

ブルセラ症検査マニュアル

目 次

- I. ブルセラ症の概説
 - 1. 法律上の取扱い
 - 2. 病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

- II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項
 - 1. 作業上の一般的注意
 - 2. 検査上の一般的注意

- III. 検体の採取・輸送・保管および滅菌
 - 1. 検査材料の採取・輸送
 - 2. 検査材料および病原体の保存
 - 3. 消毒・滅菌法

- IV. 病原体の検出
 - 1. 細菌学的検査
 - 2. 遺伝子の検出

- V. 抗体の測定
 - 1. 試験管内凝集反応（血清反応）

- VI. 参考文献

- VII. 検査依頼先

- VIII. 執筆者一覧

I. ブルセラ症の概説

ブルセラ症・病 (Brucellosis) は、ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) により引き起こされる人獣共通感染症である。わが国ではヒト、家畜のブルセラ症とも最近ではほとんど発生していない。しかし食料や社会・経済面での動物への依存度が強く、家畜でブルセラ病が発生している国や地域ではいまだに多くの患者が発生しており、世界では新規患者は年間 50 万人に上るといわれる。そのため、公衆衛生面のみならず経済的にも重要な感染症の一つである。また、米国 CDC によるバイオテロに用いられ得る病原体カテゴリーB であり、家畜への影響の大きさからアグリテロに用いられ得る病原体としても注意が必要である。

(ヒトは感染症法によりブルセラ症、家畜については家畜伝染病予防法でブルセラ病が用いられている。以下、本稿では原則としてブルセラ症を用いることとする。)

1. 法律上の取扱い

国内では、ヒトブルセラ症については感染症法で、家畜ブルセラ病については家畜伝染病予防法で、それぞれ対策が取られている。

また、病原体については 2007 年 6 月 1 日より、感染症法でその所持・保管、輸送等に関して厳しく制限されている。

1) 感染症法 (感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律)

* 感染症法及び施行令 (法第六条第五項、政令第一条) によりブルセラ症は四類感染症に指定されている。ゆえに、診断した医師は届出基準に基づいて、直ちに最寄りの保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない (法第十二条)。

* 感染症法及び施行令 (法第六条第二十一項、政令第二条) により、*Brucella melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis* が特定三種病原体に指定されている。よって、これらの所持には厚生労働大臣への届出が必要であり、また、取扱施設が三種病原体等取扱施設基準を満たしている必要がある (法第五十六条の十六及び二十四、省令第三十一条の十七及び二十九)。

* 病院や病原体等の検査を行っている機関が、業務に伴い三種病原体を所持することになり、滅菌譲渡をするまで所持することになった場合は、届出は不要である (法第五十六条の十六)。ただし、定められた基準 (省令第三十一条の十八：十日以内に滅菌する、もしくは遅滞なく譲渡しをする、など) に従う必要がある。

2) 家畜伝染病予防法

*家畜伝染病予防法及び施行令(法第二条第一項、政令第一条)によりブルセラ病(対象動物:牛、めん羊、山羊、豚、水牛、しか、いのしし)は家畜伝染病に指定されている。

2. 病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

1) 病原体

ヒトへの感染が報告されているものとしては、その病原性の順に *B. melitensis* (自然宿主:ヤギ、ヒツジ)、*B. suis* (ブタ)、*B. abortus* (ウシ)、*B. canis* (イヌ) の4菌種がある。ほかに *B. ovis* (ヒツジ)、*B. neotomae* (齧歯類)、海産ほ乳類の *B. pinnipedialis* (アザラシ)、*B. ceti* (クジラ) などがある。*B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis* は smooth-type (LPS が o-side chain を持つ)、*B. canis* は rough-type (LPS が o-side chain を持たない、もしくは不完全) である。公衆衛生的には *B. melitensis* 感染が、家畜衛生的には *B. abortus* によるウシの感染が最も重要である。

注:分類学上は *B. melitensis* ただ1菌種であり、*B. melitensis* biovar *melitensis* などとなる。

しかしながら、病原性の違いなど1菌種表記には問題も指摘されていることから、従来の菌種名が主に使用されている。

表) *Brucella* 属菌の種類 (Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7 他)

種	生物型・血清型	自然宿主	ヒトへの病原性
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	ウシ、水牛	あり
<i>B. melitensis</i>	1-3	山羊、めん羊、ラクダ	あり
<i>B. suis</i>	1, 3	ブタ、いのしし	あり
	2	ブタ、野ウサギ	あり?
	4 (<i>B. rangifer</i>)	トナカイ、カリブー	あり
	5	げっ歯目	なし
<i>B. canis</i>	—	犬(イヌ科)	あり
<i>B. ovis</i>	—	羊	なし
<i>B. neotomae</i>	—	げっ歯目	なし
<i>B. pinnipedialis</i>	?	鯨脚類(アザラシ、アシカ)	あり?
<i>B. ceti</i>	?	クジラ目(クジラ、イルカ)	あり?
<i>B. microti</i>	?	ハタネズミ、アカギツネ	なし
<i>B. inopinata</i>	?	?	あり?

