

血清型別検査

(微生物部)

血清凝集反応

確認培養等による生化学性状から属及び種が決定されたら、次に免疫血清に対する凝集反応により血清型を決める。ここでは、腸内細菌及び類似菌（ブドウ糖を分解する菌として、サルモネラ、赤痢菌、チフス菌、腸炎ビブリオ、コレラ菌など）の血清型別検査の方法について述べる。なお、病原菌の血清型の決め方は各種診断用免疫血清の説明に従って行う。

- ▶ 1. 血清型の決定
- ▶ 2. 凝集反応
- ▶ 3. H抗原の相の誘導法（相誘導）

1. 血清型の決定

血清型の決定は各種診断用免疫血清により行う。各種診断用免疫血清と被検菌を混和させたとき、免疫血清と対応する菌との抗原抗体反応により菌体の凝集塊が生じる。この反応を目視にて観察することで血清型の決定を行う。被検菌は普通寒天培地や HI 寒天培地等に接種した純培養菌を用いて凝集反応を行うが、腸内細菌及び類似菌では確認培地の TSI 寒天斜面培養菌を用いることもできる。

(1) O 抗原^{*1}（菌体抗原）、K 抗原^{*2}（莢膜抗原）の型別

*1: O 抗原の由来 ohne Hauchbildung *2: K 抗原の由来 Kapsel

① 被検菌として生菌を用いる場合

- ・サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌の O 抗原、腸炎ビブリオの K 抗原、チフス菌の Vi 抗原の血清型を決めるときは、生菌を用いる。
- ・普通寒天培地、HI 寒天培地等に接種した純培養の生菌^{*3}を使用し凝集反応（スライド凝集反応）を行う。

*3: 生化学性状試験に使用した TSI 寒天斜面培養菌を使用すると時間の短縮になる。

② 被検菌として加熱死菌を用いる場合

- ・菌体の周囲に形成された莢膜様物質を不活化するために、加熱死菌を用いる。
- ・大腸菌、チフス菌の O 抗原、腸炎ビブリオの O 抗原の血清型を決めるときは、加熱死菌を用いる。
- ・純培養菌を生理食塩水に濃厚接種した浮遊液を作成し、100℃で 30 - 60 分間加熱した加熱死菌を使用し凝集反応（スライド凝集反応）を行う。
- ・加熱温度・時間は菌により異なるので、各種診断用免疫血清の説明に従って行う。

(2) H抗原*4 (鞭毛抗原) の型別

*4: H抗原の由来 Hauchbildung

- ・サルモネラ、大腸菌のH抗原の血清型を決める。
- ・被検菌としてHI ブイヨンやBHI ブイヨンに接種した純培養の液体培養菌液に1%ホルマリン加生理食塩水を等量加えたもの（最終濃度 0.5%ホルマリン液）を使用し凝集反応（試験管内凝集反応）を行う。
- ・サルモネラのように2つのH抗原をもつ菌（複相菌）は、通常一方の相にのみ凝集がみられ、他の相とは反応しない。従って、最初に凝集したH血清に対するH抗原の他に、もう1つのH抗原を確認しなければ、血清型は決定できない。それには、後述するH抗原の相の誘導法に従って被検菌液を作り、それを使って再度凝集反応（試験管内凝集反応）を行う。

