

オーエスキー病ウイルス糖たん白 g I 抗体識別用酵素抗体反応キット（抗原吸着・ビオチン標識抗体）

令和2年2月5日（告示第231号）一部改正

オーエスキー病ウイルスを不活化した抗原をプレートに吸着させ、酵素抗体法により、オーエスキー病ウイルス糖たん白 gI 抗体を識別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

抗原吸着プレートを用いる。

1.1.1.3 標識抗体

ビオチン標識抗オーエスキー病ウイルス糖たん白 gI モノクローナル抗体（以下「標識抗体」という。）を用いる。

1.1.2 試験方法

抗原吸着プレートの各穴に反应用緩衝液（付記1）を100 μ Lずつ加え、5分間静置後、反应用緩衝液を捨てる。指示陰性血清及び指示陽性血清を抗原吸着プレートの各4穴に、残りはブランクとし、反应用緩衝液を100 μ Lずつそれぞれ加え、プレートを密閉して37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。洗浄液（付記2）を各穴に加え、1～2分間放置後、洗浄液を捨てる。同様に2～3回洗浄を行った後、反应用緩衝液で100倍に希釈した標識抗体を100 μ Lずつ各穴に加え、2～5 $^{\circ}$ Cで一夜反応させる。洗浄液を各穴に加え、1～2分間放置後、洗浄液を捨てる。同様に2～3回洗浄を行った後、水で洗浄する。1.0mLの滅菌水で溶解したペルオキシダーゼ標識アビジン液を反应用緩衝液で50倍に希釈し、100 μ Lずつ各穴に加えた後、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。洗浄液を各穴に加え、1～2分間放置後、洗浄液を捨てる。同様に2～3回洗浄を行った後、水で洗浄する。基質濃縮液（付記3）の1 mLに滅菌水10mLを加え、さらに、発色剤の185 μ Lを加えた基質液を各穴に10 μ Lずつ入れ、常温で15分間反応させる。その後、直ちに各穴に停止液（付記4）を50 μ Lずつ反応を停止させ、450nmの波長でそれぞれの吸光度値を測定する。

1.1.3 判定

ブランクの吸光度値はすべて0.8以上でなければならない。指示陰性血清の各4穴の吸光度値は、いずれも0.8以下でなければならない。また、指示陽性血清の平均吸光度値の吸光度率は、45%以下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

抗原吸着プレートを用いる。

1.2.1.2 対照血清

抗豚熱ウイルス血清（付記6）、抗糖たん白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清（付記7）、抗豚丹毒血清（付記8）、参照陽性血清（付記9）及び参照陰性血清（付記10）を用いる。

1.2.1.3 標識抗体

1.1.1.3の標識抗体を用いる。

1.2.2 試験方法

抗原吸着プレートの各1列8穴にそれぞれの対照血清を100 μ Lずつ入れ、1.1.2の試験方法を準用して試験を行う。

1.2.3 判定

抗豚熱ウイルス血清、抗糖たん白gI欠損オーエスキー病ウイルス血清及び抗豚丹毒血清の吸光度率は65%以上、参照陽性血清の吸光度率は55%以下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

抗原吸着プレートを用いる。

1.3.1.2 対照血清

指示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

指示陽性血清を反応用緩衝液で2倍階段希釈し、参照陰性血清とともに1.1.2を準用して試験を行う。

1.3.3 判定

参照陰性血清の平均吸光度率が60%以下となる指示陽性血清の最高希釈倍数を gI 力価とすると、指示陽性血清の gI 力価は、4～16倍でなければならない。

付記1 反応用緩衝液

0.15mol/L リン酸緩衝食塩液 (pH7.4) 1,000mL に牛血清アルブミン0.1g 及びポリソルベート20又はポリソルベート80 0.05g を加えたもの

付記2 洗浄液

塩化ナトリウム36.0g 及びポリソルベート20又はポリソルベート80 1.5g を少量の水で溶解し、0.15mol/L リン酸緩衝食塩液 (pH7.4) を66.6mL 加えた後、水で1,000mL とし、pH7.1～7.2に調整したもの

付記3 基質濃縮液

尿素過酸化水素1錠 (0.14g) を10mL の水に溶解し、この溶液0.5mL を基質緩衝液 5 mL に添加したもの

ただし、基質緩衝液は酢酸ナトリウム136g を約800mL の水で溶解し、クエン酸を用いて pH を5.5～5.7に調整した後、水で1,000mL とし、ろ過滅菌したもの

付記4 停止液

水1,000mL に濃硫酸110mL を加えたもの

付記5 吸光度率

吸光度率は下記の計算式により算出する。

吸光度率 (%) = (被検血清の吸光度値又はその平均値 / 参照陰性血清の吸光度値の平均値) × 100

付記6 抗豚熱ウイルス血清

豚熱ウイルス GPE⁺株で免疫した豚の血清で、中和抗体価128倍以上のものただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記7 抗糖蛋白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清

糖蛋白 gI を欠損したオーエスキー病ウイルスで免疫した豚の血清で、中和抗体価8倍以上のもの

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記8 抗豚丹毒血清

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井株65-0.15株で免疫した豚の血清で、生菌発育凝集価128倍以上のもの

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記9 参照陽性血清

オーエスキー病ウイルス山形S81株で免疫した豚の血清で、中和抗体価32倍以上のもの

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記10 参照陰性血清

オーエスキー病ウイルスに対する抗体を保有しない豚の血清