

動物用医薬品

体外診断用医薬品

ヨーネスクリーニング・プルキエ

牛ヨーネ病スクリーニング用エライザキット

使用説明書

養微生物化学研究所

本キットは、マイコバクテリウム・フレイ菌抽出抗原を含む吸収剤で前処理した被検血清を、マイクロプレートのウェルに固相化したマイコバクテリウム・アビウム 18 株から抽出した抗原と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG1 モノクローナル抗体を用いた酵素抗体法により、ヨーネ菌特異抗体を検出するエライザキットです。
使用方法と補足説明および【使用上の注意】をよく読んで使用して下さい。

内容

1 セット中の試薬 ※プレートは1枚入りと5枚入りがありますが、試薬の内容及び本数は変わりません。

構成名	内容量	備考
抗原固相化マイクロプレート	1枚 もしくは 5枚	・抗原を固相化し、ブロッキング後に乾燥させて密封したものである。マイクロプレートを一度に使い切らない場合には、開封後すぐに乾燥した状態のまま密封した容器に入れて2～8℃に保存すること。
試料希釈吸収液 (液体：緑色)	100 mL、1本	・よく振ってから使用すること。
ペルオキシダーゼ 標識抗体液	0.75 mL、1本	・希釈済み標識抗体は1回使い切りとし、保存しないこと。
標識抗体希釈液 (液体：青色)	120 mL、1本	
濃縮洗浄液	100 mL、1本	・沈殿物が認められる場合には37℃のウォーターバスで加温し、攪拌して溶解する。およそ15分程で溶解するので、必要以上に加温しないこと。 ・希釈済み洗浄液は1回使い切りとし、保存しないこと。
発色液	60 mL、1本	
反応停止液	60 mL、1本	
指示陽性血清	0.5 mL、1本	
指示陰性血清	0.5 mL、1本	

別途用意する器具・機材

- 1) エライザ用分光光度計 (マイクロプレートリーダー)
- 2) マイクロプレート用振盪機 (マイクロプレートミキサー)
- 3) マルチチャンネルピペット (~ 300 μ L)、チップ、リザーバー (3 個以上)
- 4) マイクロピペット (~ 10 μ L もしくは ~ 20 μ L)、(~ 200 μ L)
- 5) マイクロチューブもしくは U 底 96 ウェルマイクロプレート [サンプル希釈用]
- 6) アルミホイル [プレート遮光用]
- 7) 濃縮洗浄液およびペルオキシダーゼ標識抗体希釈用の容器
- 8) 精製水 [濃縮洗浄液希釈用]

成分及び分量

- | | | | |
|---|---|--|-------------------------------------|
| 1 | 抗原固相化マイクロプレート 1プレート中
マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウム 18株抽出抗原
参照陽性血清のOD値として0.7～2.0 | | |
| 2 | 試料希釈吸収液 1ボトル (100 mL) 中
マイコバクテリウム・フレイ パスツール研究所株抽出抗原
特異性検定用血清のS/P値として50未満 | 塩化ナトリウム 0.84 g
塩化カリウム 0.024 g
リン酸水素二ナトリウム 0.11 g
リン酸二水素カリウム 0.024 g | カゼイン 2.5 g
緑色色素 7.5 mg
精製水 残量 |
| 3 | ペルオキシダーゼ標識抗体液 1バイアル (0.75 mL) 中
ペルオキシダーゼ標識マウス抗牛IgG1抗体 0.75 mL
チメロサル 0.15 mg | | |
| 4 | 標識抗体希釈液 1ボトル (120 mL) 中
塩化ナトリウム 0.84 g
塩化カリウム 0.024 g
リン酸水素二ナトリウム 0.11 g
リン酸二水素カリウム 0.024 g | ポリソルベート 20
青色色素
精製水 | 0.006 mL
0.3 mg
残量 |
| 5 | 濃縮洗浄液 1ボトル (100 mL) 中
塩化ナトリウム 16.0 g
塩化カリウム 0.40 g
リン酸水素二ナトリウム 1.83 g | リン酸二水素カリウム
ポリソルベート 20
精製水 | 0.40 g
0.10 mL
残量 |
| 6 | 発色液 1ボトル (60 mL) 中
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン 0.03 g 以下
過酸化水素水 0.012 mL 以下
精製水 残量 | | |
| 7 | 反応停止液 1ボトル (60 mL) 中
マレイン酸 2.18～2.40 g
精製水 残量 | | |
| 8 | 指示陽性血清 1バイアル (0.5 mL) 中
マイコバクテリウム・パラツベルクローシス感染牛血清
アジ化ナトリウム | | 0.5 mL
0.1 mg |
| 9 | 指示陰性血清 1バイアル (0.5 mL) 中
マイコバクテリウム・パラツベルクローシス非感染牛血清
アジ化ナトリウム | | 0.5 mL
0.1 mg |