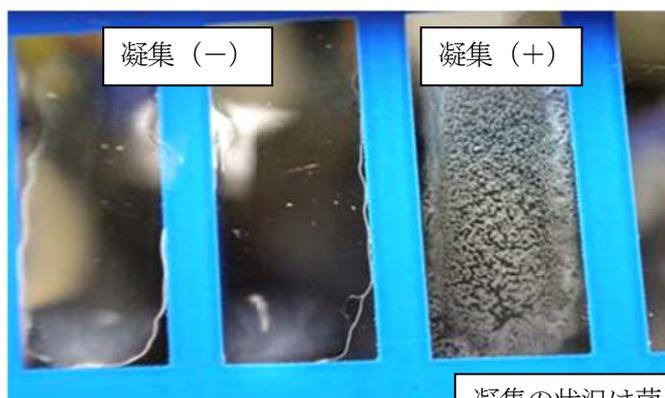
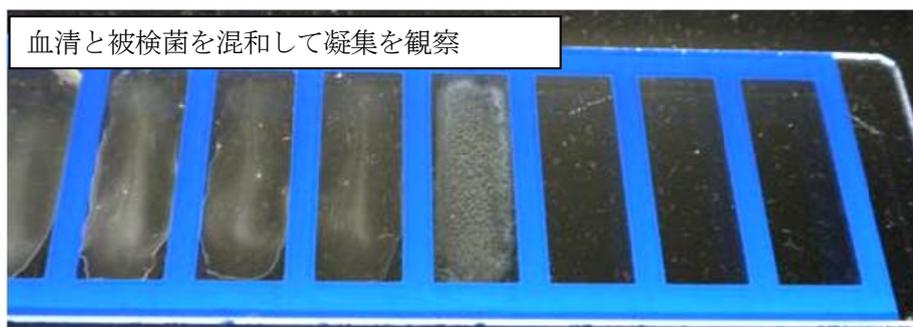
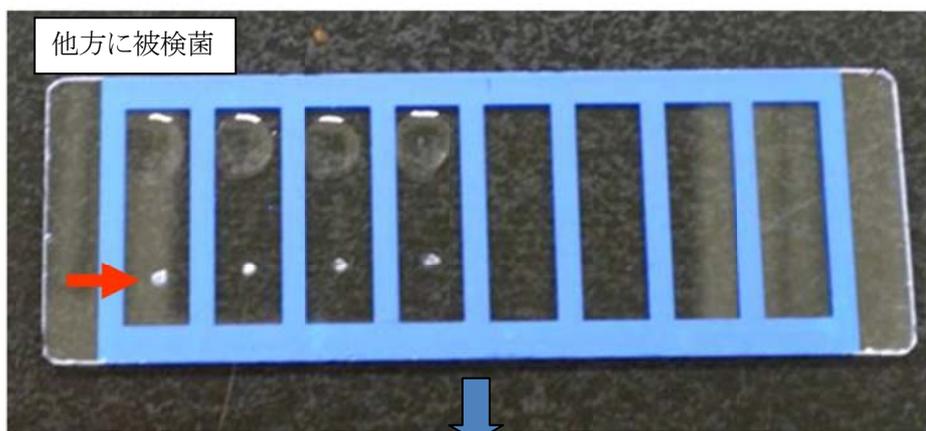
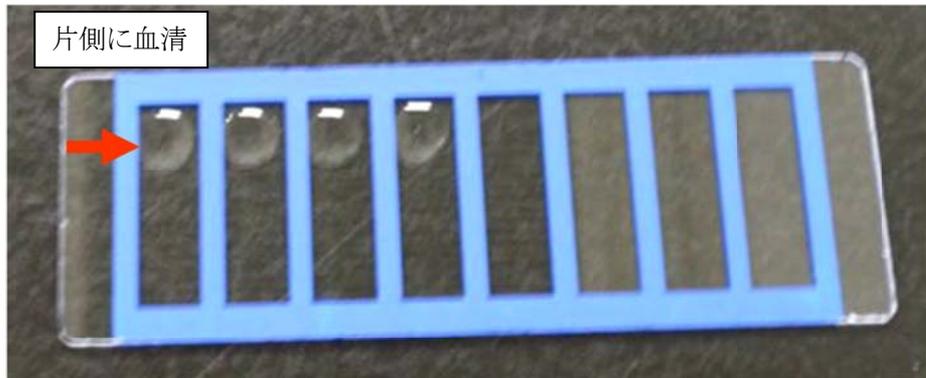


- ・H凝集反応は鞭毛抗原による凝集反応であることから、鞭毛が十分発育している必要がある。生化学性状試験に用いたSIMあるいはLIM培地に発育した菌の2-3白金耳を（試薬を入れる前に）BHIかHIブイヨンに接種すると良い。
- ・36 - 37°Cのインキュベータで一夜培養した後、1%ホルマリン加生理食塩水を等量加えて静かに混和し、殺菌固定を兼ねて2時間ほど静置して供試する
*長時間の培養は避ける（恒温槽で培養すると4-5時間で発育する）

2. 凝集反応

凝集反応には、スライド凝集反応と試験管内凝集反応とがある。通常はスライド凝集反応で血清型を決めるが、サルモネラのH抗原は試験管内凝集反応で血清型を決める。

(1) スライド凝集反応

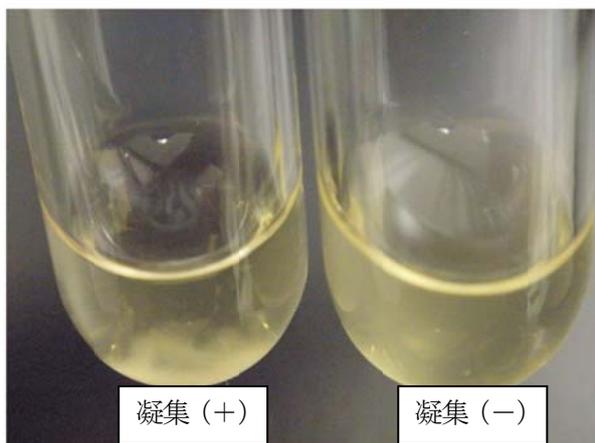


凝集の状況は菌により異なる場合がある

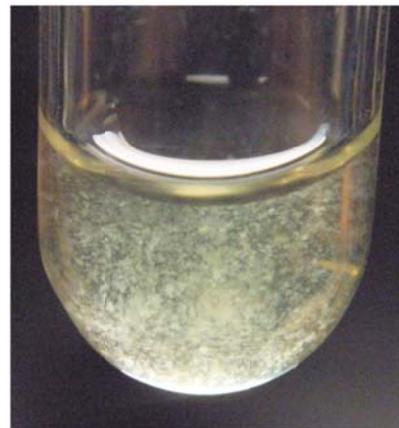
(2) 試験管内凝集反応

① 小試験管を用いる場合

- 小試験管（できるだけきれいなものを選ぶ。）に H 血清 0.02ml とホルマリン処理の液体培養菌液 0.4ml を混和し、50℃の恒温槽で 30 分間静置する。
- 蛍光灯などの光にかざし、凝集の有無を確認する。非常にもろい凝集塊なので注意して取り扱う。



