

オーエスキー病診断用酵素抗体反応キット（確定用）

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抗体を確定的に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

指示陰性血清、指示弱陽性血清及び指示強陽性血清を用いる。

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

ペルオキシダーゼ標識抗豚 IgG 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陽性抗原穴及び陰性抗原穴のそれぞれ3穴に指示陰性血清及び指示弱陽性血清を、陽性抗原穴の2穴に指示強陽性血清をそれぞれ100 μ Lずつ加える。また、2穴をブランクとする。プレートを密閉して20～25 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。濃縮洗浄液を水で10倍に希釈した洗浄液300 μ Lずつで5回洗浄する。洗浄したプレートの各穴に標識抗体50 μ Lずつを加え、20～25 $^{\circ}$ 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5回洗浄する。基質原液を希釈液で110倍に希釈した基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、20～25 $^{\circ}$ Cで20分間反応させた後、停止液（付記1）50 μ Lを加え、反応を停止させる。また、ブランクとした2穴に水150 μ Lを加える。直ちに410nmの波長でそれぞれの吸光度を測定する。

1.1.3 判定

被検材料の平均吸光度実測値からブランクとした穴の吸光度の平均値を引いた値を被検材料の平均吸光度値とする。指示陰性血清の陽性抗原穴及び陰性抗原穴における平均吸光度値は、いずれも0.1以下でなければならない。指示弱陽性血清の陽性抗原穴における平均吸光度値と指示陰性血清の陽性抗原穴における平均吸光度値の差は、0.15以上でなければならない。また、指示強陽性血清の陽性抗原穴における平均吸光度値を指示弱陽性血清の陽性抗原穴における平均吸光度値で割った値は、2.0以上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2）、抗豚丹毒血清（付記3）、参照陽性血清（付記4）及び参照陰性血清（付記5）を用いる。

1.2.1.3 指示血清

指示陰性血清、指示弱陽性血清及び指示強陽性血清を用いる。

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

抗原吸着プレートの陽性抗原穴及び陰性抗原穴のそれぞれ2穴ずつに血清希釈液でそれぞれ20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。それぞれの対照血清の平均吸光度値からS/P比（付記6）及びS/N比（付記7）を求める。

1.2.3 判定

抗豚熱ウイルス血清、抗豚丹毒血清及び参照陰性血清のS/P比はいずれも0.4未満でなければならず、参照陽性血清のS/P比は、0.4以上、S/N比は、1.8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

抗原吸着プレートを用いる。

1.3.1.2 対照血清

指示強陽性血清及び参照弱陽性血清（付記8）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

指示強陽性血清を血清希釈液で2倍階段希釈したそれぞれの対照血清及び血清希釈液で20倍希釈した参照弱陽性血清を陽性抗原穴の2穴ずつにそれぞれ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

階段希釈したそれぞれの指示強陽性血清の平均吸光度値を参照弱陽性血清の平均吸光度値で割った値が2.0以上を示す指示強陽性血清の最高希釈倍数を力価とする。

指示強陽性血清の力価は、8～32倍でなければならない。

1.4 陰性抗原確認試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 被検材料

抗原吸着プレートを用いる。

1.4.1.2 対照血清

参照抗 Vero 細胞血清（付記9）を用いる。

1.4.1.3 標識抗体

1.1.1.3 の標識抗体を用いる。

1.4.2 試験方法

血清希釈液で20倍に希釈した対照血清100 μ L ずつを2つの陰性抗原穴に加え、1.1.2の試験方法を準用して試験を行う。

1.4.3 判定

対照血清の平均吸光度値は、0.75～1.25でなければならない。

付記1 停止液

46%フッ化水素酸液1 mL に水を加えて400mL としたもの

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、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4 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、吸光度試験法により測定した吸光度値が 1.042 ± 0.100 となるように調整し、凍結乾燥したもの
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 参照陰性血清

健康な豚から採取した血清で、吸光度試験法により測定した吸光度値が 0.042 ± 0.020 となるように調整し、凍結乾燥したもの

付記6 S/P比

指示陰性血清の陽性抗原穴の平均吸光度値をN、指示弱陽性血清の陽性抗原穴の平均吸光度値をP、対照血清の陽性抗原穴の平均吸光度値をSとして、S/P比は下記の計算式により算出する。

ただし、Nは0.1以下でなければならず、P-Nは0.15以上でなければならず、指示強陽性血清の平均吸光度値を指示弱陽性血清の平均吸光度値で割った値は2.0以上でなければならぬ。

なお対照血清、対照血清の陽性抗原穴の平均吸光度実測値からブランク穴の平均吸光度値を引いたものを対照血清の平均吸光度値とする。

$$S/P \text{ 比} = \frac{S - N}{P - N}$$

付記7 S/N比

対照血清の陽性抗原穴の平均吸光度値をSとし、対照血清の陰性抗原穴の平均吸光度値をNHC (S)として、S/N比は下記の計算式により算出する。

なお、対照血清の陽性抗原穴の平均吸光度実測値からブランク穴の平均吸光度値を引いたものを対照血清の平均吸光度値とする。

$$S/N \text{ 比} = \frac{S}{NHC (S)}$$

付記8 参照弱陽性血清

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、吸光度試験法により測定した吸光度値が 0.189 ± 0.040 となるように調整し、凍結乾燥したもの
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 参照抗 Vero 細胞血清

豚に Vero 細胞可溶化抗原を免疫して得られた血清を凍結乾燥したもので、Vero 細胞可溶化抗原を用いたゲル内沈降反応で明瞭な2本の沈降線を形成する。また、吸光度試験法により測定した陰性抗原穴における吸光度値は0.843~1.133である。

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。