



**RESPONSE TO QUESTIONS FROM THE JAPANESE MINISTRY OF HEALTH
LABOR AND WELFARE (MHLW) IN REGARDS TO THE DETECTION OF
BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY (BSE) IN THE UNITED STATES**

United States Department of Agriculture
Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services
May 2012



**RESPONSE TO QUESTIONS FROM THE JAPANESE MINISTRY OF HEALTH,
LABOR AND WELFARE (MHLW) IN REGARDS TO THE DETECTION OF BOVINE
SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN THE UNITED STATES**

**1. Regarding the ELISA test conducted at the California Animal Health and Food
Safety Laboratory:**

- **The manufacturer and the brand name of the test kit used**

Bio-Rad. Bovine Spongiform Encephalopathy Antigen Test Kit, ELISA. TeSeE Short Assay Protocol.

- **The test's measured value and cut-off value (if multiple tests are implemented, the value of each test)**

Calculations and interpretation followed the manufacturer's instructions. The original test sample optical density (OD) value was 3.306, which exceeded the manufacturer's cut-off value 0.221. This result classified the sample using USDA specific terminology, as an "initial reactor". The California laboratory then, as required by standard operating procedures, retested the original homogenate in two separate wells. The retested homogenate had OD values of 3.309 and 3.361, which exceeded the cut-off value 0.217. These results classified the sample, using the USDA specific terminology, as "inconclusive". The sample was then shipped to the USDA National Veterinary Services Laboratories (NVSL) for further testing.

2. Regarding post-ELISA test:

- **The descriptions and results of tests conducted after the first (ELISA) test was confirmed positive (including the ones done for study/research purposes with positive results shown).**

At NVSL the original homogenate from the California laboratory and two tissue samples from the obex were tested using the Bio-Rad ELISA. All samples exceeded the manufacturer's cut-off value of 0.219. The optical density of the California homogenate was 3.240 and optical density values for the two tissue samples were 3.142 and 3.169.

**3. Regarding the confirmatory tests conducted at the National Veterinary Services
Laboratories (NVSL) and later in U.K. and Canada:**

- **Testing methodology/protocol**
- **Type of anti-body used**
- **Result of each test (images, etc.)**

The confirmatory tests performed at NVSL were Immunohistochemistry and Western Blot. The images of the Western Blot performed at NVSL were shared with the Canadian and U.K. OIE BSE Reference Laboratories followed later by samples being sent for their own testing.

We will be informed of the specific tests and techniques run by the OIE reference laboratories once they have completed their testing and provide their reports. It is expected that results from both reference laboratories will be available by the end of next week.

4. Regarding the IHC and Western Blot testing conducted by USDA:

- The protocol ordinarily used by USDA

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, the protocol follows a recent publication with minor modifications: **Evaluation of two sets of immunohistochemical and Western blot confirmatory methods in the detection of typical and atypical BSE cases.** Porcario C, Hall SM, Martucci F, Corona C, Iulini B, Perazzini AZ, Acutis P, Hamir AN, Loiacono CM, Greenlee JJ, Richt JA, Caramelli M, Casalone C. BMC Res Notes. 2011 Sep 29;4:376. Listed below is text from the article with the modifications incorporated.

Tissues selected for examination were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin blocks, sectioned at 5 µm and mounted onto charged glass slides (Fisher Superfrost Plus, Fisher Scientific, Hampton, NH). The slides were air dried, put in an oven for 15 min at 80°C, deparaffinized in xylene, and rehydrated in graded alcohols, followed by distilled water. They were then incubated in 95% formic acid for 15 min, followed by three washes (2 min each) in Tris Buffer pH 7.5 and a 1-min wash in laboratory quality water. The slides were immersed in a pH 6.2 antigen retrieval solution (DIVA Decloaker RTU from Biocare Medical, Concord, CA) and placed in a commercially available antigen retrieval device (Biocare Medical,) for 30 min at 121°C. After the slides were allowed to cool to room temperature, they were stained using an automated immunostainer (NexES IHC module, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ). The first step associated with the autostainer included incubation of sections with the (Anti-Prion Antibody, Clone F99/97.6.1, Ventana Medical Systems) antibody for 32 min at 37°C. The primary antibody was detected using the Alkaline Phosphatase UltraView Red Kit (Ventana Medical Systems Inc.). The sections were subsequently counterstained with Gill's hematoxylin (Ventana Medical Systems Inc.) and then post-counterstained with bluing reagent (Ventana Medical Systems Inc.). At the end of the process, the slides were removed from the automated stainer and dipped in warm tap water with 2-3 drops of liquid dishwashing detergent added. After washes in tap water, the sections were dehydrated in ethyl alcohol and xylene and then coverslipped with a permanent mounting medium. Positive controls include known classical, H-type and L-type BSE brain tissues.