凝集が強いと（左）液層が透明になり、凝集が無いと（右）試験管全体が混濁



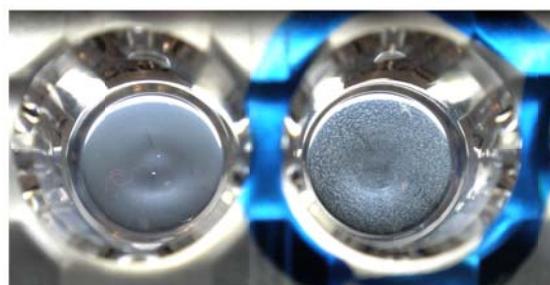
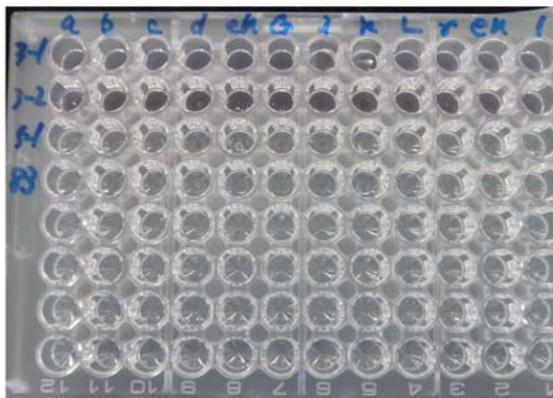
軽く振ると柔らかい凝集塊が認められるが、強く振るとくずれてしまうので注意する

② マイクロプレート（V 型）を用いる場合

- 5 倍希釈した H 血清 10 μ l とホルマリン処理の液体培養菌液 30 μ l^{*5} を混和（プレートミキサーで 30 秒程度）し、36℃のインキュベータで 30 分静置後、各ウェルについて凝集塊の有無を確認する。（凝集が認められない場合はさらに 30 分延長）

*5) マイクロプレートを用いる場合は、生化学性状試験に使用したリジン脱炭酸試験培地に 1%ホルマリン加生理食塩水を等量加えたものを使用すると時間の短縮になる。

- 下から光を当て、ルーペで見ると分かりやすい。



凝集 (-)

凝集 (+)

3. H 抗原の相の誘導法 (相誘導)

(1) サルモネラの相誘導

・サルモネラの多くは 2 つの H 抗原をもち (複相菌)、通常はどちらか一方の抗原を持つ菌が優勢を占めている。まず、最初に凝集した相 (1 相目) の H 血清型が決定したらその血清型の相誘導用免疫血清 (デンカ生研) を HI 半流動培地 (寒天 0.3-0.5%) に所定量加え、滅菌したクレギー管を無菌的に培地の中に立てて固めた後、クレギー管中の培地上部 5mm 程度のところ (矢印) まで菌を接種し、もう 1 つの相 (2 相目) を誘導する。

・2 相目を持つ菌は、1 相目の H 血清型に該当しない H 抗原を持つ菌で、1 相目を持つ菌は血清により運動が抑えられ、2 相目を持つ菌が 18-22 時間でクレギー管の外側まで運動して発育する—誘導 有

・1 つの相しかない菌もあり、最初の凝集に対応する H 抗血清を加えた半流動培地では、他の相が無いいため菌は動かない—誘導 無

*Kauffman-White 抗原構造表に H 抗原の 1 相 : 2 相が記載されているが、1 相が始めに出るとは限らない。



誘導 有 誘導 無 未接種

(2) 誘導後の被検菌の調製

・2 相目を持つ菌が試験管全体に発育 (18-22 時間 : 長時間培養すると、元の相 (1 相目) の菌が発育してくるので注意する) したら、クレギー管の外側上部から 2-3 白金耳釣菌し、BHI ブイヨンに接種後、37℃の水浴中で 5-6 時間培養し十分に発育した菌に 1%ホルマリン加生理食塩水を液体培養菌液と等量加えて、殺菌固定 (2 時間くらい静置) したものを被検菌とし、凝集反応を行い抗原を決定する。



クレギー管の外側上部から、2-3 白金耳釣菌する

・同定時間を短縮するため、生化学性状試験で使用したリジン脱炭酸試験培地をホルマリン処理して、マイクロプレートを用いた簡易法で 1 相目を決定する。次に生化学性状試験で使用した TSI 寒天斜面培養菌で相誘導を行い (夕方接種) 翌朝 BHI ブイヨンに接種し、4-5 時間培養した後、ホルマリン処理し、同様に 2 相目を決定する。この方法だと血清型決定に 1 日の短縮が可能である。