使用方法

1：洗浄液の調製

濃縮洗浄液を精製水で20倍に希釈して洗浄液を作製する。

2：被検血清及び指示血清の希釈とマイコバクテリウム・フレイ菌による交差抗体の吸収

被検血清、指示陽性血清及び指示陰性血清を試料希釈吸収液で20倍に希釈する。十分に混和した後、 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で15分間吸収する。

3：血清の感作

吸収済み血清 $100 \mu\text{L}$ を抗原固相化マイクロプレートのウェルに加える。指示陽性血清では2ウェル、指示陰性血清及び被検血清ではそれぞれ1ウェルを用いる。静かに振盪後、プレートに蓋をして $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で45分間反応させる。

4：洗浄

ウェルから血清試料を除去し、ウェルを洗浄液で満たし、除去する。この操作を3回行う。最後の洗浄液はペーパータオル等を用いて可能な限り除去する。

5：標識抗体の感作

ペルオキシダーゼ標識抗体液を標識抗体希釈液で100倍に希釈し、その $100 \mu\text{L}$ を各ウェルに分注し、プレートに蓋をして $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で30分間反応させる。

6：洗浄

4の洗浄操作を行う。最後の洗浄液はペーパータオル等を用いて可能な限り除去する。

7：発色反応

各ウェルに発色液を $100 \mu\text{L}$ 加える。マイクロプレートを遮光して、 $21 \pm 5^\circ\text{C}$ で10分間発色させる。各ウェルに $100 \mu\text{L}$ の反応停止液を加える。色度が均一になるまでマイクロプレートを静かに振盪し、必要な場合にはプレートの裏底を注意深く拭う。

8：測定

エライザ用分光光度計により、波長 450nm における OD 値を測定する。

9：判定

指示陽性血清の平均 OD 値が $0.7 \sim 2.0$ であり、かつ指示陽性血清と指示陰性血清の OD 値の比が 7.0 以上の場合に試験が成立し、下式により S/P 値を算出する。

$$\text{S/P 値} = 100 \times (\text{被検血清の OD 値} - \text{指示陰性血清の OD 値}) / (\text{指示陽性血清の平均 OD 値} - \text{指示陰性血清の OD 値})$$

S/P 値が 60 未満を陰性、 60 以上を陽性とする。

補足説明

	<ul style="list-style-type: none"> ・ ペルオキシダーゼ標識抗体液を除く試薬及びマイクロプレートは使用する1時間前までに21℃ (±5℃) に置いてください。
1	<ul style="list-style-type: none"> ・ 濃縮洗浄液に沈殿物が認められる場合には、37℃で加温し、転倒混和して溶解した後に希釈して下さい。 ・ 洗浄液の必要量は1ウェルあたり1.8mLとなりますので、1プレート96ウェルで試験する場合には、96ウェル×1.8 mL=172.8 mL、余裕を見込むとおよそ200mLの洗浄液が必要です。
2	<ul style="list-style-type: none"> ・ 血清希釈はマイクロチューブまたはU底96ウェルマイクロプレートで行うことを推奨します。特に、検体数が多い場合にはU底96ウェルマイクロプレートとマルチチャンネルピペットを使用すると、操作時間が短縮できます。 ・ 被検血清と指示血清は同じ方法で希釈して下さい。 ・ 血清の希釈吸収は、被検血清10 μLと試料希釈吸収液190 μLを混合して20倍希釈とします。指示陽性血清は2ウェルに分注するので、同じものを2つ作ります。 ・ 試料希釈吸収液は、そのまま使用します。
3	<ul style="list-style-type: none"> ・ マイクロプレートの振盪は血清がウェルからこぼれないように注意深く静かに行います。 ・ カバーでウェルを密封する必要はありません。カバーにはプラスチック製のカバーやアルミホイルを使用して下さい。 ・ 吸光度測定時のゼロ点はプレートを置いていない状態を基準としますので、ブランクウェルを設ける必要はありません。
4	<ul style="list-style-type: none"> ・ 洗浄操作は、手動、マイクロプレートウォッシャーのどちらでも行えます。 ・ 手動で行う場合、マイクロプレートを逆さにしてウェル内の血清試料を除去し、ペーパータオル等に軽く押し付けてウェルの淵の液を除去します。次に洗浄液をマルチチャンネルピペットでおよそ300 μLずつ分注し、同様にして除去します。 ・ マイクロプレートウォッシャーで行う場合、吸引ノズルが抗原固相化マイクロプレートの平底のウェルの端にくるように設定し、分注液量はおおよそ300 μLとします。
5	<ul style="list-style-type: none"> ・ カバーでウェルを密封する必要はありません。カバーにはプラスチック製のカバーやアルミホイルを使用して下さい。
6	<ul style="list-style-type: none"> ・ 4を参照。
7	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発色液はそのまま使用します。使用直前にリザーバーに入れ、マルチチャンネルピペットを用いてすばやく分注します。 ・ 発色反応中のマイクロプレートは、アルミホイル等を使用して遮光して下さい。 ・ <u>反応時間の10分を厳守して下さい。</u>10分より長く反応させた場合、指示陽性血清のOD値が規定の範囲に入らない可能性があるので注意して下さい。反応停止液の分注は、発色液をウェルに分注した順序と同じ順序で分注します。 ・ マイクロプレートの振盪は、ウェル内の液がこぼれないように注意深く静かに行います。
8	<ul style="list-style-type: none"> ・ 吸光度測定時のゼロ点は、プレートを置いていない状態を基準とします。
9	<ul style="list-style-type: none"> ・ S/P値は小数点第2位を四捨五入して小数点第1位まで算出します。

