

ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症・パスツレラ・ムルトシダ感染症・マンヘミア・ヘモリチカ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 27 年 1 月 29 日（告示第 191 号）新規追加

1 定義

ヒストフィルス・ソムニの培養菌液、パスツレラ・ムルトシダの培養菌液及びマンヘミア・ヘモリチカの培養上清を不活化後混合し、アルミニウムゲルアジュバントを加えたワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ヒストフィルス・ソムニ

2.1.1.1 名称

ヒストフィルス・ソムニ M-1 Br 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

牛の髄腔内に注射すると、発症して死亡する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 2 代以内、種菌では 3 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、液体窒素で凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダ BP165/B 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛の気管内に接種すると、呼吸器症状を示す。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 2 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.3 マンヘミア・ヘモリチカ

2.1.3.1 名称

マンヘミア・ヘモリチカ HL2/B 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

牛の気管内に接種すると、呼吸器症状を示す。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 2 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ヒストフィルス・ソムニ

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.3 マンヘミア・ヘモリチカ

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ヒストフィルス・ソムニ

2.3.1.1 培養

種菌を平板培地で培養したものを更に液状培地で2代培養して、これを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1.1 及び 3.1.2.1 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2.1.1 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を集菌して得た沈渣をリン酸緩衝食塩液に浮遊し、濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.3.2.1 培養

種菌を平板培地で培養したものを更に液状培地で2代培養して、これを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1.2 及び 3.1.2.2 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を集菌して得た沈渣をリン酸緩衝食塩液に浮遊し、濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.3 マンヘミア・ヘモリチカ

2.3.3.1 培養

種菌を平板培地で培養したものを更に液状培地で2代培養して、これを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1.3、3.1.3 及び 3.1.4 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2.1.3 及び 3.2.2 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を遠心分離して上清を採取し、相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.4 最終バルク

ヒストフィルス・ソムニ原液、パスツレラ・ムルトシダ原液及びマンヘミア・ヘモリチカ原液を混合し濃度調整したものに、相当と認められたアジュバントを添加し、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、3.4 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

3.1.1.1 ヒストフィルス・ソムニ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ヒストフィルス・ソムニ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

3.1.1.2.1 試験材料

検体及びブレインハートインフュージョン寒天培地を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体 0.1mL をブレインハートインフュージョン寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

3.1.1.2.3 判定

パスツレラ・ムルトシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.3 マンヘミア・ヘモリチカ

3.1.1.3.1 試験材料

検体及びブレインハートインフュージョン寒天培地を用いる。

3.1.1.3.2 試験方法

検体 0.1mL をブレインハートインフュージョン寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

3.1.1.3.3 判定

マンヘミア・ヘモリチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.2 生菌数試験

3.1.2.1 ヒストフィルス・ソムニ

3.1.2.1.1 試験材料

3.1.2.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.2.1.1.2 培地

寒天培地（付記1）を用いる。

3.1.2.1.2 試験方法

試料 1.0mL と培地をシャーレに混釈して固める。各試料ごとに2枚ずつ作製し、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で48時間培養後、発育した集落数を数える。

3.1.2.1.3 判定

試料の希釈倍数及び発育した集落数から生菌数を算出するとき、検体の生菌数は、1 mL 中 5.0×10^8 個以上でなければならない。

3.1.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

3.1.2.2.1 試験材料

3.1.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.2.2.1.2 培地

ブレインハートインフュージョン寒天培地を用いる。

3.1.2.2.2 試験方法

試料 1.0mL と培地をシャーレに混釈して固める。各試料ごとに2枚ずつ作製し、37℃で24時間培養後、発育した集落数を数える。

3.1.2.2.3 判定

試料の希釈倍数及び発育した集落数から生菌数を算出するとき、検体の生菌数は、1 mL 中 5.0×10^8 個以上でなければならない。

3.1.3 マンヘミア・ヘモリチカ抗原価測定試験

3.1.3.1 試験材料

3.1.3.1.1 試料

検体を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを試料とする。

3.1.3.2 試験方法

試料及びマンヘミア・ヘモリチカ酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原（付記 2）を炭酸緩衝液（付記 3）で 10 倍階段希釈し ELISA 用プレートの穴に加え、2～5℃ で一夜固相化する。感作プレートをポリソルベート PBS（付記 4）で洗浄後、2 w/v %牛血清アルブミン溶液（付記 5）を各穴に 200 μ L ずつ加え 37℃ で 1 時間感作させる。プレートを洗浄後、マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 抗原価測定用血清（付記 6）を加え 37℃ で 1 時間感作させる。プレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウシ IgG 液（付記 7）を各穴に 100 μ L ずつ加え 37℃ で 1 時間感作させる。プレートを洗浄後、基質液（付記 8）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30℃ で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.1.3.3 判定