2) 疫学

本症のおもな分布域は地中海地域、西アジア、中東、およびアフリカとラテンアメリカの一部等で、これらの地域では患者数は増加傾向にあるとされる。流行地で報告される発生数には大きな幅があるが、動物に対するブルセラ症対策が行われていない地域での報告が多い。動物間でブルセラが流行している地域で人の感染率が低く報告されている場合にはサーベイランスや報告システムの不備である可能性を疑われる。なお、多くの国では本症は届出感染症になっているが、診断が不正確なため患者は他の疾患名、あるいは「原因不明熱」として扱われることも多い。そのため、実際の感染者数は公式に発表される患者数の10~25倍存在するものと推定されている。

3) 感染源

ブルセラ属菌は非常に感染しやすく10~100個の菌で感染しうる。汚染した乳や乳製品、食肉を加熱殺菌処理が不十分なまま摂取すること、および感染動物（ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ラクダ、水牛、野生反芻獣、イヌ、また最近ではアザラシ）との直接接触や、死体や流産時の汚物と接触することによって伝播する。動物のブルセラ対策が進んだ国では、海外からの帰国者、危険食品の摂食者、および一部のハイリスク集団（酪農家、獣医師、と畜場従業員、実験室感染）に散発的に認められる。

また、ブルセラ属菌は環境・食品中で長期間、生残し、感染源となることが知られている。さらに、検査室・実験室感染事故の起こりやすい菌である。近年、安全キャビネットの使用により、感染事故は減少したが、特に菌の分離培養（増菌培養）時に感染リスクは高くなる。安全キャビネットを使用しない、培養液をこぼす、培養プレートの臭いをかぐ、などにより、エアロゾルを介して感染することが知られている。

4) 症状

B. melitensis がもっとも重く、ついで *B. suis*、*B. abortus* となる。通常、潜伏期は1~3週間であるが、時に数ヶ月になることもある。症状そのものに特異的なものはなく、軽症では単に風邪様の症状を示す。総じて、他の熱性疾患と類似しているが、筋肉・骨格系に及ぼす影響が強く、全身的な疼痛、倦怠感を示す。発熱は主に午後から夕方に認められ、時に40度以上となることもあるが、発汗とともに朝には解熱する。このような発熱パターン（間欠熱）が数週間続いた後、症状の好転が1~2週間認められるが、再び発熱を繰り返すこともある（波状熱）。病気の期間は、数週間から数ヶ月に及ぶこともある。臨床症状により、急性型、限局型、慢性型に分けられる。

急性型：発熱、悪寒、倦怠感、関節痛などが認められる。脾腫、リンパ節腫脹、肝腫大を認

めることもある。発熱は午後から夕方にかけて認められることが多い。

限局型：心内膜炎、肺炎、骨髄炎、睪炎、および精巣炎を認める場合が多い。心内膜炎はブルセラ症による死亡原因の大半を占める。

慢性型：発症後1年以上にわたって脱力感や疲労感が続く。

5) 治療

2剤併用が基本である。1986年のWHO 専門家委員会##による、成人に対する推奨療法はドキシサイクリン (DOXY) +リファンピシン (RFP) であった。しかし、[Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7.] #および抗菌薬治療の効果を比較した論文では、RFPは血中からのDOXYのクリアランスを早めることや、脊椎炎などの合併症に対してDOXY+ストレプトマイシン (SM)の方が効果的であったことから、DOXY+SMを推奨している。また、ゲンタマイシン (GM)の方が、SMよりも治療の中止に至る副作用が少ないとも言われる。可能ならば、DOXY+SM+RFPの3剤併用が最も効果的という報告がある。小児にはコトリモキサゾール (ST 合剤) +SM / GMの併用、妊婦にはST 合剤またはRFPの長期投与が推奨されている。

表) ブルセラ症の治療

成人：2剤併用が基本(テトラサイクリン系+アミノグリコシド系 / リファンピシン)			
推奨#	ドキシサイクリン 100 mg x 2回 / 日、42日間	+	ゲンタマイシン 5 mg/kg / 日、7-10日間、静注/筋注 または ストレプトマイシン 1 g x 1回 / 日、14-21日間、筋注
WHO## (1986)	ドキシサイクリン 100 mg x 2回 / 日、42日間	+	リファンピシン 15 mg/kg (600-900 mg) / 日、42日間
8才未満の子ども、妊婦：ベースはST合剤			
子ども (推奨#)	トリメトプリム (8 mg/kg) + スルファメトキサゾール (40 mg/kg) x 2回 / 日、6週間	+	ストレプトマイシン (30 mg/kg) または ゲンタマイシン (5 mg/kg) または リファンピシン
妊婦 (推奨#)	トリメトプリム (8 mg/kg) + スルファメトキサゾール (40 mg/kg) x 2回 / 日、6週間 または リファンピシン 15 mg/kg (600-900 mg) / 日、少なくとも45日間以上		
WHO## (1986)	リファンピシン 15 mg/kg (600-900 mg) / 日、42日間		

: Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7 およびBMJ. 336: 701-4, 2008 による。

: WHO専門家委員会(1986年)による推奨療法。

6) 予防

ヒトのブルセラ症の予防は家畜の予防接種、および検査陽性動物の殺処分 (Test and

Slaughter) などによる感染動物の根絶対策を中心とした獣医学的な対策が有効である。また、乳と乳製品の適切な加熱処理も効果が高い。これらの方法によってヒトのブルセラ症の発生が激減した国や地域が多い。

