

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・ペルオキシダーゼ標識抗体）

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 又は 1.1.2 の試験を行う。

1.1.1 吸光度試験 1

1.1.1.1 試験材料

1.1.1.1.1 被検材料

指示陽性血清及び指示陰性血清を用いる。

1.1.1.1.2 抗原

抗原吸着プレートを用いる。

1.1.1.1.3 標識抗体

ペルオキシダーゼ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（以下この項において「標識抗体」という。）を用いる。

1.1.1.2 試験方法

指示陽性血清を抗原吸着プレートの3穴に、指示陰性血清を抗原吸着プレートの2穴に、それぞれ 100 μ L ずつ入れる。プレートを密閉して常温で 60 分間反応させた後、濃縮洗浄液を水で 10 倍に希釈した洗浄液で5回洗浄する。標識抗体 100 μ L ずつを各穴に加え、常温で 20 分間反応させる。洗浄液を用いて5回洗浄した後、テトラメチルベンチジン原液をテトラメチルベンチジン希釈液で2倍に希釈した液の 100 μ L ずつを各穴に加え、常温で 15 分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液を 50 μ L ずつに加え、650nm の波長で各穴の吸光度値を測定する。また、2穴に水を 150 μ L ずつ入れたブランクについても、650nm の波長で各穴の吸光度値を測定する。

1.1.1.3 判定

付記1により被検材料の平均吸光度値を算出する。

指示陰性血清の平均吸光度値は、全て 0.4 以上でなければならない。また、指示陰性血清の平均吸光度値から指示陽性血清の平均吸光度値を引いた値は、0.3 以上でなければならない。

1.1.2 吸光度試験 2

1.1.2.1 試験材料

1.1.2.1.1 被検材料

指示陽性血清及び指示陰性血清を試料とする。

1.1.2.1.2 抗原

抗原固相化プレートを用いる。

1.1.2.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

1.1.2.2 試験方法

抗原固相化プレートのブランクを除く4穴にそれぞれ指示陽性血清及び指示陰性血清を 100 μ L、サンプル希釈液を 25 μ L 添加し、37℃で 120 分間反応させる（一次反応）。一次反応終了後、反応液を除去し、全ての穴を洗浄液で満たして4回洗浄する。ブランクを除く全ての穴に標識抗体

を 100 μ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる（二次反応）。二次反応終了後、反応液を除去し、全ての穴を洗浄液で満たして 4 回洗浄する。基質溶液を 100 μ L ずつ全ての穴に添加し、暗所室温（21 \pm 5 $^{\circ}$ C）で 15 分間反応させる。反応終了後、反応停止液を 100 μ L ずつ全ての穴に添加し、反応を停止させる。反応停止後、波長 450nm でブランクを対照として吸光度値を測定する。

1.1.2.3 判定

指示陽性血清及び指示陰性血清の平均吸光度値を算出する。指示陰性血清の平均吸光度値から指示陽性血清の平均吸光度値を引いた値は、0.600 より大きくなければならない。また、指示陰性血清の吸光度値は、0.700 以上でなければならない。

1.2 特異性試験

1.2.1 又は 1.2.2 の試験を行う。

1.2.1 特異性試験 1

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 被検材料

抗原吸着プレートを用いる。

1.2.1.1.2 対照血清

抗豚熱ウイルス血清（付記 2）、抗糖たん白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清（付記 3）、抗豚丹毒血清（付記 4）、参照陽性血清（付記 5）、参照陰性血清（付記 6）及び指示陰性血清を用いる。

1.2.1.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

1.2.1.2 試験方法

被検血清希釈液で 2 倍に希釈したそれぞれの対照血清を抗原吸着プレートの各 2 穴に 100 μ L ずつ入れ、1.1.1.2 の試験方法を準用して試験を行う。

1.2.1.3 判定

各対照血清の平均吸光度値から S/N 比（付記 7）を算出する。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、抗豚丹毒血清及び参照陰性血清の S/N 比は 0.7 以上、参照陽性血清の S/N 比は 0.6 未満でなければならない。

1.2.2 特異性試験 2

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 被検材料

抗原固相化プレートを用いる。

1.2.2.1.2 対照血清

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

1.2.2.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

1.2.2.2 試験方法

対照血清を 1.1.2.2 を準用して試験を行う。ただし、各試料は、それぞれ 4 穴を用いる。

1.2.2.3 判定

対照血清の平均吸光度値を算出する。抗豚熱ウイルス血清、抗糖たん白 gE (gI) 欠損オーエスキー病ウイルス血清、抗豚丹毒血清及び参照陰性血清の平均吸光度値は 0.800 以上、参照陽性血清の平均吸光度値は 0.300 以下でなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 又は 1.3.2 の試験を行う。

1.3.1 力価試験 1

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 被検材料

抗原吸着プレートを用いる。

1.3.1.1.2 対照血清

指示陽性血清及び参照陰性血清を用いる。

1.3.1.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

1.3.1.2 試験方法

被検血清希釈液で2倍階段希釈した指示陽性血清及び希釈をしない参照陰性血清の各 100 μ L ずつを抗原吸着プレートのそれぞれ2穴以上に入れ、1.1.1.2を準用して試験を行う。

1.3.1.3 判定

参照陰性血清の平均吸光度値の60%以下を示す指示陽性血清の最高希釈倍数をgI力価とする。指示陽性血清のgI力価は、32～128倍でなければならない。

1.3.2 力価試験2

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 被検材料

抗原固相化プレートを用いる。

1.3.2.1.2 対照血清

参照陽性血清及び参照陰性血清を試料とする。

1.3.2.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

1.3.2.2 試験方法

参照陽性血清をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、16倍、32倍、64倍及び128倍希釈したものを用い、参照陰性血清と共に1.1.2.2を準用して試験を行う。ただし、各試料は、それぞれ2穴を用いる。

1.3.2.3 判定

対照血清の平均吸光度値を算出する。参照陰性血清の平均吸光度値の40%を超える直前の希釈倍率を力価としたとき、参照陽性血清の力価は、16～64倍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。

被検材料の吸光度値 = 被検材料の読取り値 - (各ブランクの読取り値の和 / ブランク穴数)

平均吸光度値 = 被検材料の各吸光度値の和 / 被検材料の穴数

付記2 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あって、中和抗体価64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3 抗糖たん白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清

糖たん白 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あって、中和抗体価16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4 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あって、生菌発

育凝集価 64 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 5 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あって、中和抗体価が 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 6 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

付記 7 S/N比

S/N比は、下記の計算式により算出する。

$S/N比 = \text{被検血清の平均吸光度値} / \text{指示陰性血清の平均吸光度値}$