

ヨー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）

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プレートに固相化し、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

抗原固相化プレートの保存液を除去後、洗浄液（付記1）で洗浄する。このプレートの各4穴に、吸収処理及び希釈した指示陽性血清及び指示陰性血清100 μ Lずつ分注し、25 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。ブランクは添付のELISA緩衝液を用いる。なお、吸収処理は、それぞれの血清20 μ Lに吸収剤180 μ Lを加え、それを最終200倍の吸収血清とする。さらにELISA緩衝液150 μ Lに200倍希釈の吸収指示陽性血清を50 μ L加え、最終800倍希釈の吸収指示陽性血清を作製する。

次にELISA緩衝液で200倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体をブランクを除く全穴に100 μ Lずつ加え、密封して25 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。なお、ブランクにはELISA緩衝液を加える。

次に使用直前に調整した基質溶液（添付の基質を基質緩衝液で100倍に希釈したもの）100 μ Lを全穴に加え、遮光して25 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた後、反応停止液（付記2）を100 μ Lずつ全穴に加え、450nmで吸光度値を測定する。

1.1.3 判定

200倍に希釈した指示陽性血清の平均吸光度値が1.0～1.6で、指示陰性血清の平均吸光度値が0.35以下であるとき、800倍希釈指示陽性血清の平均吸光度値をT、200倍希釈指示陰性血清の平均吸光度値をN、200倍希釈指示陽性血清の平均吸光度値をPとし、 $(T - N) / (P - N)$ によりE値を求める。E値は小数点第3位を四捨五入した数値で表す。

このとき、800倍希釈指示陽性血清のE値は、0.30～0.65でなければならない。

1.2 特異性試験

1.2.1 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3）参照陰性血清（付記4）及び特異性検定用血清（付記5）を試験材料とする。

1.2.2 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。ただし、血清は200倍に希釈する。

1.2.3 判定

1.1.3の判定に準じてE値を算出する。ただし、Tは特異性検定用血清の平均吸光度値、Nは参照陰性血清の平均吸光度値、Pは参照陽性血清の平均吸光度値とする。特異性検定用血清のE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6）を試験材料とする。

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を測定する。ただし、参照陽性血清及び参照陰性血清は200倍に希釈し、力価検定用血清は200倍から更に2倍階段希釈する。

1.3.3 判定

1.1.3の判定に準じE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。

E値が0.35を下回る直前の血清の希釈倍数を力価とするとき、力価検定用血清の力価は1,600～6,400倍でなければならない。

付記1 洗浄液

1,000mL 中		
塩化ナトリウム	8.5	g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	3.12	g
ポリソルベート 80	0.2	mL
水		残量
4 mol/L 水酸化ナトリウムで pH を 7.2 に調整する。		

付記2 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記3 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に接種し、ヨウネ病補体結合反応で抗体価が 20 倍以上を示した時点の血清で、その 200 倍希釈液は、酵素抗体法において、1.0～1.6 の吸光度値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記4 参照陰性血清

健康牛の血清で、その200倍希釈液は、酵素抗体法において、0.35以下の吸光度値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記5 特異性検定血清

マイコバクテリウム・フレイ 354-NIAH 株の培養菌を不活化後、子牛に接種し、ヨウネ病補体結合反応で抗体価が 80 倍以上を示した時点の血清で、その 200 倍希釈液は、酵素抗体法において 0.35 以下の E 値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記6 力価検定用血清

マイコバクテリウム・アビウム P-18-NIAH 株の培養菌を不活化後、子牛に接種し、ヨウネ病補体結合反応で抗体価が 160 倍以上を示した時点の血清で、酵素抗体法において E 値が 0.35 を下回る直前の希釈倍数が 1,600 ～ 6,400 倍を示すように調整し、凍結乾燥したもの