Western Blot

For Western blot testing, the OIE approved Bio-Rad TeSeE Western Blot was used following manufacturer's instructions with ECL Plus (GE Healthcare) used for chemiluminescence. Membranes were digitally photographed and analyzed using the Bio-Rad Vera Doc image analysis system.

- Please indicate if there is any difference from the OIE-prescribed method, such as the type of anti-body used, etc.

In addition, a second Western blot was performed using the Bio-Rad Western Blot kit with the following modifications: a different primary antibody (m AB P4, R-Biopharm AG), secondary antibody, horseradish peroxidase substrate followed by ECI Plus. Membranes were digitally photographed using the Bio-Rad Vera Doc image analysis system.

5. Regarding feed given to the animal in question and to its cohort:

- **Any MBM contained in the milk replacer and compound feed given after birth**
- **Any possibility of MBM contamination**
- **Status of on-site inspection of the feed mills by competent authorities**

The Food and Drug Administration (FDA), and the California Department of Food and Agriculture (CDFA) continue the investigation of feed records at the index dairy, rendering facility and calf ranch. To date, 10 feed firms have been identified as suppliers for the index dairy during the time period of interest. At the rendering facility, feed investigators confirmed that all domestic distribution of meat and bone meal meets federal labeling requirements.

6. Regarding the animal's age

- **Documents/bases that confirm the age of the animal**

Based on investigation of farm records, the age of the positive cow was 10 years and 7 months old; it was born on September 2001.

7. Regarding the animal

- **Breed**
- **Sex**

The animal in question was a dairy cow.

- **Birth place**

The positive BSE cow was born on the index premises, a dairy farm located in Tulare County, California. The name of the farm is not publicly released.

- **History of transference of the animal since birth**

After birth on the index farm, the initial positive cow was raised on a calf ranch 10 years ago. The calf ranch is being investigated.

- **The date of death**

The epidemiological investigation is ongoing the information will be provided in follow-up correspondence.

- **Condition of the animal before death**

The animal was euthanized after it became recumbent.

- **Chronology of events from disease manifestation to euthanasia of the animal in question**

The positive cow developed lameness, and then became recumbent; the animal was then humanely euthanized. Epidemiological investigation is ongoing further information will be provided in follow-up correspondence.

8. Regarding the cohort (both birth cohort and progenies):

- **Trace-back and trace-forward information**
- **Handling of these animals (BSE testing, resumption of milking, destroy, slaughter, etc.)**

Through its continuing epidemiological investigation, the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), in collaboration with the CDFA has identified that one progeny born to the positive cow in the last 2 years was stillborn, and another has been located on a site in another state. That animal has been appraised, humanely euthanized, and sampled for BSE at the National Veterinary Services Laboratories in Ames, Iowa. Test results for that animal are negative for BSE. No birth cohort cattle have been located through the investigation.

A hold order has been placed on all cattle at a second dairy (dairy 2) that is associated with the dairy of the initial positive cow (also called the index dairy). Both dairies remain under quarantine. Inventories of both the index dairy and dairy 2 have been completed by CDFA. Records are still being matched and validated to determine if any at-risk cattle may be present. The epidemiological investigation is ongoing.

9. Regarding the handling of the animal in question:

- **What will be the end-treatment (consequence) of the animal in question?**

The carcass of the affected animal was destroyed by the approved disposal method.

10. Regarding the renderer in question:

- **What are the uses of dead cattle?**

Rendered dead cattle are used for the production of non-ruminant feed, and fertilizers.

11. The amount of accumulated abnormal prion

The amount of agent was above the level of detection of the tests used in the USA. Such tests are consistent with OIE standards.

12. Status of individual animal identification management at the dairy in question

The BSE positive cow was holding a brand that belongs to the dairy farm in question, investigation of the farm records determined the information about the animal age. Through the ongoing investigation, the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) in collaboration with the California Department of Food and Agriculture has identified that one progeny born to the positive cow in the last 2 years was stillborn, and another has been located on a site in another state. That animal has been appraised, humanely euthanized, and sampled for BSE at the National Veterinary Services Laboratories in Ames, Iowa. Test results for that animal are negative for BSE. More information about the management status of the farm regarding animal identification will be provided when available.

