

# 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・フレイ菌体吸収剤）

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、不活化マイコバクテリウム・フレイ菌体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を100 $\mu$ 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25 $\mu$ Lに、0.1w/v%アジ化ナトリウム加里ン酸緩衝食塩液30mLで復水させた吸収剤と等量のカオリン液（付記2）との混合液0.975mLを加え、常温で30分間攪拌後、遠心した上清を吸収血清とする。また、血清の希釈は、濃縮ELISA緩衝液を水で3倍に希釈したELISA緩衝液を用い、指示陽性血清については200倍及び800倍、指示陰性血清については200倍となるようにする。

次にELISA緩衝液で200倍に希釈した標識抗体を100 $\mu$ Lずつブランクを除く全穴に加え、25 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。

次に使用直前に調整した添付の基質溶液を100 $\mu$ Lずつ全穴に加え、遮光して25 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた後、反応停止液（付記3）を100 $\mu$ Lずつ加え、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0.4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4）、参照陰性血清（付記5）及び特異性検定用血清（付記6）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0.4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7）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、参照陽性血清、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

1.2.3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 0.4 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き、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	8.5g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	3.12g
ポリソルベート 80	0.12mL
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 カオリン液

1,000mL 中	
カオリン	100g
ダルベッコ PBS (－) 粉末	9.6g
アジ化ナトリウム	1g
水	残 量

付記 3 反応停止液

硫酸	110mL
水	1,000mL

付記 4 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、ヨー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 5 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、0.4 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 6 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、ヨー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 0.4 以下の E 値を示すように調整し、凍結乾燥したもの

付記 7 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、ヨー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 0.4 以上を示す最高希釈倍数の逆数が 1,600～6,400 倍を示すように調整し、凍結乾燥したもの