

# 牛肺疫診断用補体結合反応抗原

## 1 定義

牛肺疫菌の死菌で調製した補体結合反応用抗原である。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

牛肺疫菌 V 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

既知の牛肺疫菌血清によって特異的に発育及び代謝が阻止される。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、10vol%馬血清加ブイオン又は適当と認められたマイコプラズマ用培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して5 以下で保存する。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培地

10vol%馬血清加ブイオン又は製造に適当と認められたマイコプラズマ用培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 培養菌液

種菌を製造用培地で培養し、培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.2 集菌及び洗浄

培養菌液を遠心集菌し、沈殿した菌をペロナル緩衝液（付記1。以下「希釈用液」という。）で遠心洗浄した後、精製水に再浮遊し、菌浮遊液とする。

#### 2.3.3 ろ過及び加薬

菌浮遊液を 100 で 10 分間加熱殺菌後、ろ過し、塩化ナトリウム及びフェノールをそれぞれ 0.85w/v% 及び 0.5w/v% となるように加え、5 で約 2 か月間静置し、死菌浮遊液とする。

#### 2.3.4 抗原価の調整

死菌浮遊液を希釈用液で 1 倍から 16 倍まで希釈する。参照陽性血清（付記2）を希釈用液で 5 倍に希釈した後、非働化し、2 倍階段希釈する。各段階の希釈菌液 0.1mL と希釈血清 0.5mL とを混合してボックスを組み、2 単位の補体 0.5mL を加え、37 で 30 分間処理する。その後 2.5vol% 羊血球浮遊液と 2 単位の溶血素とを等量に混合した感作血球液 1.0mL を加え、37 で 30 分間反応させ、抗体価を測定する。抗体価は 25 % 以上の溶血阻止を示す血清の最高希釈倍数とする。

参照陽性血清の所定の力価を示した菌液の最高希釈倍数を求める。0.5w/v% フェノール加生理食塩液で希釈し、0.1mL 中に 2 単位の抗原が含まれるように調整し、原液とする。

原液について、3.2 の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。

### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 培養菌液の試験

### 3.1.1 夾雑菌否定試験

検体を液状チオグリコール酸培地又は普通寒天平板 2 枚に塗抹し、37℃ で 5 ~ 7 日間培養するとき、牛肺疫菌以外の菌の発育を認めてはならない。

### 3.2 原液の試験

#### 3.2.1 生菌否定試験

検体 0.5mL ずつを 2.2.1 の培地 20mL 4 本に接種し、37℃ で 5 ~ 7 日間培養後、2.2.1 の培地に寒天を 1.2w/v% となるように加えた平板培地に移植し、5 vol% 炭酸ガス下で、37℃ で 5 ~ 7 日間培養したとき、マイコプラズマの発育を認めてはならない。

#### 3.2.2 特異性試験

##### 3.2.2.1 試験材料

検体、参照陽性血清及び陰性牛血清をそれぞれ非働化したものを用いる。

##### 3.2.2.2 試験方法

2 種類の参照陽性血清及び 5 例の陰性血清をそれぞれ希釈用液で 5 倍に希釈した後、更に 2 倍階段希釈する。各段階の希釈血清に検体を加え、2.3.4 の方法に準じて補体結合反応を行う。

##### 3.2.2.3 判定

陽性血清では、いずれも所定の抗体価を示さなければならず、陰性血清では、いずれも 5 倍未満でなければならない。また、4 単位の抗原により抗補体作用を認めてはならない。

##### 3.2.3 力価試験

検体、参照抗原（付記 3）及び参照陽性血清を非働化したものを用い、2.3.4 の方法に準じて補体結合反応を行うとき、検体は、参照陽性血清に対して参照抗原とほぼ等しい反応のパターンを示し、抗原価は、0.1mL 中 2 単位でなければならない。

### 3.3 小分製品の試験

#### 3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない。異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は均一でなければならない。

#### 3.3.2 力価試験

3.2.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

#### 付記 1 ペロナール緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 42.50 g

バルビタール 2.87 g

バルビタールナトリウム 1.87 g

塩化マグネシウム六水和物 1.67 g

塩化カルシウム二水和物 0.14 g

水 残量

バルビタールナトリウムを水で加温溶解後、他の薬剤を順次溶解し、原液とする。使用时、原液 1 容に水 4 容を混和する。

#### 付記 2 参照陽性血清

##### 1) 牛肺疫強陽性血清

牛肺疫人工感染牛より得た血清で、抗体価 2,560 ~ 5,120 倍のもの

##### 2) 牛肺疫弱陽性血清

牛肺疫人工感染牛より得た血清で、抗体価 40 ~ 80 倍のもの

付記 3 参照抗原

「牛肺疫診断用補体結合反応抗原」又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めるもの