1. Regarding the ELISA test conducted at the California Animal Health and Food Safety Laboratory:

(California Animal Health and Food Safety Laboratory で行われた ELISA 試験について)

- The manufacturer and the brand name of the test kit used
(使用された製造業者と試験キットのブランド名)

(回答) バイオラッド社製 Bovine Spongiform Encephalopathy Antigen Test Kit, ELISA. TeSeE Short Protocol.

- The test's measured value and cut-off value (if multiple tests are implemented, the value of each test)
(試験の測定値とカットオフ値 (複数回実施時は各試験の値))

(回答) 計算と解釈は製造業者の使用説明書に従った。オリジナルテストサンプルの測定吸光 (OD) 値は 3.306 であり、製造業者のカットオフ値 0.221 を超過した。この結果により当該サンプルは、USDA の特定の用語で、初期反応物 (initial reactor) と分類された。カリフォルニア州研究所は次に、標準作業手順で求められているように、オリジナル懸濁液を 2 つの分かれたウェルに入れ再試験した。再試験の懸濁液は 3.309 と 3.361 の OD 値であり、カットオフ値 0.217 を超過した。これらの結果により当該サンプルは、USDA の特定の用語で、結果不確定 (inconclusive) と分類された。サンプルは次の試験のために、USDA の国立獣医学研究所 (NVSL) に送られた。

2. Regarding post-ELISA test:

(次の ELISA 試験について)

- The descriptions and results of tests conducted after the first (ELISA) test was confirmed positive (including the ones done for study/research purposes with positive results shown).

(1 次検査陽性と確認した以降に実施した検査の内容及びその結果 (研究目的で実施し陽性であったものも含む))

(回答) NVSL では、カリフォルニア州研究所からのオリジナルの懸濁液と門部位から採取した 2 つの組織サンプルが、バイオラッド ELISA を使って試験された。全てのサンプルが製造業者のカットオフ値である 0.219 を超過した。懸濁液の OD 値は 3.240、2 つの組織サンプルの OD 値は 3.142 と 3.169 であった。

3. Regarding the confirmatory tests conducted at the National Veterinary Services Laboratories (NVSL) and later in U.K. and Canada:

(National Veterinary Services Laboratories (NVSL)で実施した確認検査並びにその後の英国及びカナダにおける確認検査について)

- Testing methodology/protocol
(検査法のプロトコール)
- Type of anti-body used
(使用抗体の種類)
- Result of each test (images, etc.)
(各検査法の結果 (画像等))

(回答) NVSL で行われた確認検査は、免疫組織化学検査 (IHC) とウエスタンブロット法であった。NVSL で行われたウエスタンブロット法の画像はカナダと英国の OIE BSE 関連研究所に共有され、両研究所で試験を実施するためにサンプルが送付された。

我々は OIE 関連研究所の試験が完了し、報告が提供されれば、研究所で実施される特別な試験と手技が分かる。両関連研究所からの結果は来週末までに入手できる見込みである。

4. Regarding the IHC and Western Blot testing conducted by USDA:
(USDA が実施している IHC 及び WB について)

- The protocol ordinarily used by USDA
(USDA が通常実施しているプロトコール)

(回答) IHC のプロトコールは、マイナーな変更があった最近の発表に従う。「定型及び非定型 BSE 事例の検出における、IHC 及びウエスタンブロットの確認検査法の 2 つのセットの評価について」 Porcario C, Hall SM, Martucci F, Corona C, Iulini B, Perazzini AZ, Acutis P, Hamir AN, Loiacono CM, Greenlee JJ, Richt JA, Caramelli M, Casalone C. BMC Res Notes. 2011 Sep 29;4:376. 以下に示したのは、修正が反映された論文からの文言である。

試験のために選ばれた組織は 10%中性緩衝ホルマリンで固定され、パラフィンブロック中に包埋し、5 μ m で薄切し、スライドに載せられた (Fisher Superfrost Plus, Fisher Scientific, Hampton, NH)。スライドは空気乾燥され、80°C 15 分間オーブンに置かれ、キシレン中で脱パラフィンされ、何段階かのアルコール中で再水和され、蒸留水に浸された。次に、95%ギ酸に 15 分間静置し、pH 7.5 トリス緩衝液中で 3 回洗浄 (各々 2 分) し、実験水中で 1 分洗浄された。スライドは、pH 6.2 抗原賦活化剤 (DIVA Decloaker RTU from Biocare Medical, Concord, CA) に浸され、商業的に利用できる抗原賦活化装置 (Biocare Medical) 中に 30 分間 121°C で置かれた。スライドが室温まで冷やさ