使用目的

牛血清中のヨーネ菌に対する抗体の予備的検出

使用上の注意

【一般的注意】

- (1) 本キットは定められた使用方法に基づいて使用すること。
- (2) 本キットは定められた使用目的以外に使用しないこと。
- (3) 6か月齢以上の牛の血清を使用すること。
- (4) ヨーネ病感染の有無の判定は、家畜伝染病予防法施行規則の別表1の判定基準により行うこと。

【使用者に対する注意】

- (1) ピペットを用いる場合、口を使って操作しないこと。
- (2) 発色液、反応停止液は皮膚に刺激性があるので、作業時には、ゴーグル、マスク、手袋などの適切な保護具を着用すること。誤って試薬が目、鼻、口に入った場合、又は皮膚に触れた場合は、速やかに流水で十分に洗い流し、異常が見られた時は医師の診察を受けること。

【使用時の注意】

- (1) 使用1時間前にペルオキシダーゼ標識抗体液を除く各構成成分を $21 \pm 5^{\circ}\text{C}$ に置くこと。濃縮洗浄液に沈殿物が認められる場合には、 37°C に加温し、ゆっくりと転倒混和すると速く溶解する。
- (2) 試料希釈吸取液は使用直前によく振り混ぜること。
- (3) 希釈した濃縮洗浄液、ペルオキシダーゼ標識抗体液、指示陽性血清、指示陰性血清は直ちに使用し、保存して再使用しないこと。
- (4) ツベルクリン検査牛の一部の血清でS/P値の上昇が認められることがあるので、ツベルクリン検査後90日以内に採取した血清の検査には使用しないこと。
- (5) ツベルクリン検査陽性牛の一部の血清で陽性反応が認められることがあるので、ツベルクリン検査陽性牛の血清の検査には使用しないこと。
- (6) オートウォッシャーを用いて1キットを複数回に分けて使用する場合には、機器の rins 条件や残留量によって洗浄液が不足する可能性があるため、事前に使用する機器に必要な余剰液量を確認し、不足することが予想される場合は、マルチチャンネルピペットを用いた手動による洗浄操作を実施すること。

【取扱い上の注意】

- (1) 外観又は内容に異常を認めたものは使用しないこと。
- (2) 使用期限が過ぎたものは使用しないこと。
- (3) 本キットは、同一製造番号の試薬を用いた場合に、正確な結果が得られるように調整されているので、使用に先立って必ず各構成品の製造番号を確認すること。また、他の製造番号の診断薬と組み合わせて使用しないこと。
- (4) 使用済みのマイクロプレート、使い残りの試薬及び使用済みの瓶などは、適切に処分すること。ペルオキシダーゼ標識抗体液はチメロサルを含んでいるため、廃液、使い残りは含水銀廃液として貯蔵し、専門の業者に引き渡すこと。
- (5) 指示陽性血清及び指示陰性血清にはアジ化ナトリウムが含まれるため、廃棄する場合には、環境、水系を汚染しないように注意し、地方公共団体条例等に従い処分すること。

【保管上の注意】

- (1) 小児の手の届かないところに保管すること。
- (2) 直射日光、加温又は凍結は、本キットの品質に影響を与えるので、避けること。

【判定時の参考事項】

- (1) ヨーネ菌に感染し排菌している牛由来の検体でも、抗体価が低い場合には、本キットで陰性と判定されることがあります。

貯蔵方法

2～8℃

有効期間

製造後1年9か月間

(使用期限は外箱及び各構成品のラベルに記載)

製造販売元

株式会社 微生物化学研究所
京都府宇治市槇島町24、16番地