

# 犬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・カニ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・カニス QE13B 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

ブルセラ・カニスに一致する生物学的性状を示し、犬に病原性を示す。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、2vol% 兎血清加カゼイン消化寒天培地（付記1）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2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

2vol% 兎血清加カゼイン消化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

種菌を製造用培地に移植し、37℃で48時間培養したものを、培地に移植し、37℃で48時間培養後、リン酸緩衝食塩液に浮遊させた菌液をろ過し、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 不活化

培養菌液を60℃で1時間加熱不活化後、遠心して集菌する。沈殿菌を0.01w/v%チメロサル加リン酸緩衝食塩液（付記2 以下「希釈用液」という。）又は適当と認められた希釈用液で2回洗浄後、McFarland 混濁管 No.8の濃度となるように希釈用液で調整し、1か月以上4℃に保存したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.3 抗原価の調整

不活化菌液を希釈用液で、1.51、2.00及び2.67倍に希釈し、それぞれMcFarland 混濁管のNo.3、4及び5に相当する3段階の濃度の希釈抗原菌液とする。一方、参照陽性血清（付記3）を、160、190、230、270、320、380、450、540、640、760及び900倍に希釈する。それぞれの希釈抗原菌液1.5mLと希釈血清1.5mLずつを2本ずつ比色管に分注してボックスを組む。対照菌液として、それぞれの希釈抗原菌液0.75mLと希釈用液2.25mLずつを混合したものを2本ずつ用意し、50℃で18～20時間反応させ、常温で2時間静置後、分光光度計を用い、620nmで吸光度を測定する。

それぞれの希釈抗原菌液の用量反応線を求め、対照菌液の吸光度から3濃度の希釈抗原菌液の50%凝集価を算定する。各希釈抗原菌液の濃度と対応する50%凝集価の関係から、540倍希釈した参照陽性血清が標準混濁管（付記4）の50%凝集に等しい凝集を示す抗原濃度を求め、不活化菌液の濃度を調整し、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 2 vol% 兔血清加カゼイン消化寒天培地 2 枚以上に塗抹し、37 °C で 48 時間培養するとき、ブルセラ・カニス以外の菌の発育を認めてはならない。

#### 3.2 不活化菌液の試験

##### 3.2.1 生菌否定試験

4 本のカゼイン消化液状培地（付記 5）100mL ずつに検体 1 mL ずつを加え、37 °C で 48 時間培養後、2 vol% 兔血清加カゼイン消化寒天培地に移植し、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。

##### 3.2.2 変異試験

検体を希釈用液で 8 倍に希釈し、その 1 mL を 100 °C で 30 分間加熱したとき、凝集してはならない。

#### 3.3 原液の試験

##### 3.3.1 菌濃度試験

検体の濁度を分光光度計又は比濁計で測定するとき、McFarland 混濁管 No.3 ～ 5 に相当する混濁度でなければならない。

##### 3.3.2 力価試験

###### 3.3.2.1 試験材料

検体及び参照陽性血清を用いる。

###### 3.3.2.2 試験方法

参照陽性血清を希釈用液で 160、190、230、380 及び 450 倍に希釈し、各血清希釈液 1.5mL ずつを 2 本の比色管に分注する。検体 1.5mL ずつを各血清希釈液に加える。対照として、希釈用液 2.25mL に検体 0.75mL を加えたものを作る。すべての比色管内容をよく混和し、50 °C で 18 ～ 20 時間反応させる。さらに、常温に 2 時間静置した後、分光光度計を用い、620nm の波長で吸光度を測定する。

###### 3.3.2.3 判定

対照の吸光度を中心とした 4 種の血清希釈液の吸光度から用量反応線を求め、50 % 凝集価を計算するとき、参照陽性血清は、終末希釈 480 ～ 600 倍でなければならない。

#### 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ない。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

###### 3.4.2.1 試験材料

試験品、参照陽性血清及び 2 例以上の陰性犬血清を用いる。

###### 3.4.2.2 試験方法

参照陽性血清を希釈用液で 40 及び 80 倍に、陰性犬血清をそれぞれ 5 及び 10 倍に希釈する。各希釈血清 0.5mL に等量の試験品を加えて混合し、50 °C で 18 ～ 20 時間反応後、常温に 2 時間静置し、判定する。

###### 3.4.2.3 判定

参照陽性血清は、終末希釈 80 倍及び 160 倍で明瞭な凝集を示さなければならない。陰性犬血清は、終末希釈 20 倍で凝集してはならない。

### 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。

## 5 その他

### 5.1 添付文書等記載事項

- 1 スライド凝集反応に用いてはならない旨
- 2 被検血清は、非働化しない旨
- 3 使用前によく振とうし、均質液とし使用する旨

### 付記 1 2vol% 兎血清加カゼイン消化寒天培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	20	g
ブドウ糖	1	g
塩化ナトリウム	5	g
寒天	15	g
塩酸チアミン	0.005	g
水	残	量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。約 50 °C に冷却後、兎血清を 2 vol% となるように加える。

### 付記 2 0.01w/v % チメロサル加里ン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	46.7	g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	6.55	g
塩化ナトリウム	9.0	g
チメロサル	0.1	g
水	残	量

pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

### 付記 3 参照陽性血清

ブルセラ・カニスの自然感染犬血清又は高度免疫犬血清と陰性犬血清とを混合し、50 % 凝集価を 540 倍に調整した血清を、1 mL ずつ分注し、凍結乾燥したもの

### 付記 4 標準混濁管

判定の基準			比濁管の作り方		
凝集度	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	0.5mL
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	3 : 1	0.5mL	0.5mL

		を認める。			
0 %	—	凝集を認めない。	4 : 0	0.5mL	0.5mL

A : 診断用菌液

B : 0.01w/v %チメロサル加リン酸緩衝食塩液

付記5 カゼイン消化液状培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン 20 g

ブドウ糖 1 g

塩化ナトリウム 5 g

塩酸チアミン 0.005 g

水 残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整し、121 °Cで 15 分間高圧滅菌する。