

# ヨ一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）（予備的検出用）

平成23年2月16日(告示第409号)一部改正

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固相化したプレートを用いて、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予備的に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

指示陽性血清及び指示陰性血清を、サンプル希釈液でそれぞれ 50 倍に希釈し、25℃で 15 分間反応させる。抗原固相化プレートの各 4 穴に、各希釈血清を 100  $\mu$  L ずつ分注し、25℃で 45 分間反応させた後、洗浄液（付記 1）で 3 回洗浄する。標識抗体を標識抗体希釈液で 200 倍に希釈したものを、ブランクを除く各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、25℃で 45 分間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。基質を使用直前に基質緩衝液で 100 倍希釈したものを全穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 25℃で 15 分間反応させた後、反応停止液を全穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、450nm で吸光度値を測定する。

#### 1.1.3 判定

50 倍に希釈した指示陽性血清の平均吸光度値は、0.8 以上 1.6 以下であり、50 倍に希釈した指示陰性血清の平均吸光度値は、0.25 以下でなければならない。

## 1.2 特異性試験

### 1.2.1 特異性試験 1

#### 1.2.1.1 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 2）、参照陰性血清（付記 3）及び特異性検定用血清（付記 4）を試験材料とする。

#### 1.2.1.2 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。

#### 1.2.1.3 判定

特異性検定用血清の平均吸光度値を T、参照陽性血清の平均吸光度値を P、及び参照陰性血清の平均吸光度値を N とし、 $(T - N) / (P - N)$  により特異性検定用血清の ELISA 値を求める。

このとき、特異性検定用血清の ELISA 値は、0.35 以下でなければならない。

### 1.2.2 特異性試験 2

#### 1.2.2.1 試験材料

試験品及び特異性検定用血清を試験材料とする。

#### 1.2.2.2 試験方法

1.1.2 に準じて指示陽性血清、指示陰性血清及び特異性検定用血清の吸光度を測定する。

#### 1.2.2.3 判定

1.2.1.3 に準じて ELISA 値を求める。ただし、P は指示陽性血清の平均吸光度値、N は指示陰性血清の平均吸光度値とする。

このとき、特異性検定用血清の ELISA 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5）を用いる。

#### 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値を測定する。ただし、力価検定用血清は、サンプル希釈液で 50 倍から 2 倍階段希釈して、800 ～ 6,400 倍希釈したものをを用いる。

#### 1.3.3 判定

1.2.1.3 に準じて力価検定用血清の ELISA 値を求める。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。

ELISA 値が 0.3 を下回る直前の希釈倍数を力価とすると、力価検定用血清の力価は、800 倍以上 3,200 倍以下でなければならない。

#### 付記 1 洗浄液

濃縮洗浄液を水で 10 倍に希釈したもの

#### 付記 2 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内に接種し、ヨーネ病補体結合反応において、抗体価が 20 倍以上を示した時点の血清で、酵素抗体法において、その 50 倍希釈液の吸光度値が 1.0 以上 1.6 以下を示すように調整し、凍結乾燥したもの

#### 付記 3 参照陰性血清

健康牛の血清で、酵素抗体法において、その 50 倍希釈液の吸光度値が 0.3 以下を示すことを確認したものを、凍結乾燥したもの

#### 付記 4 特異性検定用血清

マイコバクテリウム・フレイ 354-NIAH 株の培養菌液を不活化後、子牛に接種し、ヨーネ病補体結合反応において、抗体価が 80 倍以上を示した時点の血清で、その 50 倍希釈液が、酵素抗体法において 0.35 以下の ELISA 値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

#### 付記 5 力価検定用血清

マイコバクテリウム・アビウム P-18-NIAH 株の培養菌液を不活化後、子牛に接種し、ヨーネ病補体結合反応において、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 ELISA 値が 0.3 を下回る直前の希釈倍数が 800 倍以上 3,200 倍以下を示すように調整し、凍結乾燥したもの