

# オーエスキー病診断用酵素抗体反応抗原

オーエスキー病ウイルスに特異的な精製抗原をプレートに吸着させ乾燥状態にした酵素抗体反応抗原である。

## 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 反应用抗原

抗原吸着プレート及び酵素標識プロテインAを用いる。

#### 1.1.2 試験方法

抗原吸着プレートを洗浄液で3回洗浄した後、指示陽性血清及び指示陰性血清をそれぞれ3穴に15 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた後、洗浄液で3~4回洗浄し、各穴に酵素標識プロテインA液を25 $\mu$ L加え、37 $^{\circ}$ Cで20分間反応させる。その後洗浄液で3~4回洗浄し、基質(付記1)と発色剤(付記2)との混合溶液を各穴に50 $\mu$ Lずつ加え、遮光して常温で30分間反応させた後、直ちに反応停止剤(付記8)を各穴に50 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、405nmの波長でそれぞれの吸光度値を測定する。

#### 1.1.3 判定

指示陽性血清の平均吸光度値は、1.0~1.5でなければならず、指示陰性血清の平均吸光度値は、0.4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

抗原吸着プレート及び酵素標識プロテインAを用いる。

#### 1.2.1.2 反应用血清

オーエスキー病ウイルス感染耐過豚血清(付記4)、抗体陰性の非感染豚血清、指示陽性血清及び指示陰性血清を用いる。

感染耐過豚血清は、血清希釈液(付記5)で100倍に、非感染豚血清は、血清希釈液で10倍に希釈して用いる。

#### 1.2.2 試験方法

1.1.2の試験方法を準用する。

#### 1.2.3 判定

感染耐過豚血清の吸光度値の平均値又は非感染豚血清の吸光度値の平均値をS、指示陽性血清の吸光度値の平均値をP、及び指示陰性血清の吸光度値の平均値をNとして次式によりE値を算出する。

$$E = \frac{S - N}{P - N}$$

感染耐過豚血清でのE値は0.4以上でなければならず、非感染豚血清でのE値は、0.4未満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

抗原吸着プレート及び酵素標識プロテインAを用いる。

#### 1.3.1.2 参照血清

参照陽性血清（付記6）及び参照陰性血清（付記7）を用いる。

#### 1.3.2 試験方法

1.1.2 の試験方法を準用する。

#### 1.3.3 判定

参照陽性血清で反応させた平均吸光度値は、1.0～1.6でなければならず、参照陰性血清の平均吸光度値は、0.05未満でなければならない。

#### 付記1 基質

過酸化水素水の0.3vol %溶液を作製し、同溶液1に対して基質・発色剤溶解液50の割合で混合したもの

基質・発色剤溶解液は次のように調製する。

クエン酸21gに水を加えて1,000mLとする（A液）。

無水リン酸水素二ナトリウム28.4gに水を加えて1,000mLとする（B液）。

A液とB液をおよそ1：1.3に混合し、pHを4.0に調整する。

#### 付記2 発色剤

2, 2' - アジノ - ビス - ( 3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸 ) を基質・発色剤溶解液に0.8mg / mLとなるように溶解する。

この溶液は、使用直前に作製する。

#### 付記3 反応停止剤

0.1mol/L 水酸化ナトリウム溶液を用いる。

#### 付記4 オーエスキー病ウイルス感染耐過豚血清

オーエスキー病ウイルス感染耐過豚血清であって、56℃で30分間非働化したもの

#### 付記5 血清希釈液

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸二ナトリウム 1.15 g

リン酸一カリウム 0.2 g

水を加えて1,000mLとした後、牛血清アルブミン・フラクションVを1 w/v %となるように加える。

#### 付記6 参照陽性血清

オーエスキー病ウイルス感染豚由来の抗オーエスキー病ウイルス血清で56℃で30分間非働化したものを、酵素標識プロテインAを用いた酵素抗体法で発色させ、405nmの波長で測定した吸光度が1.3を示すように調整し、凍結乾燥したもの

#### 付記7 参照陰性血清

オーエスキー病ウイルスに対する中和抗体が陰性の非感染豚血清を血清希釈液で100倍に希釈し、酵素標識プロテインAを用いた酵素抗体法で発色させ、405nmの波長で測定した吸光度が0.05未満を示すように調整し、凍結乾燥したもの