

# ブルセラ症診断用抗原固相化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

ブルセラ・アボルタスの菌体から抽出した抗原をプレートに固相化し、酵素抗体法により血清中の特異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

試験品を用いる。

#### 1.1.2 試験方法

指示陽性血清及び指示陰性血清を、血清希釈用液でそれぞれ50倍に希釈し、抗原固相化マイクロプレートの各6穴に100 $\mu$ Lずつ分注し、25 $\pm$ 5 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。プレートを洗浄液（付記1）で3回洗浄後、洗浄液で100倍に希釈した2次抗体溶液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、25 $\pm$ 5 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。プレートを洗浄液で3回洗浄後、基質液（付記2）を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、25 $\pm$ 5 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた後、反応停止液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、415nmで吸光度値を測定する。

#### 1.1.3 判定

指示陽性血清の平均吸光度値は0.80以上2.50以下であり、指示陰性血清の平均吸光度値は0.1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

試験品（指示陽性血清及び指示陰性血清を除く。）、参照陽性血清（付記3）、参照陰性血清（付記4）、交差反応試験血清1（付記5）及び交差反応試験血清2（付記6）を試験材料とする。

#### 1.2.2 試験方法

参照陽性血清、参照陰性血清、交差反応試験血清1及び交差反応試験血清2を、血清希釈用液でそれぞれ50倍に希釈し、抗原固相化マイクロプレートに、参照血清は各6穴、及び交差反応試験血清は各2穴を100 $\mu$ Lずつ分注し、1.1.2に準じて吸光度を測定する。

#### 1.2.3 判定

交差反応試験血清1又は交差反応試験血清2のそれぞれの平均吸光度値をT、参照陽性血清の平均吸光度値をP、及び参照陰性血清の平均吸光度値をNとし、 $100 \times (T - N) / (P - N)$ により交差反応試験血清1及び2の抗体価（%P値）を求める。

このとき、交差反応試験血清1及び2の%P値は、30未満でなければならない。

### 1.3 力価試験

#### 1.3.1 試験材料

試験品（指示陽性血清及び指示陰性血清を除く。）、参照陽性血清、参照陰性血清及び弱陽性血清（付記7）を用いる。

#### 1.3.2 試験方法

1.1.2に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び弱陽性血清の吸光度値を測定する。

#### 1.3.3 判定

弱陽性血清の平均吸光度値をT、参照陽性血清の平均吸光度値をP、及び参照陰性血清の平均吸

光度値をNとし、 $100 \times (T - N) / (P - N)$ により弱陽性血清の抗体価（%P値）を求める。

このとき、参照陽性血清の平均吸光度は0.80以上2.50以下、参照陰性血清の平均吸光度は0.1未満、及び弱陽性血清の%P値は13.1以上22.8以下でなければならない。

付記1 洗浄液

10倍濃度浄液を水で10倍に希釈したもの

付記2 基質液

発色基質液を基質希釈用液に1/40容量加え、さらに3%過酸化水素水を1/500容量加えたもの

付記3 参照陽性血清

ブルセラ・アボルタス544株の生菌を牛に接種して得られた血清であり、酵素抗体法を行ったとき国際標準陽性血清と同等の吸光度を示すように、参照陰性血清で希釈したもの

付記4 参照陰性血清

ブルセラ急速凝集検査で陰性であり、酵素抗体法を行ったときの吸光度が0.1未満のもの

付記5 交差反応試験血清1

抗ブルセラ抗体陰性牛を、牛伝染性気管支炎ウイルス、牛ウイルス性下痢症ウイルス、牛RSウイルス、牛流行熱ウイルス、牛アデノウイルス7型及び牛パラインフルエンザ3型ウイルスを含むワクチンで免疫し、それぞれのウイルスに対して一定以上の中和抗体価を有していることを確認後に得られた血清

付記6 交差反応試験血清2

抗ブルセラ抗体陰性牛を、炭疽生ワクチン、大腸菌6価不活化ワクチン、サルモネラ2価不活化ワクチン、ヘモフィルス・ソムナス不活化ワクチン、クロストリジウム3価トキソイド及び破傷風トキソイドワクチンで免疫し、各ワクチンを抗原とした酵素抗体法において、一定以上の吸光度を有していることを確認後に得られた血清

付記7 弱陽性血清

参照陽性血清と参照陰性血清を混合し、酵素抗体法を行ったときの%P値が13.1以上22.8以下となるように調整したもの