かつて旧ソ連、中国、およびフランスにおいて弱毒生菌ワクチンやペプチドグリカンワクチンが用いられたが、現在では用いられていない。弱毒変異株を用いたワクチンの開発が行われているとされるが実用化には至っていない。

II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項

1. 作業上の一般的注意

ブルセラ属菌はすべて、国立感染症研究所バイオセーフティーレベル3 (BSL3) に分類されている。ブルセラ症の疑われる臨床材料の取り扱いは、まず、BSL2 内の安全キャビネットで行う。ブルセラ属菌が確認もしくは非常に強く疑われた場合、以降の検討はすべて BSL3 実験室内で行う。過去 (安全キャビネットが普及するまで) にはブルセラ属菌は実験室内感染がきわめて多い病原体であった。安全キャビネットを用いて適切に処理すれば、実験室感染のリスクは少なくなる。感染経路は主として皮膚、吸入、眼、口である。

* 疑い検体は BSL2 内の安全キャビネット内で取り扱う。

* ブルセラ属菌が確認もしくは非常に強く疑われた場合、以降の作業はすべて BSL3 実験室で実施する。

* ガウン、マスク、手袋を着用する。

* 使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。

* オートクレーブ可能な器具等および汚物は、オートクレーブ (121℃、20 分) 処理をする。

2. 検査上の一般的注意

症状に特異的なものがないため、検査室での検査結果が重要となる。一般的な臨床検査所見としては、白血球数は正常またはやや減少し、軽度の貧血が認められ、赤沈は正常またはやや亢進する。ただ、これだけではブルセラ症を疑うことはできないので、基本は細菌学的検査や抗体検査、遺伝子検出などである。いわゆる生化学的性状検査キットはあくまでも補足的な利用にとどめ、結果コードによる判定はしない。しばしばコードの誤判定があり、特にブルセラ属菌でないと誤判定されたときに、その後の取扱による検査室・実験室感染リスクが増す。

鑑別診断を必要とする疾患として野兎病、伝染性単核症、インフルエンザ、リステリア症、トキソプラズマ症、ウイルス性肝炎、慢性リウマチなどがある。

Ⅲ. 検体の採取・輸送・保管および滅菌

1. 検査材料の採取・輸送

血液培養による診断が有効なので、発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液（血清分離の必要はない）、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料などを無菌的に採取する。血液は DNA 分離も考えて、滅菌真空採血管（EDTA-2K）に採取する。

血液、培養用材料ともに凍結を避けて氷冷して輸送する。

ブルセラ属菌のうち *B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis* は特定三種病原体に指定されているため、これら 4 種であると同定された病原体は運搬について感染症法の規定に従う必要がある。

2. 検査材料および病原体の保存

疑い検体は、BSL2 実験室内で保存する。

ブルセラ属菌は、BSL3 実験室内で保存する。

3. 消毒・滅菌法

使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。汚物やオートクレーブ可能な器具等は、オートクレーブ（121℃、20 分）処理をする。

