4] 田島啓士 : 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, *日獣会誌*, 65, 111-117 (2012)
- [5] McClurkin AW, Littledike ET, Cutlip RC, Frank GH, Coria MF, Bolin SR : Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus, *Can J Comp Med*, 48, 156-161 (1984)
- [6] Houe H : Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus, *Vet Clin N Am-Food A*, 11, 521-547 (1995)
- [7] Baker JC : Bovine viral diarrhoea virus: A review, *J Am Vet Med Assoc*, 190, 1449-1458 (1987)
- [8] Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ : Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes, *Virology*, 205, 66-74 (1994)
- [9] Pellerin C, van den Hurk J, Lecomte J, Tijssen P : Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities, *Virology*, 203, 260-268 (1994)
- [10] Abe Y, Tamura T, Torii S, Wakamori S, Nagai M, Mitsuhashi K, Mine J, Fujimoto Y, Nagashima N, Yoshino F, Sugita Y, Nomura T, Okamatsu M, Kida H, Sakoda Y : Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan, *J Vet Med Sci*, 78, 61-70 (2016)
- [11] Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R, Flores EF : Hobi-like viruses: an emerging group of pestiviruses, *J Vet Diagn Invest*, 25, 6-15 (2013)
- [12] 増田恒幸, 足羽朋子, 山里比呂志, 亀山健一郎 : 新たに市販された抗原ELISAを用いた牛ウイルス性下痢ウイルス検査の検証, *日獣会誌*, 69, 187-191 (2016)
- [13] Edmondson MA, Givens MD, Walz PH, Gard JA, Stringfellow DA, Carson RL : Comparison of tests for

- detection of bovine viral diarrhoea virus in diagnostic samples, *J Vet Diagn Invest*, 19, 376-381 (2007)
- [14] 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)
- [15] Brinkhof J, Zimmer G, Westenbrink F : Comparative study on four enzyme-linked immunosorbent assays and a cocultivation assay for the detection of antigens associated with the bovine viral diarrhoea virus in persistently infected cattle, *Vet Microbiol*, 50, 1-6 (1996)
- [16] Deregt D, Carman PS, Clark RM, Burton KM, Olson WO, Gilbert SA : A comparison of polymerase chain reaction with and without RNA extraction and virus isolation for detection of bovine viral diarrhoea virus in young calves, *J Vet Diagn Invest*, 14, 433-437 (2002)
- [17] Fux R, Wolf G : Transient elimination of circulating bovine viral diarrhoea virus by colostral antibodies in persistently infected calves: a pitfall for BVDV-eradication programs?, *Vet Microbiol*, 161, 13-19 (2012)
- [18] Smith RL, Sanderson MW, Walz PH, Givens MD : Sensitivity of polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled serum samples and use of pooled polymerase chain reaction to determine prevalence of bovine viral diarrhoea virus in auction market cattle, *J Vet Diagn Invest*, 20, 75-78 (2008)
- [19] Weinstock D, Bhudevi B, Castro AE : Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum, *J Clin Microbiol*, 39, 343-346 (2001)
- [20] 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)
- [21] 山口 修, 迫田義博, 佐藤満雄, 中村成幸, 福所秋雄 : RT-PCRによるベスチウイルスの検出と制限酵素切断パターンによる識別, *日獣会誌*, 50, 639-644 (1997)
- [22] Baxi M, McRae D, Baxi S, Greiser-Wilke I, Vilcek S, Amoako K, Deregt D : A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses, *Vet Microbiol*, 116, 37-44 (2006)
- [23] 齋藤俊哉, 山口 修, 深井克彦 : 牛腎由来株化細胞を用いた牛ウイルス性下痢ウイルスのウイルス分離法および抗体検査法, *日獣会誌*, 56, 717-721 (2003)
- [24] 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)

Investigation of Viral Copy Number of Bovine Viral Diarrhoea Virus in Serum of Persistently Infected Calves with Colostral Antibodies

Kazuhiro MIYANE^{1)†}, Kiku MATSUDA¹⁾, Rina HIRAKI¹⁾, Ayako FUJIMOTO¹⁾
and Toru KANNO²⁾

1) *Hokkaido Kamikawa Livestock Hygiene Service Center, 4-15 Higashitakasu, Asahikawa, 071-8154, Japan*

2) *Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health National Agricultural and Food Research Organization, 4 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, 062-0045, Japan*

SUMMARY

This study aimed to determine whether serum is suitable for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of persistent infection (PI) of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in calves that have maternal colostral antibodies. In addition, evaluation of availability of pooled serum for use as a screening method for the detection of cows with PI was also examined. To investigate these aims, we developed a quantitative, real-time RT-PCR for the detection of BVDV. Quantitative studies showed that the minimum value in PI calves that have colostral antibodies was 2.17×10^4 copies, which was higher than the detection limit for RT-PCR (approximately 6.25×10^3 copies); however, the copy number in the serum was significantly low and the antibody titer was high. This suggests a transient decrease in the copy number due to colostral antibodies. The RT-PCR of pseudo-pooled serum using PI sera and fetal bovine serum showed obscure detection of the specific target band in diluted samples from low-copied PI serum. Our study indicated that calf serum with colostral antibodies would be a useful diagnostic material for the RT-PCR detection of PI with BVDV; however, pooled serum might be affected by a transient decrease in BVDV copy numbers due to colostral antibodies.

— Key words : bovine viral diarrhoea virus (BVDV), colostral antibodies, copy number, serum, transient decrease.

† Correspondence to (Present address) : Kazuhiro MIYANE (Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center)

59-6 Kisen Kawanishicho, Obihiro, 089-1182, Japan

TEL 0155-59-2021 FAX 0155-59-2571

E-mail : miyane.kazuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 33 ~ 38 (2019)