

# ブルセラ症診断用菌液

令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

## 1 定義

ブルセラ・メリテンシスの死菌液で調製した試験管凝集反応用抗原である。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

ブルセラ・メリテンシス 99 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

炭酸ガス非要求性のS型菌で、ブルセラのA単相血清で特異的に凝集し、かつ、M及びR単相血清で凝集しない。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、10vol%牛血清加寒天培地又は適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培地

10vol%牛血清加寒天培地又は製造に適当と認められた培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 培養菌液

種菌を10vol%牛血清加寒天培地に移植し、37℃で48～72時間培養後、生理食塩液に浮遊させたものを、製造用培地に接種し、37℃で培養して得た菌液を培養菌液とする。

培養菌液について、3.1の試験を行う。

#### 2.3.2 殺菌、集菌及び濃度調整

培養菌液を混合し、80℃で30分間加熱殺菌し、遠心集菌する。沈殿菌を生理食塩液で2回遠心洗浄し、0.5w/v%フェノール加生理食塩液（以下「希釈用液」という。）に浮遊させ、McFarland 混濁管 No. 1 の200倍濃厚な菌液とし、2～5℃で7日間以上静置して、死菌浮遊液とする。

死菌浮遊液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.3 抗原価の調整

希釈用液で9、10、11、12、13、14、15及び16倍に希釈した死菌浮遊液と、100、150、200、250及び300倍に希釈した標準血清（付記1）とを、それぞれ0.5mLずつ混合してボックスを組む。標準血清の終末希釈400倍で標準混濁管（付記2）の50%凝集と等しい凝集を示す菌液濃度の10倍濃厚な菌液を調整し、原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。

### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 培養菌液の試験

#### 3.1.1 夾雑菌否定試験

検体0.05mLずつを10vol%牛血清加寒天平板2枚に塗抹し、37℃で48時間培養するとき、ブルセラ・メリテンシス以外の菌の発育を認めてはならない。

### 3.1.2 変異試験

検体を希釈用液で McFarland 混濁管 No. 1 の 10 倍濃厚な菌液に希釈したものを試料とし、その 0.5mL に 0.2w/v% アクリフラビン液を等量加え、37 °C で 18 ~ 24 時間処理するとき、凝集してはならない。

## 3.2 死菌浮遊液の試験

### 3.2.1 生菌否定試験

検体 1 mL ずつをソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地 100mL 4 本に接種し、37 °C で 48 時間培養後、10vol% 牛血清加寒天平板に塗抹し、37 °C で 48 時間培養するとき、菌の発育を認めてはならない。

## 3.3 原液の試験

### 3.3.1 変異試験

試験品を希釈用液で McFarland 混濁管 No. 1 の 10 倍の濃度に希釈して試料とし、次の試験を行う。

#### 3.3.1.1 酸凝集試験

Clark and Lubs 緩衝液 (pH2.4、4.6 及び 6.8) 各 0.5mL に等量の試料を加え、37 °C で 18 ~ 24 時間反応させるとき、凝集してはならない。

#### 3.3.1.2 熱凝集試験

試料を 100 °C で 30 分間加熱するとき、凝集してはならない。

#### 3.3.1.3 アクリフラビン凝集試験

0.2w/v% アクリフラビン液 0.5mL に等量の試料を加え、37 °C で 18 ~ 24 時間処理するとき、凝集してはならない。

### 3.3.2 力価試験

#### 3.3.2.1 試験材料

検体及び標準血清を用いる。

#### 3.3.2.2 試験方法

標準血清を希釈用液で 100、150、200、250 及び 300 倍に希釈する。各段階の希釈液 0.5mL ずつに、検体を希釈用液で 10 倍に希釈したものを 0.5mL ずつ加えて混和し、37 °C で 18 ~ 24 時間反応後、標準混濁管と対比して、凝集度を判定する。

#### 3.3.2.3 判定

標準血清の終末希釈 400 倍で 50 %凝集を示さなければならない。

## 3.4 小分製品の試験

### 3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

### 3.4.2 特異性試験

試験品を希釈用液で 10 倍に希釈し、試料とする。陰性血清 3 例をそれぞれ希釈用液で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。各段階の希釈液 0.5mL のそれぞれに等量の試料を加え、37 °C で 18 ~ 24 時間反応後に判定するとき、陰性血清の凝集価は、いずれも 20 倍未満でなければならない。

### 3.4.3 力価試験

3.3.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

### 付記 1 標準血清

国際標準血清と同様の方法で免疫して得た抗ブルセラ牛血清の力価を試験管凝集反応によっ

て調整した後、凍結乾燥したもので、1 アンプル中に表示の国際単位を含むもの  
 なお、使用時に 1,000 国際単位 / mL に調整して用いる。

付記2 標準混濁管

判定の基準			比濁管の作り方		
凝集	記号		A : B	混合希釈液	B
100 %	++++	凝集沈殿し、上清は、まったく透明	0 : 4	0.5mL	0.5 mL
75 %	+++	強い凝集沈殿があるが上清は、かすかに混濁	1 : 3	0.5mL	0.5mL
50 %	++	かなりの凝集混濁があり、上清もかなり混濁	2 : 2	0.5mL	0.5mL
25 %	+	わずかな凝集塊の沈殿を認める。	3 : 1	0.5mL	0.5mL
0 %	—	凝集を認めない。	4 : 0	0.5mL	0.5mL

A : 10 倍希釈診断用菌液

B : 0.5vol%フェノール加生理食塩液