IV. 病原体の検出

図) ブルセラ症の検査・診断

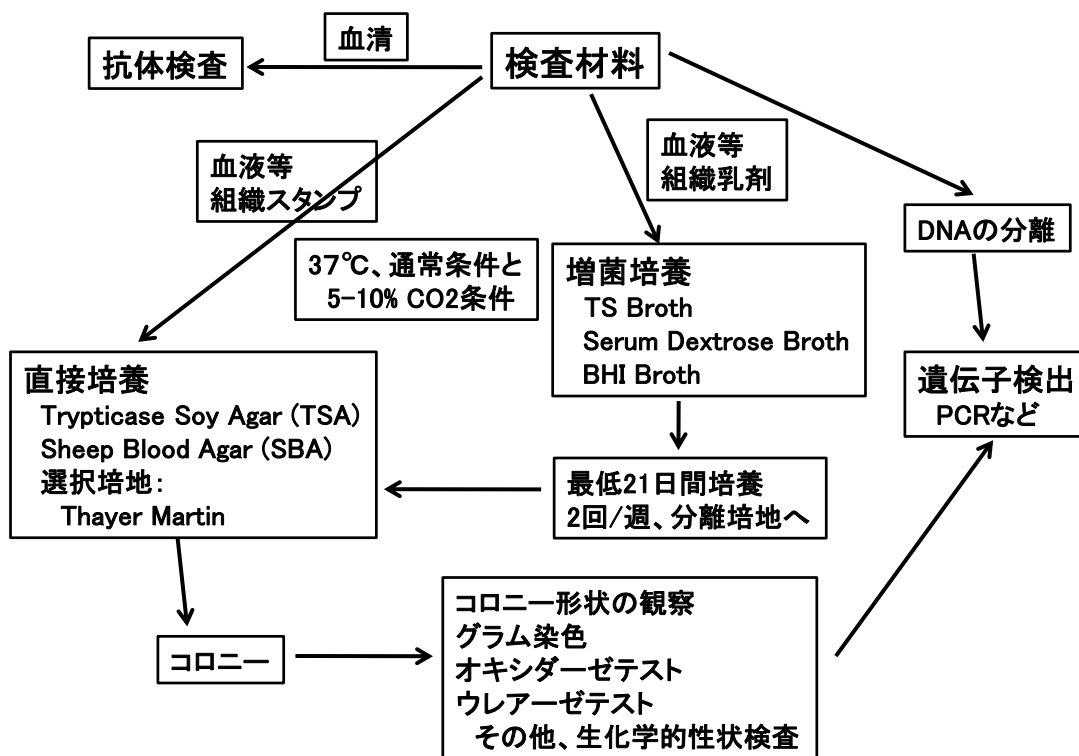
臨床症状
感染機会の有無
など

+

細菌学的検査：分離・同定
血清学的検査：抗体の測定
遺伝子の検出：PCR など

ブルセラ症の感染症法における届出基準	
検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	血液、骨髄
試験管凝集反応による抗体の検出 (抗原がアポルタスの場合は40倍以上、 カニスの場合は160倍以上の抗体価)	血清
補体結合反応による抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は 抗体価の有意の上昇)	血清

図) ブルセラ症の検査フロー



1. 細菌学的検査

1) 検査材料

検査材料としては発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液（同時に血清を分離し抗体測定に用いる）、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料などの無菌的に採取した組織、体液を対象とする。本菌の増殖は遅いので、菌分離には無菌的に採取された材料が望ましい。血液には滅菌真空採血管（培養だけならヘパリン加でよいが、DNA 分離を考える場合は EDTA-2K）を用いる。また、ブルセラ属菌は血液や骨髄から分離されることが多いが、脾臓、肝臓および膿瘍の生検材料から分離されることもある。

汚染のおそれがある材料の場合には抗生物質を加えた選択培地（Thayer Martin 培地など）を用いる。汚染が著しいことが分かっている材料の場合には、滅菌リン酸緩衝食塩水などで乳剤を作成し、1~2 ml をモルモットの筋肉または腹腔内接種用とする。数日以内に死亡した場合はブルセラ属菌によるものではない。2~5 週後、血液或いは脾臓を検体として培養検査を行う。動物の飼育は実験室内感染に注意して行う。

2) 培養

直接平板寒天培養もしくは増菌培養を行うが、特に血液などでは菌数が少ないことが多く、増菌培養は必要である。

直接平板寒天培養は、血液などの検査材料を、Trypticase Soy Agar (TS Agar)、5% Sheep Blood Agar (SBA)、Serum Dextrose Agar (5% v/v equine/bovine serum、1% w/v dextrose) などに塗抹して培養する。組織・臓器の場合は、平板全体に断面をスタンプする。ブルセラ菌は淋菌の選択培地である Thayer Martin 培地や Martin Lewis 培地を選択培地としても成長するので、創傷部位や肺などからの菌の分離に利用できる。ただし、Thayer Martin 培地でのブルセラ属菌の成長は、SBA に比較してやや遅い。

増菌培養は TS Broth、Serum Dextrose Broth、Brain Heart Infusion (BHI) Broth などを用いる。通常血液培養ビンを用いて行うが、ない場合は 0.2um フィルターキャップ付き細胞培養用小フラスコ (#MA-23050:住友ベークライト、#35-3108:BD Falcon など) に液体培地 10ml を入れ、これに血液 0.5~1ml を加えて培養する。振盪培養が望ましいが、無理な場合は適宜、混和する。組織の場合は、無菌的に生理食塩水などで 10%乳剤にした後に液体培地に加える。培養は、原因菌が *B. abortus* である場合を考慮し、炭酸ガス 5~10%存在下で行う。37°C で最低 21 日間培養し、各週 2 回程度分離培地 (SBA、ブルセラ寒天など) に移植する。ブルセラ選択サプリメント (関東化学、#711169-5 参照。1 バイアル (500ml 培養液用) 中に以下の物を含む。ポリミキシン B: 2500IU, バシトラシン: 12500IU, シクロヘキシミド: 50mg, ナリジクス酸:

2.5mg, ナイスタチン: 50000IU, バンコマイシン: 10mg) も利用できる。血液培養時には、血球（特に白血球）を破壊しておく方が菌の検出がよいと言われている。

3) 判定

smooth-type のブルセラ菌の場合、小さい正円形、半球状にやや隆起した表面平滑なコロニーで、rough-type の場合は、辺縁が均一ではない。初期は芥子粒をまいたような感じである。発育はやや遅く、3日以上の培養で直径 1.5~2mm になる。疑わしいコロニーについてはスライドグラスに塗末後、微量のホルマリンを入れた 50ml プラスチックチューブなどに密閉燻蒸し、その後、火炎固定したのちグラム染色を行う。グラム陰性の小球-球桿菌で単在することが多く、長い連鎖は作らず両端濃染性を示さない。特に新鮮分離株では小球菌のように見えやすい。その他、一般的な生理学的（運動性等）・生化学的性状（オキシダーゼテスト、ウレアーゼテスト等）の検査を実施する。いわゆる生化学的性状検査キット用いられるが、あくまでも補足的な利用にとどめ、結果コードによる判定はしない。しばしばコードの誤判定があり、特にブルセラ属菌でないと誤判定されたときに、その後の取扱による検査室・実験室感染リスクが増す。以下にブルセラ属菌の鑑別のための特徴を示す。

