

# ヨーネ病診断用酵素抗体反応キット

マイコバクテリウム・アビウムの菌体から抽出した抗原をプレートで処理し、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 特異性試験

#### 1.1.1 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 1）、参照陰性血清（付記 2）及び特異性検定用血清（付記 3）を用いる。

#### 1.1.2 試験方法

抗原を 10 単位 / mL となるように抗原希釈用緩衝液（付記 4）に溶解する。酵素抗体法用プレートの奇数列の各穴には、抗原希釈液を 0.2mL ずつ、偶数列の各穴には、抗原希釈用緩衝液を 0.2 mL ずつ分注する。4 で一夜静置し、洗浄液（付記 5）で洗浄する。次に 0.2w/v%ゼラチン加リン酸緩衝食塩液（付記 6）を 0.3mL ずつ分注し、室温で 1 時間静置した後、洗浄液で洗浄する。このプレートの各穴に吸収処理及び希釈した血清を 0.2mL ずつ付記 7 に示すように分注し、25 で 2 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。なお、吸収処理は、それぞれの血清 0.1mL に、0.1w/v%アジ化ナトリウム加リン酸緩衝食塩液 60mL で復水させた吸収剤と等量のカオリン液（付記 8）との混合液 3.9mL を加え、25 で 30 分間攪拌後、4 で一夜反応させる。また、血清の希釈は希釈用リン酸緩衝食塩液（付記 9。以下「血清希釈用 PBS」という。）で、参照陽性血清は 400 倍及び 1,600 倍、参照陰性血清及び特異性検定用血清は 200 倍となるようにする。

次に 99.5mL の血清希釈用 PBS に溶解した抗牛 IgG<sub>1</sub> 兔血清（以下「標識抗体」という。）（5 単位 / mL）を 0.2mL ずつ全穴に加え、25 で 2 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。

次に 99.5mL の血清希釈用 PBS に溶解したペルオキシダーゼ標識抗兔 IgG ヤギ血清（以下「標識抗体」という。）（5 単位 / mL）を 0.2mL ずつ全穴に加え、25 で 2 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。

次に基質・発色液（付記 10）を 0.1mL ずつ加え、1 分間攪拌した後、遮光して常温で 30 分間反応させた後、反応停止液（付記 11）を 50  $\mu$ L ずつ加え、各穴の吸光度を主波長 415nm、副波長 492 nm で測定し、その差を吸光度値とする。

#### 1.1.3 判定

抗原処理した穴の吸光度値から抗原未処理の穴の吸光度値を減じた値から、各血清の平均吸光度値を算出する。特異性検定用血清の平均吸光度値を T、1,600 倍希釈参照陽性血清の平均吸光度値を Tr、400 倍希釈参照陽性血清の平均吸光度値を P 及び 200 倍希釈参照陰性血清の平均吸光度値を N とし、 $(T - N) / (P - N)$  により E 値を、 $(Tr - N) / (P - N)$  により Er 値を求める。得られた E 値に  $(0.6 / Er \text{ 値})$  を乗じて抗体価を算出する。抗体価は、小数点第 2 位を四捨五入した数値で表す。ただし、Er 値が 0.5 ~ 0.8 の範囲外にあるときは再試験を行う。

特異性検定用血清の抗体価は、0.4 以下でなければならない。

## 1.2 力価試験

### 1.2.1 試験材料

試験品、参照陽性血清、参照陰性血清及び力価検定用血清（付記 12）を用いる。

### 1.2.2 試験方法

1.1.2 に準じ、参照陽性血清、指示陰性血清及び力価検定用血清について各穴の吸光度を測定する。ただし、指示陰性血清及び力価検定用血清は 200 倍、指示陽性血清は 400 倍に希釈する。

### 1.2.3 判定

1.1.3 に準じ抗体価を算出する。ただし、T は指示陽性血清、指示陰性血清及び力価検定用血清の

それぞれの平均吸光度値とする。

指示陽性血清の抗体価は 0.8 ~ 1.1、指示陰性血清の抗体価は 0.1 以下及び力価検定用血清の抗体価は 0.9 ~ 1.2 でなければならない。

#### 付記 1 参照陽性血清

マイコバクテリウム・アピウム J - 3 株の培養菌を子牛に経口接種し、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 400 倍希釈液は、酵素抗体法において、0.9 ~ 1.4 の吸光度値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

#### 付記 2 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、0.06 ~ 0.24 の吸光度値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

#### 付記 3 特異性検定用血清

結核病罹患牛より得た血清で、その 200 倍希釈液は酵素抗体法において、0.4 以下の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの

#### 付記 4 抗原希釈用緩衝液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム	3	g
炭酸ナトリウム	1.45	g
アジ化ナトリウム	0.5	g
ポリソルベート 80	0.01	mL
水		残 量

pH を 9.5 ~ 9.6 に調整する。

#### 付記 5 洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.5	g
リン酸水素二ナトリウム二水和物塩	3.12	g
ポリソルベート 80	0.2	mL
水		残 量

加熱溶解し、4mol/L 水酸化ナトリウムで pH を 7.2 に調整する。

#### 付記 6 0.2w/v%ゼラチン加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

ゼラチン	2	g
ダルベッコ PBS ( - ) 粉末	9.6	g
アジ化ナトリウム	1	g
水		残 量

110 で 15 分間滅菌する。

付記7 特異性及び力価試験の各血清希釈のプレート配置図

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 倍希釈		400 倍希釈		200 倍希釈						1,600 倍	
B	参照陰性		指示陽性		特異性						希釈参照	
C	血清		血清		検定用血清						陽性血清	
D												
E	200 倍希釈		200 倍希釈								400 倍希釈	
F	指示陰性		力価検定用								参照陽性	
G	血清		血清								血清	
H												

付記8 カオリン液

1,000mL 中

カオリン	100	g
ダルベッコ PBS ( - ) 粉末	9.6	g
アジ化ナトリウム	1	g
水	残	量

付記9 血清希釈用 PBS

1,000mL 中

1 塩化ナトリウム	50	g
2 ダルベッコ PBS ( - ) 粉末	9.6	g
3 ポリソルベート 80	1	mL
4 ゼラチン	2	g
水	残	量

1 及び 2 を溶解し、1mol/L 水酸化ナトリウムで pH7 を .2 に調整したものに、加温溶解した 3 及び 4 を加えて、1,000mL とし、110 で 15 分間高圧滅菌する。

付記10 基質・発色液

1,000mL 中

1 クエン酸	9.6	g
2 2,2' - アジノービス ( 3 - エチル ベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 )	200	mg
3 過酸化水素水	0.25	mL
水	残	量

1 を 800mL の水に溶解後、4mol/L 水酸化ナトリウムで pH4.0 に調整し、さらに水を加え、1,000mL とした後、120 で 15 分間滅菌する。これを常温に冷却した後、2 及び 3 を加える。

付記11 反応停止液

5w/v% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液を用いる。

付記 12 力価検定用血清

マイコバクテリウム・アビウム J - 3 株の培養菌を子牛に経口接種し、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 5 倍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、0.9 ~ 1.2 の抗体価を示すように調整し、凍結乾燥したもの