試料の ELISA 値が 0.4 以上を示す抗原の最高希釈倍数を ELISA 抗原価とする。

試料の ELISA 抗原価は、40 倍以上でなければならない。この場合、参照抗原の ELISA 抗原価は、160 倍でなければならない。

3.1.4 マンヘミア・ヘモリチカロイコトキシン価測定試験

3.1.4.1 試験材料

3.1.4.1.1 試料

検体を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを試料とする。

3.1.4.1.2 白血球浮遊液

白血球浮遊液（付記 9）を用いる。

3.1.4.2 試験方法

試料を RPMI-1640 培地で 2 倍階段希釈する。各希釈試料 100 μ L に白血球浮遊液 100 μ L を加え、37℃ で 1 時間感作する。各感作液に 0.4 %トリパンブルー液を 200 μ L 加え、全細胞数と死細胞数を計測する。

3.1.4.3 判定

死細胞数の割合が全体の 50 %以上を示す抗原の最高希釈倍数をロイコトキシン価とする。

試料のロイコトキシン価は、8 倍以上でなければならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 ヒストフィルス・ソムニ

3.2.1.1.1 試験材料

検体及び液体培地（付記 10）を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

液体培地を 20mL ずつ分注した試験管 10 本に検体を 0.5mL ずつ接種し、37℃ で 48 時間培養後、観察する。

3.2.1.1.3 判定

いずれの試験管も菌の発育による混濁を認めてはならない。

3.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

3.2.1.2.1 試験材料

検体及びブレインハートインフュージョン液体培地を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

ブレインハートインフュージョン液体培地を 20mL ずつ分注した試験管 10 本に検体を 0.5mL ずつ接種し、37℃で 48 時間培養後、観察する。

3.2.1.2.3 判定

いずれの試験管も菌の発育による混濁を認めてはならない。

3.2.1.3 マンヘミア・ヘモリチカ

3.2.1.3.1 試験材料

検体及びブレインハートインフュージョン液体培地を用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

ブレインハートインフュージョン培地を 20mL ずつ分注した試験管 10 本に検体を 0.5mL ずつ接種し、37℃で 48 時間培養後、観察する。

3.2.1.3.3 判定

いずれの試験管も菌の発育による混濁を認めてはならない。

3.2.2 マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキシン無毒化試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを試料とする。

3.2.2.1.2 白血球浮遊液

白血球浮遊液を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料を RPMI-1640 培地で 10 倍希釈する。希釈試料 100 μ L に白血球浮遊液 100 μ L を加え、37℃で 1 時間感作する。0.4 % トリパンブルー液を 200 μ L 加え、全細胞数と死細胞数を計測する。

3.2.2.3 判定

死細胞数の割合は、全体の 20 % 以下でなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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。異物及び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。

3.4.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、6.6 ~ 7.2 でなければならない。

3.4.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.2vol % 以下でなければならない。

3.4.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 1.30mg 以下でなければならない。

3.4.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は 0.2mL とし、注射後の体重測定は 4 日目に行うものとする。

3.4.7 力価試験

3.4.7.1 ヒストフィルス・ソムニ力価試験

3.4.7.1.1 試験材料

3.4.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.7.1.1.3 ELISA 用抗原

ヒストフィルス・ソムニ ELISA 用抗原（付記 11。以下この項において「OMC 抗原」という。）を用いる。

3.4.7.1.2 試験方法

試験動物 8 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料を 0.5mL ずつ 2 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射する。第 2 回注射 2 週後に試験動物から得られた各個体の血清について ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、ヒストフィルス・ソムニ参照陽性血清（付記 12）並びにヒストフィルス・ソムニ参照陰性血清（付記 13）をポリソルベート PBS で 100 倍に希釈し、更に希釈用プレート上で 2 倍階段希釈したものをヒストフィルス・ソムニ抗原吸着プレート（付記 14）の各穴に 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。ポリソルベート PBS でよく洗浄後、各穴にペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液（付記 15）を 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。その後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.4.7.1.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 300 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 100 倍未満でなければならない。

3.4.7.2 パスツレラ・ムルトシダ力価試験

3.4.7.2.1 試験材料

3.4.7.2.1.1 試験動物

3.4.7.1 の試験で用いた動物を用いる。

3.4.7.2.1.2 ELISA 用抗原

パスツレラ・ムルトシダ ELISA 用抗原（付記 16）を用いる。

3.4.7.2.2 試験方法

3.4.7.1.2 で得られた各個体の血清について、ELISA を行う。試験群及び対照群の各血清、パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清（付記 17）並びにパスツレラ・ムルトシダ参照陰性血清（付記 18）をポリソルベート PBS で 100 倍希釈し、更に希釈用プレートで 2 倍階段希釈したものをパスツレラ・ムルトシダ抗原吸着プレート（付記 19）の各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。ポリソルベート PBS でよく洗浄後、各穴にペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.4.7.2.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 300 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 100 倍未満でなければならない。