図) 血液寒天培地上の *B. canis* コロニーとグラム染色像

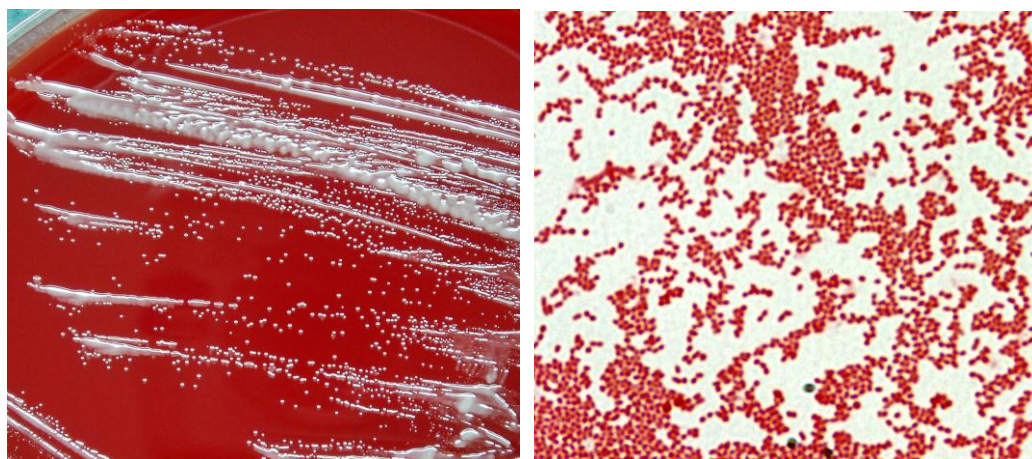


表) ブルセラ属菌と鑑別を要する細菌

試験	<i>Brucella</i> spp.	<i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxella</i> <i>phenylpyruvica</i>	<i>Oligella</i> <i>ureolytica</i>	<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i>
抗ブルセラ抗血清 での凝集	+	-	-	-	-	-
オキシダーゼ #	+	+	-	+	+	+
運動性	-	+	-	-	+/-	-
ウレアーゼ #	+	+	+/-	+	+	+/-
硝酸塩還元	+	+	-/+	+	+	
血液寒天 での発育	+	+	+	+	+	-
グラム染色						
形態	極小の 球桿菌	短桿菌 小球桿菌	大球桿菌	球桿菌	極小の 球桿菌	小球桿菌
染色性	淡い	鮮明	鮮明	鮮明		

: *B. ovis* はオキシダーゼ、ウレアーゼ(-)

表) ブルセラ属菌の鑑別

鑑別試験等	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. canis</i>
宿主	ウシ	ヤギ・ヒツジ	ブタ	ヒツジ	イヌ
ヒトへの病原性	中等度	強い	強い	なし	弱い
色素に対する感受性					
塩基性フクシン	耐性	耐性	感受性	感受性	感受性
チオニン	感受性	耐性	耐性	耐性	耐性
ウレアーゼ	>90min	>90min	<90min	-	<90min
H ₂ S産生	2~5 days	-	1~6 days	-	-
CO ₂ 要求性*	+/-	-	-	+	-

2. 遺伝子の検出

ブルセラ属菌遺伝子の検出には PCR 法を用いる。以下に、PCR 用プライマーの性状を示す。サンプルは、血清もしくは血液、骨髓穿刺材料から、市販の DNA 抽出キット (SepaGene : #SG0100 : エーディア、QIAamp DNA Mini Kit : #51304 : QIAGEN) を用いて精製した DNA、もしくは、分離培養した細菌コロニーの煮沸菌液上清またはキットを用いて抽出した DNA を用いる。

B. abortus 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 BCSP31 をコードする遺伝子 (*bcsp31*) 内の 224 bp の領域を標的とした PCR が最も広く用いられている。これは、全てのブルセラ属菌に保存されている。その他、16S ribosomal RNA 遺伝子や IS711 領域遺伝子に対するプライマーなども用いられる。

我々の用いている PCR を以下に述べる。この PCR では、4 セットのプライマーによる増幅パターンの違いにより、ヒトに感染しうる主要 4 菌種を鑑別することが可能である。

表) プライマーと標的遺伝子、増幅産物サイズ、陽性を示す菌種

Target gene	Primer pair	Product size	Positive
<i>bcp31</i>	B4/B5	224 bp	BM, BA, BS, BC
<i>omp2</i>	(abortus type) JPF/JPR-ab	186 bp	BM, BA, BS
	(canis type) JPF/JPR-ca	187 bp	BS, BC
<i>omp31</i>	1S/1AS	249 bp	BM, BS, BC

BM: *Brucella melitensis*, BA: *B. abortus*, BS: *B. suis*, BC: *B. canis*

図) プライマーデザイン

bcp31 --- 224 bp (M20404)

B4(S) --- 5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA

B5(AS)--- 5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg

omp2 --- (U26438, U26439)

JPF(S) --- 5'-gCg CTC Agg CTg CCg ACg CAA

JPR-ab(AS)--- 5'-CAT TgC ggT Cgg TAC Cgg Ag (186 bp)

