

ブルセラ症診断 試験管凝集反応マニュアル

農研機構 動物衛生研究部門

必要な試薬類

- ・ブルセラ症診断用菌液 [農業・食品産業技術総合研究機構]
- ・可検血清（検体）：1回の試験に最低 200 μ L 必要（非働化はしなくてよい）

必要な道具・設備

- ・ガラス試験管（できるだけ傷がなくきれいなもの。規格をそろえること）
※ ポリスチレン製チューブでも可

最低限必要な本数

試験用：可検血清の数 × 5 本

標準混濁管用：5 本

- ・15 mL または 50 mL チューブ
- ・ピペット、マイクロピペット、チップ
- ・インキュベーター（37 °C設定）

事前の準備

- ・希釈用液（0.5 w/v %フェノール加生理食塩水）の作製
 - ① 生理食塩水を作製する。 NaCl 0.85 g + DW 100 mL = 生理食塩水 100 mL
 - ② 生理食塩水（100 mL）から 0.47 mL を捨てる。
 - ③ フェノールを 0.47 mL 加える。
※フェノールは比重 1.07 なので 0.5 w/v % = 0.47 v/v %
 - ④ 4 °Cで保存（試験にはできるだけ新しいものを使用すること）

試験管凝集反応（1日目）

- ブルセラ症診断用菌液は沈殿しやすいので使用前によく振り、濃度を均一にしてから希釈用液で10倍に希釈する。

$$\text{必要量} = \text{標準混濁管用 } 1.25 \text{ mL} + (\text{可検血清の数} \times 2.5 \text{ mL})$$

- 下表のように可検血清を希釈する。
- 血清の希釈系列の各試験管に、10倍希釈した診断用菌液を0.5 mLずつ加え、よく振って混合する。

	血清希釈倍数				
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
希釈用液 (mL)	0.8	0.5	0.5	0.5	0.5
可検血清 (mL)	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5
10倍希釈診断用菌液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
最終血清希釈倍数	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160

- 標準混濁管を次表に従い作製し、よく振って混合する。

※ 試験時に同時に作製しないと翌日判定ができないので注意すること。

凝集スコア	4	3	2	1	0
凝集度	100%	75%	50%	25%	0%
10倍希釈診断用菌液(mL)	0	0.125	0.25	0.375	0.5
希釈用液 (mL)	1.0	0.875	0.75	0.625	0.5

- 可検血清の試験管と標準混濁管をすべて 37 °Cのインキュベーター内に静置し、20~24時間感作させた後、判定を行う。

※ 「ブルセラ症診断用菌液」の添付説明書では感作時間が18~24時間と記載されているが、家畜伝染病予防法施行規則別表第一のブルセラ症の項では20~24時間となっていることに注意。（別表第一は令和3年農林水産省令第48号によって削除されたが、牛以外の家畜の検査については従前通りこれに従うこととされている。）

※ 反応中は試験管に振動を与えないよう、インキュベーターの戸の開閉はなるべく控えるか静かに行う。

試験管凝集反応（2日目）

6. 標準混濁管と各試験管の上清の濁度を比較して判定する。
- ※ 判定の際には沈殿を浮き上がらせないように気を付ける。
 - ※ 凝集がないと目玉状に沈殿する。

判定の基準			
凝集スコア	凝集度	記号	所見
4	100 %	++++	凝集沈殿し、上清はまったく透明
3	75 %	+++	強い凝集沈殿があるが、上清はかすかに混濁
2	50 %	++	かなりの凝集沈殿があり、上清もかなり混濁
1	25 %	+	わずかな凝集塊の沈殿を認める
0	0 %	-	凝集を認めない

最終血清希釈倍数 40 倍以上において 50 %凝集（++，凝集スコア 2）以上を示すものは陽性とし、20 倍で 25 %凝集（+，凝集スコア 1）以下のものは陰性とする。
陽性でも陰性でもないものを疑陽性（疑反応）とする。

- ※ 50 %（++，凝集スコア 2）以上の凝集を示す最高血清希釈倍数が抗体価となる。
- ※ 血清によっては凝集阻止帯（抗体の過多により明瞭な凝集反応を生じない血清の希釈域）を示すものがあるので、判定に際しては注意すること。