



仮性狂犬病/オーエスキー病

PRV-gE 抗体検出用 ELISA キット使用説明書

対象製品：SNV-10-7161-02 SNV-10-7161-10 SVANOVIR® PRV-gE 抗体検出用 ELISA

原理

PRV-gE抗体検出 ELISA Kitは血清もしくは血漿中のPRV-gE特異的抗体を検出するためのELISAキットです。マイクロタイタープレートのウェル上には糖たんぱく gE を呈した不活化 PRV 株由来の抗原がコートしてあります。gE に対する抗体の有無の検出は HRP 標識した gE 特異的なモノクローナル抗体を使用しています。テストサンプル中に PRV-gE に対する抗体が含まれていない場合（非感染もしくは非ワクチン接種ブタおよびワクチン接種ブタ由来）、gE 抗原はフリーの状態に残り、続けて HRP 標識抗体が結合します。基質溶液を加えることで色の変化が起こります。一方、gE に対する抗体が血清中に存在している場合（感染ブタ由来）、これらの抗体が gE 抗原に結合します。結果として HRP 標識抗体の結合を阻害することになり、標識抗体は洗浄操作により取り除かれます。基質を加えても色の変化がない場合、陽性ということになります。色の変化はマイクロプレートフォトメーターで 450nm の OD を測定します。

このように、本テストは感染動物（陽性）と gE 欠損ワクチン接種動物（陰性）とを区別することが可能です。

製品構成

- 非感染性PRV抗原をコートしたマイクロタイタープレート（10 plates kit）もしくはストリップ（2 plates kit）
- 凍結乾燥した HRP 標識マウス抗PRV-gEモノクローナル抗体
- PBS-Tween Solution 20 x concentrate (125mL)
- Substrate Solution (20mL) – (tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H2O2) – 基質溶液（暗所保存）
- Stop Solution (10mL) – Contains sulphuric acid – 腐食性につき取り扱い注意
- Sample Dilution Buffer (8mL) サンプル希釈用バッファ
- Positive Control Serum A (2.5ml) – 0.05% merthiolate.
- Negative Control Serum B (2.5ml) – 0.05% merthiolate.

必要な器具試薬

1. 精密ピペット（5 to 200 μ l）
2. ピペットチップ
3. 精製水
4. 洗浄瓶、マルチチャネルピペッターもしくはプレートウォッシャー
5. PBS-Tween用の容器（1-2L）
6. マイクロプレートフォトメーター、450 nm フィルター

検体情報

血清：1サンプルあたり100 μ Lの希釈していない血清もしくは血漿が必要です。新鮮、冷蔵、凍結した血清（血漿）サンプルが使用可能です。

試薬の調整

PBS-Tween Buffer: PBS-Tween Solution 20 x concentrate を20倍に蒸留水で希釈します。1プレートあたり500mLのPBST溶液が必要になりますので25mLのPBST20 x 溶液を475mLの蒸留水で希釈しよく攪拌します。ボトルの底に結晶化した沈殿物がないことを確認してください。もし沈殿物が見られるようでしたら温めてよく攪拌してください。

HRP Conjugate抗PRV-gB抗体溶液: HRP Conjugate に11.5mLのPBS-Tween Bufferを加えます。1分間静地してその後よく混ぜてください。残った溶液は-20°Cで保存可能です。凍結融解は3回まで可能です

操作手順(インキュベーション時間は60分とオーバーナイトの二通りの方法があります)

1. 全ての試薬を室温に戻します。

60分間インキュベーション

- 100 μ LのPositive Control Serum (A)とNegative Control Serum (B)をPRV抗原コートされた対応するウェルに加えます (ウェルは確認目的のため2つずつ使用することを推奨します)
- 100 μ Lのサンプル血清を対応するウェルに加えます (1サンプルにつき2ウェル使用することを推奨します)
- プレートにシールをし、37°Cで1時間インキュベートします
ステップ8に進みます

オーバーナイトインキュベーション

- 25 μ Lのサンプル希釈バッファーを全てのウェルに加えます
- ステップ2とステップ3の操作を行います
- プレートにシールをし、室温で一晩 (12-18時間) インキュベートします
- プレートを3回PBSTでウォッシュします。それぞれのウォッシュ操作ではウェルをバッファーで満たし、プレートを空にします。たたいて全ての残っている溶液を除去します。
- 100 μ LのHRP conjugateをそれぞれのウェルに加えよく混ぜ、37°Cで30分間もしくは室温で60分間インキュベートします
- ステップ8と同じウォッシュ操作を繰り返します。
- 100 μ LのSubstrate Solutionをそれぞれのウェルに加えて室温で15分間インキュベートします。時間は最初のウェルに試薬を加えた時点から測ります。
- 50 μ LのStop Solutionをそれぞれのウェルに加えてよく混ぜ、反応を停止させます。Stop Solutionを加える順番はステップ11でSubstrate Solutionを加えた順番と同じにしてください。
- コントロールとサンプルのOD値 (450nm) をマイクロプレートフォトメーターで測定します。(反応を停止してから15分以内にODの測定を行ってください)

結果の解釈

- 平均OD値をコントロールとサンプルについてそれぞれ計算します。
- それぞれのサンプルと陽性コントロールについてOD_pを以下の式に従い計算します

OD_p = サンプルもしくはPCの平均OD値/NCの平均OD値 x 100

試験コントロールの基準

コントロールが以下の基準を満たしていることを確認してください

ネガティブコントロールの値がお互いに25%以上違っていないこと

ネガティブコントロールのOD値：0.9-1.4

ポジティブコントロールのODp：<30

結果の判定基準

	短時間インキュベーション ODp	長時間インキュベーション ODp
ネガティブ（感染もしくはオーエスキーに対するワクチン接種がされていない、オーエスキ病gE欠損ワクチン接種がされている）	>60	>55
疑わしい（要再テスト）	50-60	46-55
ポジティブ（感染している）	<50	<45

テスト結果がネガティブとなった血清サンプルがワクチン接種されているかどうかの評価には SVANOVIR PRV-gB 抗体検出 ELISA キットをご利用ください。

注意事項

- 説明書をよく読んで試験を行ってください
- キットは冷蔵（2-8℃）で保存してください
- 全ての試薬は使用前に室温に戻してください
- 他のテストキットと試薬を混ぜてしないようにしてください
- 試薬のコンタミネーションを起こさないように気をつけてください
- 有効期限の切れたキットを使用しないでください
- サンプル毎にピペットチップは変えてください
- テストごとにコントロールを含めてください
- 試薬の調整には蒸留水をお使いください

SNV-10-7161-02（2plate kit）の試薬は少なくとも10回に分けて試験するのに十分な量があります。また、ストリップのシールが剥がれても冷蔵で4週間まで保存が可能です。

株式会社ベリタス
〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL 03-3593-3211 FAX 03-3593-3216
E-mail techservice@veritastk.co.jp