JPR-ca(AS)--- 5'-CCT TTA CgA TCC gAg CCg gTA (187 bp)

omp31 --- 249 bp (AF366073)

1S(S) --- 5'-gTT CgC TCg ACg TAA CAg CTg

1AS(AS)--- 5'-gAC CgC Cgg TAC CAT AAA CCA

bcp31-PCR のプライマーによって増幅される産物は、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 (BCSP31) をコードする遺伝子の 224bp の領域で、全てのブルセラ属菌に保存されている。*omp31*-PCR のプライマーによって増幅される 249bp の産物はブルセラ属菌の外膜タンパク (OMP31) をコードする遺伝子の一部で *B. abortus* 以外に含まれる (*B. abortus* はその領域を欠く)。同じくブルセラ属菌の外膜タンパク OMP2 には 2 種類のプライマーセットを用いる。*omp2-ab*-PCR のプライマーによって増幅される 186bp の産物は *B. ovis*、および *B. canis* には含まれていない。*omp2-ca*-PCR のプライマーによって増幅される 187bp の産物は *B. suis* biovar 1 および *B. canis* に含まれる。

B. abortus および *B. canis* の陽性コントロール遺伝子は、それぞれの凝集反应用菌液 (*B. abortus* : 農業・食品産業技術総合研究機構、*B. canis* : 北里研究所) より DNA 抽出キットを用いてプロトコールに従い分離精製し、使用することが可能である。ただ、これだとコンタミネ

ーションによる疑陽性のリスクが伴うことから、それぞれの増副産物のサイズを変更した陽性コントロール DNA を使用することが可能である。陽性コントロール DNA は、感染研から分与可能である。

PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (#27-9559-01 : GE Healthcare、2~2.5unit puReTaq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl pH9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200uM dNTP, BSA) を用いて実施するのが簡便で良い。以下にその反応溶液の調整方法および反応条件（4セット共通）を記す。

表) 反応溶液の調整

	<i>bcbp31, omp2-JPR-ab, omp2-JPR-ca, omp31</i>	
RTG PCR Beads	1 tube	tubes
DEPC-H ₂ O	20.5 ul	ul
Primer (S & AS) (10uM)	1 ul ×2 (final: 0.4uM)	ul
	22.5 ul (/ tube)	ul
反応溶液をまとめて調整し、各チューブに 22.5ul ずつ入れる。 その後、サンプル DNA 溶液を 2.5ul 加える。		
Sample DNA	2.5 ul	ul
Total volume	25 ul	ul

図) PCR 反応条件

- 95 °C、5 min
- ×35 cycle (95 °C, 1 min - 65 °C, 1 min - 72 °C, 1 min)
- 72 °C、7 min
- 4 °C

次に、*B. abortus* biovar 1 125 株、*B. canis* QE13 株、*B. melitensis* biovar 1 16M 株、*B. suis* biovar 1 1330 株を用いて前述の PCR を行ったときの検出パターンを示す。図のように、*B. abortus* では *bcbp31*、*B. abortus* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. melitensis* では *bcbp31*、*omp31*、*B. abortus* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. canis* では *bcbp31*、*omp31*、*B. canis* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. suis* は *B. abortus* 型と *B. canis* 型、両方の *omp2* 遺伝子を持つため、すべての遺伝子が検出される。

図) 基本検出パターンと *B. melitensis* 検出例

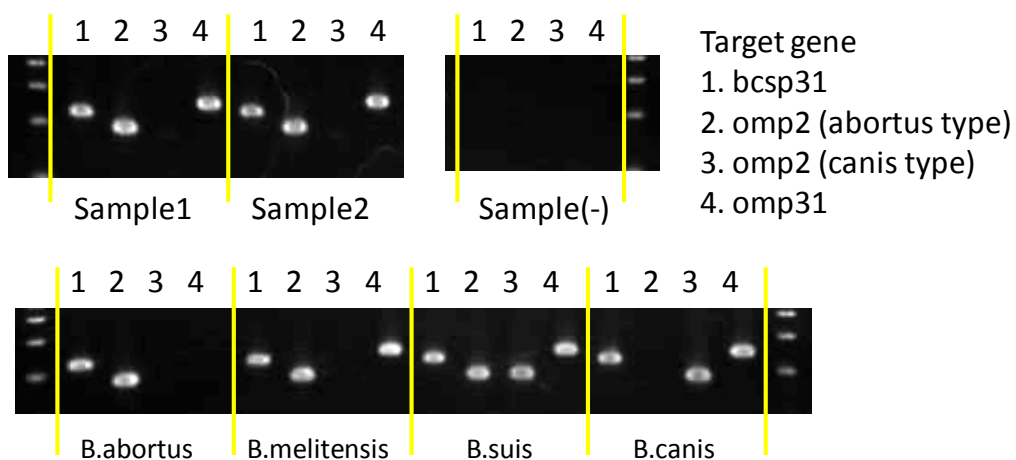
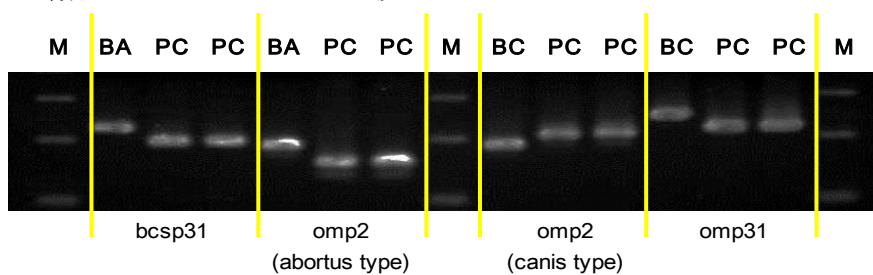