れた後、それらは自動免疫染色機（NexES IHC module, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ）を使って染色された。自動染色に関連する最初のステップは抗体（Anti-Prion Antibody, Clone F99/97.6.1, Ventana Medical Systems）を使った 32 分間 37°C での切片の静置を含んでいた。一次抗体は Alkaline Phosphatase UltraView Red Kit（Ventana Medical Systems Inc.）を使って検出された。後に、切片は Gill's hematoxylin で対比染色され、bluing reagent（Ventana Medical Systems Inc.）で次の染色が行われた。プロセスの最後には、スライドは自動染色機から取り除かれ、洗剤を 2 ～ 3 滴加えられぬるま湯に浸された。水で洗浄した後、切片はエチルアルコールとキシレン中で脱水され、次に permanent mounting medium を用いてカバーガラスを載せられた。陽性コントロールは BSE 脳組織の古典的 BSE、H 体及び L 体を含む。

ウェスタンブロット法では、OIE 承認のバイオラッド社 TeSeE Western Blot が使われ、製造業者の使用説明書に従い、化学発光分析に利用される ECL Plus（GE Healthcare）を用いた。メンブレンはデジタル画像で撮られ、Bio-Rad Vera Doc image analysis system を利用し分析された。

- Please indicate if there is any difference from the OIE-prescribed method, such as the type of anti-body used, etc.

（使用抗体の種類など、OIE の手法と異なる点があれば示してもらいたい）

（回答） 2 つ目のウェスタンブロット法は次の変更をしたバイオラッド社 Western Blot kit を使って行われた：異なる一次抗体（mAB P4, R-Biopharm AG）、二次抗体では、ECL Plus に付いていた西洋わさびペルオキシダーゼ。メンブレンは、Bio-Rad Vera Doc image analysis system を使用しデジタル画像を撮られた。

5. Regarding feed given to the animal in question and to its cohort:

（当該牛とその同時出生牛（コホート牛）への飼料の使用状況について）

- Any MBM contained in the milk replacer and compound feed given after birth
（出生後の代用乳及び配合飼料への肉骨粉混入）
- Any possibility of MBM contamination
（肉骨粉混入の可能性）
- Status of on-site inspection of the feed mills by competent authorities
（管轄庁による飼料製造施設の立入検査の状況）

（回答） アメリカ食品医薬品局（FDA）及びカリフォルニア農務省（CDFA）はレンダリング施設と子牛飼育場について、飼料日誌記録の調査を継続している。現在までに、10 の飼料会社が該当する期間中に発端農場に飼料を供給していたことが確認されている。レンダリング施設について、飼料調査者は肉骨粉の国内流通は全て連邦表示規則要件を満たしていたことを確認した。

6. Regarding the animal's age

(当該牛の年齢について)

- Documents/bases that confirm the age of the animal

(当該牛の月齢の確認根拠資料)

(回答) 飼育場記録の調査に基づき、陽性乳牛の年齢は10歳7ヶ月であり、2001年9月に出生していた。

7. Regarding the animal

(当該牛について)

- Breed (品種)

- Sex (性別)

(回答) 当該牛は乳牛である。

- Birth place (出生地)

(回答) BSE 陽性乳牛はカリフォルニア州のトゥーレアリ郡 (Tulare County) に位置する酪農場で出生した。農場の名前については公表していない。

- History of transference of the animal since birth (出生後の移動履歴)

(回答) 酪農場で出生後、当該陽性乳牛は10年前子牛飼育場で育てられた。その子牛飼育場については調査中である。

- The date of death (死亡日)

(回答) 疫学調査については継続中であり、続報文書を提供予定である。

- Condition of the animal before death (死亡前の当該牛の状態)

(回答) 当該牛は横臥するようになった後、安楽死した。

- Chronology of events from disease manifestation to euthanasia of the animal in question

(当該牛の発症から安楽死に至る経緯)

(回答) 当該陽性牛は跛行し、横臥するようになった。それにより、人道的に安楽死された。疫学調査についてさらなる情報を調査継続中であり、続報文書を提供予定である。

8. Regarding the cohort (both birth cohort and progenies):

(当該牛の同時出生牛 (バースコホート牛及び産子牛) について)

- Trace-back and trace-forward information

(追跡情報)

- Handling of these animals (BSE testing, resumption of milking, destroy, slaughter, etc.)

