

ヨーネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（不活化マイコバクテリウム・フレイ菌可溶化たん白吸収剤）

平成 15 年 3 月 11 日 新規追加

マイコバクテリウム・アビウム菌体から抽出した抗原をプレートに固相化し、マイコバクテリウム・フレイ菌可溶化たん白を吸収剤として処理した血清について、酵素抗体法により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

抗原固相化プレートの保存液を除去後、洗浄液（付記 1）で洗浄する。このプレートの各 4 穴に、吸収処理及び希釈した指示陽性血清及び指示陰性血清を 100 μ L ずつ分注し、25℃ で 2 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。ブランクは添付の ELISA 緩衝液を用いる。なお、吸収処理は、それぞれの血清 20 μ L に吸収剤 180 μ L を加え、それを最終 200 倍の吸収血清とする。さらに ELISA 緩衝液 150 μ L に 200 倍希釈の吸収指示陽性血清を 50 μ L 加え、最終 800 倍希釈の吸収指示陽性血清を作製する。

次に ELISA 緩衝液で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体をブランクを除く全穴に 100 μ L ずつ加え、密封して 25℃ で 2 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。なお、ブランクには ELISA 緩衝液を加える。

次に使用直前に調整した基質溶液（添付の基質を基質緩衝液で 100 倍に希釈したもの）100 μ L を全穴に加え、遮光して 25℃ で 15 分間反応させた後、反応停止液（付記 2）を 100 μ L ずつ全穴に加え、450nm で吸光度値を測定する。

1.1.3 判定

200 倍に希釈した指示陽性血清の平均吸光度値が 1.0 ~ 1.6 で、指示陰性血清の平均吸光度値が 0.35 以下であるとき、800 倍希釈指示陽性血清の平均吸光度値を T、200 倍希釈指示陰性血清の平均吸光度値を N、200 倍希釈指示陽性血清の平均吸光度値を P とし、 $(T - N) / (P - N)$ により E 値を求める。E 値は小数点第 3 位を四捨五入した数値で表す。

このとき、800 倍希釈指示陽性血清の E 値は、0.30 ~ 0.65 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）及び特異性検定用血清（付記 5）を試験材料とする。

1.2.2 試験方法

1.1.2 に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び特異性検定用血清の吸光度を測定する。ただし、血清は 200 倍に希釈する。

1.2.3 判定

1.1.3 の判定に準じて E 値を算出する。ただし、T は特異性検定用血清の平均吸光度値、N は参照陰性血清の平均吸光度値、P は参照陽性血清の平均吸光度値とする。特異性検定用血清の E 値は 0.35 以下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、参照陰性血清及び力価検定用血清（付記6）を試験材料とする。

1.3.2 試験方法

1.1.2 に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び力価検定用血清の吸光度を測定する。ただし、参照陽性血清及び参照陰性血清は 200 倍に希釈し、力価検定用血清は 200 倍から更に 2 倍階段希釈する。

1.3.3 判定

1.1.3 の判定に準じ E 値を算出する。ただし、T は力価検定用血清の各段階の希釈液の平均吸光度値とする。

E 値が 0.35 を下回る直前の血清の希釈倍数を力価とすると、力価検定用血清の力価は 1,600 ~ 6,400 倍でなければならない。

付記 1 洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.5 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3.12 g

ポリソルベート 80 0.2 mL

水 残量

4 mol/L 水酸化ナトリウムで pH を 7.2 に調整する。

付記 2 反応停止液

硫酸 110 mL

水 1,000 mL

付記 3 参照陽性血清

マイコバクテリウム・アビウム ATCC19698 株の培養菌を子牛の静脈に接種し、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 20 倍以上を示した時点の血清で、その 200 倍希釈液は、酵素抗体法において、1.0 ~ 1.6 の吸光度値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記 4 参照陰性血清

健康牛の血清で、その 200 倍希釈液は、酵素抗体法において、0.35 以下の吸光度値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記 5 特異性検定血清

マイコバクテリウム・フレイ 354-NIAH 株の培養菌を不活化後、子牛に接種し、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 80 倍以上を示した時点の血清で、その 200 倍希釈液は、酵素抗体法において 0.35 以下の E 値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記 6 力価検定用血清

マイコバクテリウム・アビウム P-18-NIAH 株の培養菌を不活化後、子牛に接種し、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 160 倍以上を示した時点の血清で、酵素抗体法において E 値が 0.35 を下回る直前の希釈倍数が 1,600 ~ 6,400 倍を示すように調整し、凍結乾燥したもの