

コ－ネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（予備的検出用）

平成20年6月6日（告示第914号）

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、加熱処理マイコバクテリウム・フレイ菌体から抽出した抗原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、試料希釈吸収液でそれぞれ20倍に希釈し、 21 ± 5 で15分間吸収させる。吸収した各血清を抗原固相化マイクロプレートの各4ウェルに100 μ Lずつ分注し、 21 ± 5 で45分間反応させる。プレートを洗浄液（付記1）で3回洗浄後、標識抗体希釈液で100倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体液を各ウェルに100 μ Lずつ加え、 21 ± 5 で30分間反応させる。プレートを洗浄液で3回洗浄後、発色液を各ウェルに100 μ Lずつ加え、遮光して 21 ± 5 で10分間反応させた後、反応停止液を各ウェルに100 μ Lずつ加え、450nmで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0.7～2.0であり、指示陽性血清の平均吸光度値と指示陰性血清の平均吸光度値の比は7.0以上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、 $100 \times (T - N) / (P - N)$ により特異性検定用血清のS/P値を求める。

このとき、特異性検定用血清のS/P値は、50未満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S/P値を求める。ただし、Pは指示陽性血清の平均吸光度、及びNは指示陰性血清の平均吸光度とする。

特異性検定用血清のS/P値は、50未満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、力価検定用血清はリン酸緩衝食塩液で10倍から2倍階段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 S/P 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。

S/P 値が 70 以上を示す力価検定用血清の最高希釈倍数を力価とすると、力価は 400 又は 800 倍でなければならない。

付記 1 洗浄液

濃縮洗浄液を水で 20 倍に希釈したもの

付記 2 参照陽性血清

菌分離検査によってヨーネ病陽性と診断された牛由来で、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 40 ~ 80 倍を示す血清で、酵素抗体法において 0.7 ~ 2.0 の吸光度値を示すように参照陰性血清で調整し、- 80 で凍結保存したもの

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 0.1 未満の吸光度値であることを確認し、- 80 で凍結保存したもの

付記 4 特異性検定用血清

マイコバクテリウム・フレイ 5865-KB 株の培養菌を不活化後、水酸化アルミニウムゲルアジュバントを混合して健康牛に注射し、4 週間後に採血した血清で、酵素抗体法において 50 未満の S/P 値を示すように調整し、- 80 で凍結保存したもの

付記 5 力価検定用血清

ヨーネ病補体結合反応で抗体価が 40 ~ 80 倍を示す血清で、酵素抗体法において最終 800 倍希釈時の S/P 値が 55 ~ 95 となるように参照陰性血清で調整し、- 80 で凍結保存したもの