

豚熱診断用酵素抗体反応キット

令和2年2月5日（告示第231号）一部改正

豚熱ウイルスを不活化及び可溶化後、豚熱ウイルス糖蛋白E2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又はプレート（以下「マイクロストリップ等」という。）に吸着させ、酵素抗体法により豚熱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 反応用抗原

抗原吸着マイクロストリップ等を用いる。

1.1.1.3 標識抗体

抗体希釈用液で400倍に希釈した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

抗原吸着マイクロストリップ等の保存液を捨て、抗原陽性穴及び抗原陰性穴の各2穴に指示陽性血清及び指示陰性血清をそれぞれ100 μL 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等を密閉して37℃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 μL ずつで4回洗浄する。洗浄したマイクロストリップ等の各穴及びブランクとした2穴に標識抗体100 μL ずつを加え、密閉して37℃で30分間反応させる。標識抗体を除去した後、洗浄液300 μL ずつで4回洗浄する。発色基質液又は用法用量に従って調整した基質液100 μL ずつを各穴に加え、室温で12～13分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液を50 μL ずつ加え、速やかに（5分以内に）450nmの波長で各穴の吸光度値を測定する。

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。

指示陽性血清の抗原陽性穴における平均吸光度値は、発色基質液を用いた場合は0.60以上2.0以下、それ以外を用いた場合は0.60以上1.3以下で、抗原陰性穴における平均吸光度値は、0.12以下でなければならない。指示陰性血清の抗原陽性穴及び抗原陰性穴における平均吸光度値は、いずれも0.12以下でなければならない。また、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は、指示陽性血清では発色基質液を用いた場合は0.60以上2.0以下、それ以外を用いた場合は0.60以上1.3以下、指示陰性血清では0.05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等を用いる。

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

指示陽性血清及び指示陰性血清を用いる。

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等の保存液を捨て、抗原陽性穴及び抗原陰性穴の各2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

それぞれの対照血清の平均吸光度値からS/P値（付記5）を求める。

交差反応試験血清及び参照陰性血清のS/P値は、いずれも0.05未満でなければならず、参照陽性血清のS/P値は0.1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等を用いる。

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等の保存液を捨て、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

参照陽性血清の抗原陽性穴における平均吸光度値は、発色基質液を用いた場合は0.60以上2.00以下、それ以外を用いた場合は0.60以上1.30以下で、抗原陰性穴における平均吸光度値は、0.12以下でなければならない。参照陰性血清の抗原陽性穴及び抗原陰性穴における平均吸光度値はいずれも0.12以下でなければならない。また、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は、参照陽性血清では発色基質液を用いた場合は0.60以上2.00以下、それ以外を用いた場合は0.60以上1.30以下、参照陰性血清では0.05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。

対照血清の吸光度値＝対照血清の読取り値－(各ブランクの読取り値の和／ブランク穴数)

平均吸光度値＝対照血清の各吸光度値の和／対照血清の穴数

付記2 交差反応試験血清

豚熱ウイルスに対する抗体を保有しない豚をオーエスキー病ウイルス、日本脳炎ウイルス、豚パルボウイルス、ゲタウイルス及び豚丹毒菌で免疫して得られた血清で、各々下記の抗体価を示すもの

オーエスキー病ウイルス	ラテックス凝集抗体価 40倍以上
日本脳炎ウイルス	中和抗体価 10倍以上
豚パルボウイルス	赤血球凝集抑制抗体価 320倍以上
ゲタウイルス	赤血球凝集抑制抗体価 80倍以上
豚丹毒菌	生菌発育凝集価 16倍以上

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 参照陽性血清

豚熱ウイルス GPE⁻株で免疫した豚の血清で、中和抗体価が 128 倍以上を示し、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発色基質液を用いた場合は 0.60 以上 2.0 未満、それ以外を用いた場合は 0.60 以上 1.3 未満を示すもの

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 参照陰性血清

豚熱ウイルスに対する抗体を保有しない豚の血清で、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 0.05 未満を示すもの

付記 5 S/P 値

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。

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