

牛伝染性リンパ腫診断用酵素抗体反応キット

令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

牛伝染性リンパ腫ウイルスを不活化及び可溶化後、牛伝染性リンパ腫ウイルスgp51蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて精製した抗原をマイクロストリップに吸着させ、酵素抗体法により牛伝染性リンパ腫ウイルス抗体を検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 吸光度試験

1.1.1 試験材料

1.1.1.1 被検材料

指示陽性血清及び指示陰性血清を用いる。

1.1.1.2 反应用抗原

抗原吸着マイクロストリップを用いる。

1.1.1.3 標識抗体

抗体希釈用液で100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識プロテインG溶液（以下「標識抗体」という。）を用いる。

1.1.2 試験方法

抗原吸着マイクロストリップの保存液を捨て、抗原陽性穴及び抗原陰性穴の各3穴に指示陽性血清及び指示陰性血清をそれぞれ 100 μ Lずつ加える。また、2穴をブランクとする。マイクロストリップを密閉して 37 $^{\circ}$ Cで 60 分間反応させる。血清を除去した後、濃縮洗浄液を水で 10 倍に希釈した洗浄液 300 μ Lずつで4回洗浄する。洗浄したマイクロストリップの各穴及びブランクとした2穴に標識抗体 100 μ Lずつを加え、密閉して 37 $^{\circ}$ Cで 30 分間反応させる。標識抗体を除去した後、洗浄液 300 μ Lずつで4回洗浄する。発色基質液 100 μ Lずつを各穴に加え、室温で 12 分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液を 50 μ Lずつ加え、速やかに 450nmの波長で各穴の吸光値を測定する。

1.1.3 判定

被検材料の平均吸光度を付記1により算出する。

指示陽性血清の抗原陽性穴における平均吸光度値から抗原陰性穴における平均吸光度値を引いた値（以下「平均差引吸光度値」という。）は0.60以上でなければならず、指示陰性血清の平均差引吸光度値を指示陽性血清のそれで除した値は、0.30未満でなければならない。

1.2 特異性試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 被検材料

抗原吸着マイクロストリップを用いる。

1.2.1.2 対照血清

交差反応試験血清（付記2）、参照陽性血清（付記3）及び参照陰性血清（付記4）を用いる。

1.2.1.3 指示血清

指示陽性血清を用いる。

1.2.1.4 標識抗体

1.1.1.3の標識抗体を用いる。

1.2.2 試験方法

抗原吸着マイクロストリップの保存液を捨て、抗原陽性穴及び抗原陰性穴の各4穴に血清希釈用

液でそれぞれ 50 倍に希釈した対照血清を 100 μ L ずつ加え、1.1.2 の試験方法を準用して試験を行う。

1.2.3 判定

指示陽性血清の平均差引吸光度値を分母にした交差反応試験血清及び参照陰性血清の S/P 値（付記 5）は、いずれも 0.30 未満でなければならず、参照陽性血清の平均差引吸光度値は、0.60 以上でなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 被検材料

抗原吸着マイクロストリップを用いる。

1.3.1.2 対照血清

参照陽性血清及び参照陰性血清を用いる。

1.3.1.3 標識抗体

1.1.1.3 の標識抗体を用いる。

1.3.2 試験方法

抗原吸着マイクロストリップの保存液を捨て、抗原陽性穴及び抗原陰性穴の各 8 穴に血清希釈用液でそれぞれ 50 倍に希釈した対照血清を 100 μ L ずつ加え、1.1.2 の試験方法を準用して試験を行う。

1.3.3 判定

参照陽性血清の平均差引吸光度値は、0.60 以上でなければならず、参照陽性血清の平均差引吸光度値を分母にした参照陰性血清の S/P 値は、0.30 未満でなければならない。

付記 1 平均吸光度値

平均吸光度値は、下記の計算式により算出する。

対照血清の平均吸光度値 = 対照血清の抗原陽性穴又は陰性穴での吸光度値の合計 / 穴数

付記 2 交差反応試験血清

牛伝染性リンパ腫ウイルスに対する抗体を保有しない牛を以下のウイルスで免疫して得られた血清で、各々以下の抗体価を示すもの

牛伝染性鼻気管炎ウイルス	中和抗体価 16 倍以上
牛ウイルス性下痢ウイルス	中和抗体価 16 倍以上
牛 RS ウイルス	中和抗体価 4 倍以上
牛流行熱ウイルス	中和抗体価 40 倍以上
牛アデノウイルス 7 型	赤血球凝集抑制抗体価 20 倍以上
牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス	赤血球凝集抑制抗体価 40 倍以上

付記 3 参照陽性血清

牛伝染性リンパ腫ウイルスで免疫した牛の血清で、1.3 の試験を準用して試験を行うとき、抗原

陽性穴における平均吸光度値から抗原陰性穴における平均吸光度値を引いた値が 0.60 以上を示すもの

付記 4 参照陰性血清

牛伝染性リンパ腫ウイルスに対する抗体陰性の牛の血清で、1.3 の試験を準用して試験を行うとき、S/P値が 0.30 未満を示すもの

付記5 S/P値

参照又は指示陽性血清の抗原陽性穴における平均吸光度値をPC(P)、抗原陰性穴における平均吸光度値をPC(N)、対照血清の抗原陽性穴における平均吸光度値をS(P)、抗原陰性穴における平均吸光度値をS(N)として、S/P値は下記の計算式により算出する。

$$S/P \text{ 値} = \frac{S(P) - S(N)}{PC(P) - PC(N)}$$