図) PCR 陽性コントロール DNA の反応パターン



BA: *B. abortus*, BC: *B. canis*,

PC: Positive control DNA

	Product Length (bp)	
	Target	Posi. Cont.
bcsp31	224	194
omp2 (ab)	186	156
omp2 (ca)	187	207
omp31	249	219

V. 抗体の測定

1. 試験管内凝集反応（血清反応）

ブルセラ症は多くの場合慢性経過をたどり、有症状期（風邪様症状など）でもすでに抗体を保有していることが多い。また、検体からの菌の分離・培養は困難で、時間を要する。これらのことから本症の日常的な診断では多くの場合、血清診断が行われ、その意義は大きい。血清反応のうち標準的に行われる試験管内凝集反応は、市販の家畜用の標準菌液を利用できる。また 2-メルカプトエタノール感受性の IgM 抗体の検出によって病気の早期での診断も可能である。IgG 抗体は、治癒後も 1 年くらい検出できると言われている。発症初期の血清と、その後 2～3 週間後の血清を検査して抗体価の変化を見るとよい。野兔病菌、エルシニア菌、コレラ菌との交差反応に注意する。

S-LPS を持つブルセラ属菌に対する抗体の測定には、*B. abortus* の死菌体を用いた試験管内凝集反応が広く用いられるが、これでは R-LPS を持つ *B. canis* に対する抗体は検出できない。*B. canis* を疑うときは *B. canis* の凝集反应用抗原を用いる。基本的に臨床検体では、両方の検査を行うことになる。*B. abortus* 感染症例では *B. abortus* に対してのみ陽性を示し、*B. canis* 感染症例では *B. canis* に対してのみ陽性を示す。*B. melitensis* 感染症例では *B. abortus*、*B. canis* 両方に陽性を示すことが多い。

注意事項として、過度に溶血した検体は、ヘモグロビンの影響によるとされる偽陽性を示すことが知られており、その場合は採血をやり直す必要がある。また、血清は非動化しない。それぞれ凝集反应用菌液添付の使用説明書（次ページ参照）に従って実施する。

必要な器具等

- *透明なガラス製小試験管（直径 12mm-長さ 75mm、Disposable culture tubes、#9831-1207、IWAKI）
- *0.5w/v%フェノール加生理食塩水（生理食塩水に 0.5%（w/v）になるよう加温融解したフェノールを加える）（*B. abortus* 用）
- *リン酸緩衝食塩液（pH7.2、46.7g リン酸二ナトリウム・12 水、6.55g リン酸一ナトリウム・2 水、9.0g 塩化ナトリウム、1.0g 窒化ナトリウム、以上を 1,000ml に調整）（*B. canis* 用）
- *試験管内凝集反应用菌液（*B. abortus*：農業・食品産業技術総合研究機構、*B. canis*：北里研究所）
- *陽性対照血清（ウサギに標準菌液を免疫して調整する）
- *その他、一般的に血清反応に必要なとされる器具類

1) *B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis* に対する抗体の検出

抗原：ブルセラ病診断用菌液 (*B. abortus* 99 もしくは 125 株 (*Brucella melitensis* biovar *abortus* strain 99 or 125) の加熱死菌液)

製造・販売：農業・食品産業技術総合研究機構

検査手順

- (1) 菌液をよく振り、フェノール加生理食塩水 (B：希釈液) で 10 倍に希釈 (A：10 倍希釈診断用菌液)。
- (2) 標準混濁管を調整。
- (3) 5 倍希釈血清から出発して 2 倍段階希釈で 5 段階の希釈系列を用意 (0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1 : 5 ~ 1 : 80)。
- (4) 同様に力価が 160 倍以上の陽性対照血清を希釈。
- (5) 抗原菌液 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、37°C で 18 ~ 24 時間感作後、判定。(最終血清希釈倍数 1 : 10 ~ 1 : 160)
- (6) 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
- (7) 血清の最終希釈倍数 40 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定。

表) 判定の基準と標準混濁管

判定の基準			混濁管の作り方		
凝集度	記号	所見	A : B	混合液	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	++	かなりの凝集沈殿があり、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

注： *Yersinia enterocolitica* serotype O9、*Francisella tularensis*、*Vibrio cholera* との交差凝集があり偽陽性を呈することがあるため注意を要する。また、凝集抗体価が高値の検体では血清希釈の低いところで疑陰性を呈することがあるため、320 倍以上も希釈し検査する。

