

牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット

プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体でプレート进行处理し、酵素抗体法により牛海綿状脳症の異常プリオン蛋白を検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 特異性試験

1.1.1 試験材料

試験品及び非感染牛延髄（付記1）を用いる。

1.1.2 試験方法

1.1.2.1 陰性検体の作成

それぞれのキットについて1.1.2.1.1又は1.1.2.1.2により陰性検体を作成する。

1.1.2.1.1 ホモジネート500 μ L使用キットの陰性検体

非感染牛延髄350 \pm 40mgをグライディングチューブに入れホモジナイズする。ホモジネート500 μ LとプロティナーゼK溶液500 μ Lを混和し、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させる。クラリファイングソリューション500 μ Lを加え、混和し、20,000Gで5分間、又は15,000Gで7分間遠心する。上清を除去し、溶解液を50 μ L加え、100 $^{\circ}$ Cで5分間反応させた後混和する。希釈液250 μ Lを加え、陰性検体とする。

1.1.2.1.2 ホモジネート250 μ L使用キットの陰性検体

非感染牛延髄350 \pm 40mgをグライディングチューブに入れホモジナイズする。ホモジネート250 μ LとプロティナーゼK溶液250 μ Lを混和し、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させる。クラリファイングソリューション250 μ Lを加え、混和し、20,000Gで5分間、又は15,000Gで7分間遠心する。上清を除去し、溶解液を25 μ L加え、100 $^{\circ}$ Cで5分間反応させた後混和する。希釈液125 μ Lを加え、陰性検体とする。

1.1.2.2 酵素抗体反応

抗体固相マイクロプレートの4穴に陰性コントロールを、3穴に陽性コントロール液（付記2）を、5穴に陰性検体をそれぞれ100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで75分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、酵素標識抗体液を100 μ Lずつ加え、2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質発色液を100 μ Lずつ加える。プレートを遮光して18 \sim 22 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、反応停止液を100 μ Lずつ加え、30分以内に各穴の吸光度を主波長450nm、副波長620nmで測定する。

1.1.2.3 判定

検体の吸光度値がカットオフ値（付記3）未満の場合を陰性、カットオフ値以上の場合を陽性と判定する。

陰性検体は、いずれも陰性でなければならない。

1.2 吸光度試験及び力価試験

それぞれのキットについて1.2.1又は1.2.2の試験を行う。

1.2.1 ホモジネート500 μ L使用キットの試験

1.2.1.1 試験材料

試験品を用いる。

1.2.1.2 試験方法

抗体固相マイクロプレートの4穴に陰性コントロールを、3穴に陽性コントロール液をそれぞれ100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ C、75分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、酵素標識抗体液を100 μ Lずつ加え、2 \sim 8 $^{\circ}$ C、60分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質発色液を100 μ Lずつ加える。プレートを遮光して18 \sim 22 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、反応停止液を100 μ Lずつ加

え、30分以内に各穴の吸光度を主波長450nm、副波長620nmで測定する。

1.2.1.3 判定

陰性コントロールの吸光度値はすべて0.150未満でなければならない、陽性コントロール液の吸光度値はすべて1.000以上でなければならない。

1.2.2 ホモジネート250 μ L使用キットの試験

1.2.2.1 試験材料

試験品を用いる。

1.2.2.2 試験方法

抗体固相マイクロプレートの4穴に陰性コントロールを、3穴に陽性コントロール液を、及び3穴に参照陽性抗原（付記4）をそれぞれ100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ C、75分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、酵素標識抗体液を100 μ Lずつ加え、2～8 $^{\circ}$ C、60分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質発色液を100 μ Lずつ加える。プレートを遮光して18～22 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、反応停止液を100 μ Lずつ加え、30分以内に各穴の吸光度を主波長450nm、副波長620nmで測定する。

1.2.2.3 判定

陰性コントロールの吸光度値はすべて0.150未満でなければならない、陽性コントロール液の吸光度値はすべて1.600以上でなければならない。参照陽性抗原の吸光度値はすべて0.600以上、3.000未満でなければならない。

付記1 非感染牛延髄

牛海綿状脳症に感染していない牛の延髄

付記2 陽性コントロール液

陽性コントロールを、ホモジネート500 μ L使用キットは2mLの、また、ホモジネート250 μ L使用キットは4mLの希釈液で溶解したもの

付記3 カットオフ値

カットオフ値は、次の計算式により算出する。

カットオフ値＝陰性コントロールの吸光度値の平均値＋0.21

付記4 参照陽性抗原

陽性コントロールと同様の組成を持つ試薬を、含まれる合成ペプチドの濃度が0.125 μ g/mLになるように希釈液で溶解したもの