(当該牛らの今後の取扱い (BSE 検査、搾乳の再開、処分、と殺等))

(回答) 疫学調査の継続によって、米国農務省動植物衛生検査局 (APHIS) 及び CDFA は当該陽性牛には過去 2 年間に 2 頭の産子牛がおり、1 頭は死産していること、また別のもう 1 頭は他の州に所在していることを確認した。その子牛は鑑定後人道的に安楽死され、アイオワ州のエームズ (Ames) にある NVSL で BSE のためのサンプルとされた。BSE 検査結果は陰性だった。調査を通じて、他の産子牛はいなかった。

強制指示により、当該陽性牛の発端酪農場 (index dairy) と提携していた酪農場 (dairy2) の全頭が移動させられた。酪農場は両方とも隔離されたままである。両方の酪農場の家畜調査記録作業は CDFA によって完了している。他にリスクのあった牛がいなかったかどうかを明らかにするために記録関係の付け合わせ及び検証が行われている。疫学調査は継続中である。

9. Regarding the handling of the animal in question:

(当該牛の取扱いについて)

- What will be the end-treatment (consequence) of the animal in question?

(当該牛の最終的な処分方法 (帰結) は?)

(回答) BSE に冒された当該牛は公認の処理方法で処分された。

10. Regarding the renderer in question:

(当該レンダリング施設について)

- What are the uses of dead cattle?

(死亡牛の用途は?)

(回答) レンダリングされた死亡牛は反芻動物以外の飼料及び肥料の製造に使用される。

11. The amount of accumulated abnormal prion

(異常プリオン蛋白の蓄積量)

(回答) プリオンの蓄積量は米国で利用されるテストの検出レベルは超えていた。そのテストはOIE基準と一致している。

12. Status of individual animal identification management at the dairy in question

(当該牧場における個体識別管理の状況)

(回答) BSE陽性牛は、当該酪農場に所属しているという焼き印 (brand) を保有し、農場記録の調査により、月齢情報を断定した。米国農務省動植物衛生検査局 (APHIS) 及びCDFAは当該陽性牛には過去 2 年間に 2 頭の産子牛がおり、1 頭は死産していること、また別のもう 1 頭は他の州に所在していることを確認した。その子牛は鑑定後人道的に安楽死され、アイオワ州のエームズ (Ames) にあるNVSLでBSEのためのサンプルとされた。BSE検査結果は陰性だった。当

【仮訳】

該農場における個体識別に関する管理状況についての追加情報は、入手次第提供されるだろう。

米国での 4 例目の牛海綿状脳症（BSE）確認事例について

厚生労働省食品安全部

米国政府からの情報（詳細は確認中）

- ・ 当該牛は、10 歳 7 ヶ月齢の雌の乳牛である。
- ・ 30 ヶ月齢超を対象とした、通常のサーベイランスで、カリフォルニア州で確認された。
- ・ 食肉処理はされておらず、食肉として流通することはない（と畜場に出荷されたものではない）。

注 米側は非定型 BSE としている。日本でも 8 例目（23 ヶ月齢）及び 24 例目（169 ヶ月齢）で非定型 BSE が確認されている。

（参考 1）これまでの米国における BSE の発生状況

確認年月	最終飼養場所	年齢（月齢）	備考
2003 年 12 月	ワシントン州	80 ヶ月齢	カナダ産
2005 年 6 月	テキサス州	12 歳（推定）	非定型
2006 年 3 月	アラバマ州	10 歳以上（推定）	非定型

（参考 2）現行の米国産牛肉の輸入条件

- ・ 牛肉は 20 ヶ月齢以下と証明される牛由来
- ・ 特定危険部位（SRM）はあらゆる月齢から除去

（参考 3）米国産牛肉に関する食品安全委員会への諮問内容

ア 月齢制限

現行の規制閾値である「20 か月齢」から「30 か月齢」とした場合のリスクを比較。

イ SRMの範囲

頭部（扁桃を除く。）、せき髄及びせき柱について、現行の「全月齢」から「30 か月齢超」に変更した場合のリスクを比較。

ウ 上記を終えた後、国際的な基準を踏まえてさらに月齢の規制閾値を引き上げた場合のリスクを評価。