2) *B. canis* に対する抗体の検出

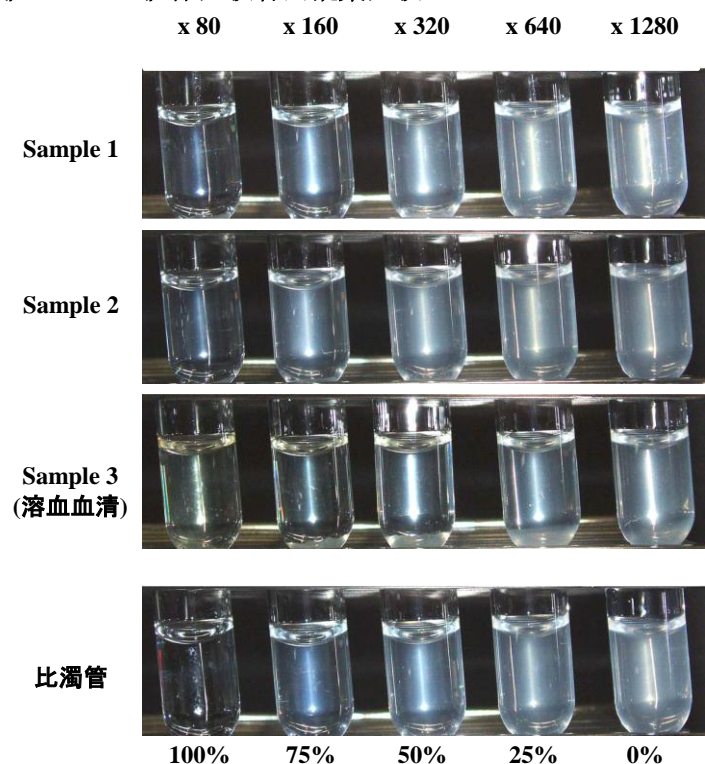
抗原：ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液)

製造・販売：北里研究所 生物製剤研究所

検査手順

- (1) 標準混濁管を調整 (*B. abortus* に準じる)。
- (2) 20 倍希釈血清から、2 倍段階希釈で 5 段階の希釈系列を用意。(0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1:20~1:320)。
- (3) 同様に力価が 320 倍以上の陽性対照血清を希釈。
- (4) 抗原菌液 (OD550=1) 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、50°C で 24 時間感作後、判定。(最終血清希釈倍数 1:40~1:640)
- (5) 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
- (6) 血清の最終希釈倍数 160 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定。

抗 *B. canis* 抗体試験管内凝集試験



VI. 参考文献

1. Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7.
(http://www.who.int/csr/resources/publications/deliberate/WHO_CDS_EPR_2006_7/en/) WHO.
2006. (総論)
2. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011.
(<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>) OIE. 2011. (総論)
3. Brucellosis. (<http://emergency.cdc.gov/agent/brucellosis/>) CDC. 2008. (総論)
4. Pappas, G, Papadimitriou, P, Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, 6: 91-99, 2006 (総論、疫学)
5. Memish, Z.A. and H.Balkhy, H.H. Brucellosis and international travel. *J. Travel. Med.*, 11: 49-55, 2004 (総論、疫学)
6. Greene, C.E. and Carmichael, L.E. Canine brucellosis. pp369-381. In: Greene CE. (ed), *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd ed. Elsevier, Inc., Canada, 2006 (総論、イヌブルセラ)
7. Chu, M.C. and Weyant, R.S. Francisella and Brucella. pp789-808. In: Murray P.R. et al. (eds), *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. ASM Press. Washington, D.C. 2003. (総論)
8. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface.
(<http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>) OIE. (疫学、家畜)
9. ブルセラ症(2007年3月31日現在). In: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 28(8), 2007. (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/28/330/kj3302.html>) (疫学、国内ヒト)
10. Sewell, D.L. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 389-405, 1995 (実験室感染)
11. Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L. and Paul, M. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br. Med. J.*, 336:701-704, 2008 (治療、ヒト)
12. Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S. and Stoker, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271-275. 1992. (PCR、BCSP31)
13. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:137-139, 2007 (PCR、omp2&omp31)
14. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A and Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33:3087-3090. 1995. (PCR、OMP2)

15. MacMillan, A. Conventional serological tests. pp153-197. In: Nielsen, K and Duncan, J.R. (eds), Animal brucellosis. CRC Press, Inc. Florida. 1990. (試験管凝集反応)
16. Hart, C.A. and Bennett, M. Gram negative infections: Gram negative zoonoses. pp581-604. In: Cimolai, N. (ed), Laboratory diagnosis of bacterial infections. Marcel Dekker, Inc. New York. 2001. (試験管凝集反応)
17. Baum, M., Zamir, O., Bergman-Rios, R., Katz, E., Beider, Z., Cohen, A. and Banai, M. Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. 1995. J. Clin. Microbiol. 33: 2166-2170. (マイクロプレート凝集反応)
18. Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci, 70:707-709, 2008 (マイクロプレート凝集反応)

VII. 検査依頼先

国立感染症研究所 獣医科学部 第一室 今岡 浩一、木村 昌伸

Tel: 03-5285-1111 (内 2622)、Fax: 03-5285-1179

VIII. 執筆者一覧

今岡 浩一： 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室

木村 昌伸： 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室

勝川 千尋： 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部 細菌課