3.4.7.3 マンヘミア・ヘモリチカ力価試験

3.4.7.3.1 試験材料

3.4.7.3.1.1 試験動物

3.4.7.1 の試験で用いた動物を用いる。

3.4.7.3.1.2 ELISA 用抗原

マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 用抗原を用いる。

3.4.7.3.2 試験方法

3.4.7.1.2 で得られた各個体の血清について、ELISA を行う。試験群及び対照群の各血清、マンヘミア・ヘモリチカ参照陽性血清（付記 20）並びにマンヘミア・ヘモリチカ参照陰性血清（付記 21）をポリソルベート PBS で 100 倍希釈し、更に希釈用プレートで 2 倍階段希釈したものをマンヘミア・ヘモリチカ抗原吸着プレート（付記 22）の各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。ポリソルベート PBS でよく洗浄後、各穴にペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.4.7.3.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 300 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 100 倍未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 寒天培地

1,000mL 中

鶏肉ブイヨン	100 mL
カザミノ酸	5 g
ダイズ製ペプトン	5 g
イーストエキストラクト	5 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
水	残 量

121 $^{\circ}$ C で 15 分間高圧滅菌する。冷却後、馬血清を 5 vol % となるように添加する。

付記 2 マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 用抗原

マンヘミア・ヘモリチカ HL2/B 株を培養し、培養上清を採取して濃縮し、メンブランフィルターでろ過したもの。凍結して -20 $^{\circ}$ C 以下又は凍結乾燥して 5 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 抗原価測定用血清を用いてイムノブロッティングをするとき、約 105kDa を含む複数の反応バンドを認める。上記血清を用いて抗原価を測定するとき、ELISA 抗原価は、160 倍を示す。

付記 3 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量

pH を 9.6 に調整する。4 °C で保存し、1 週間以内に使用する。

付記 4 ポリソルベート PBS

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	8 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

付記 5 2 w/v % 牛血清アルブミン溶液

100mL 中

牛血清アルブミン	2 g
ポリソルベート PBS	残 量

付記 6 マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 抗原価測定用血清

マンヘミア・ヘモリチカ I-29 株をマンヘミア・ヘモリチカ抗体陰性牛に気管内投与により感染させて得られた血清であって、マンヘミア・ヘモリチカ血清型 1 型菌に対する凝集抗体価を測定するとき、160 ~ 320 倍を示すもの。凍結して - 20 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 以下で保存する。

付記 7 ペルオキシダーゼ標識抗ウシ IgG 液

西洋ワサビペルオキシダーゼを標識した抗ウシ IgG をポリソルベート PBS で至適濃度に調整したもの。

付記 8 基質液

o-フェニレンジアミン 40mg を、リン酸クエン酸緩衝液（付記 23）100mL に溶解して遮光する。使用直前に過酸化水素を 40 μ L 添加する。

付記 9 白血球浮遊液

健康な牛から採取した血液から調製したもの。細胞数が 1×10^7 個/mL になるように RPMI-1640 培地で調整する。

付記 10 液体培地

1,000mL 中

鶏肉ブイヨン	100 mL
カザミノ酸	5 g
ダイズ製ペプトン	5 g
イーストエキストラクト	5 g
塩化ナトリウム	5 g
水	残 量

121 °C で 15 分間高圧滅菌する。冷却後、ろ過滅菌した馬血清を 5 vol % となるように添加する。

付記 11 OMC 抗原

ヒストフィルス・ソムニ M-1 Br 株を培養し、集菌し、洗浄した後、生理食塩液に再浮遊し、これを 4℃で攪拌した後、遠心して採取した上清をメンブランフィルターでろ過したもの。

付記 12 ヒストフィルス・ソムニ参照陽性血清

OMC 抗原を用いて ELISA を行い、主波長 492 nm 及び副波長 630nm で測定するとき、抗体価が 400 ～ 800 倍を示すもの。凍結して - 20℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

付記 13 ヒストフィルス・ソムニ参照陰性血清

無処置のモルモット血清であって、56℃で 30 分間非働化し、OMC 抗原を用いて ELISA を行い、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定した吸光度が、100 倍希釈で 0.5 以下を示すもの。凍結して - 20℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

付記 14 ヒストフィルス・ソムニ抗原吸着プレート

OMC 抗原を炭酸緩衝液で至適濃度に調整したものを各穴に 100 μ L ずつ加え、30℃で 2 時間固相化し、ポリソルベート PBS で洗浄し、その後、ブロッキング液（付記 24）を各穴に 300 μ L ずつ加え、4℃で 18 ～ 24 時間感作し、ポリソルベート PBS で洗浄したもの。

付記 15 ペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液

西洋ワサビペルオキシダーゼを標識した抗モルモット IgG であって、ポリソルベート PBS で至適濃度に調整したもの。

付記 16 パスツレラ・ムルトシダ ELISA 用抗原

パスツレラ・ムルトシダ BP165/B 株を培養した後集菌し、PBS に再浮遊したものを、室温で 18 ～ 24 時間攪拌した後、遠心して上清を採取し、メンブランフィルターでろ過したもの。凍結して - 20℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

抗パスツレラ・ムルトシダ牛血清（付記 25）を用いてイムノブロッティングをするとき、莢膜を含む複数の反応バンドが検出され、同血清を用いて ELISA 抗原価を測定するとき（付記 26）、ELISA 抗原価が 1,280 倍を示さなければならない。

付記 17 パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清

パスツレラ・ムルトシダ ELISA 用抗原を用いて ELISA を行い、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定するとき、抗体価が 400 ～ 800 倍を示すもの。凍結して - 20℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

付記 18 パスツレラ・ムルトシダ参照陰性血清

無処置のモルモット血清であって、56℃で 30 分間非働化し、パスツレラ・ムルトシダ ELISA 用抗原を用いて ELISA を行い、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定した吸光度が 100 倍希釈で 0.5 以下を示すもの。凍結して - 20℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

付記 19 パスツレラ・ムルトシダ抗原吸着プレート

パスツレラ・ムルトシダ ELISA 用抗原を炭酸緩衝液で至適濃度に調整したものを各穴に 100 μ L ずつ加え、4℃で 18 ～ 24 時間固相化後、ポリソルベート PBS で洗浄し、更に 2 w/v

%牛血清アルブミン溶液を各穴に 300 μ L ずつ加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作し、再度、ポリソルベート PBS で洗浄したもの。

付記 20 マンヘミア・ヘモリチカ参照陽性血清

マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 用抗原を用いて ELISA を行い、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定したとき、抗体価が 400 ~ 800 倍を示すもの。凍結して - 20 $^{\circ}$ C 以下又は凍結乾燥して 5 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 21 マンヘミア・ヘモリチカ参照陰性血清

無処置のモルモット血清であって、56 $^{\circ}$ C で 30 分間非働化し、マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 用抗原を用いて ELISA を行い、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定した吸光度が 100 倍希釈で 0.5 以下を示すもの。凍結して - 20 $^{\circ}$ C 以下又は凍結乾燥して 5 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 22 マンヘミア・ヘモリチカ抗原吸着プレート

マンヘミア・ヘモリチカ ELISA 用抗原を炭酸緩衝液で至適濃度に調整したものを各穴に 100 μ L ずつ加え、4 $^{\circ}$ C で 18 ~ 24 時間固相化し、ポリソルベート PBS で洗浄する。その後、2 w/v %牛血清アルブミン溶液を各穴に 300 μ L ずつ加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作し、再度、ポリソルベート PBS で洗浄したもの。

付記 23 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸

4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物

19.95 g

水

残量

pH を 5.0 に調整する。

付記 24 ブロッキング液

オボアルブミン タイプ VII 50mg をポリソルベート PBS100mL に使用直前に溶解したもの。

付記 25 抗パスツレラ・ムルトシダ牛血清

パスツレラ・ムルトシダ BP165/B 株を、抗パスツレラ・ムルトシダ抗体陰性牛に気管内投与により感染させて得られた血清であって、パスツレラ・ムルトシダ BP165/B 株に対する凝集抗体価を測定するとき、32 ~ 64 倍を示すもの。凍結して - 20 $^{\circ}$ C 以下又は凍結乾燥して 5 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 26 パスツレラ・ムルトシダ ELISA 用抗原 ELISA 抗原価測定法

試料を炭酸緩衝液で 10 倍階段希釈し ELISA 用プレートの穴に加え、4 $^{\circ}$ C で一夜固相化する。感作プレートをポリソルベート PBS で洗浄後、2 w/v %牛血清アルブミン溶液を各穴に 200 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作させる。プレートを洗浄した後、所定の濃度に希釈した抗パスツレラ・ムルトシダ牛血清を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作させる。プレートを洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗ウシ IgG 液を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作させる。プレートを洗浄した後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、これらの差を ELISA 値とする。ELISA 値 0.5 以上を示す

最高希釈倍率を ELISA 抗原価とする。