

嫌気性菌鑑別法の検討

○江成 博¹⁾、国広 誠子²⁾

¹⁾ 極東製薬工業株式会社 営業推進部 微生物学術課、²⁾ 山口県立中央病院 中央検査部

I. 目的

日本臨床微生物学会編 - 臨床嫌気性菌検査法 '97- は検体のカテゴリ一別、同定の Level 別を明記した点で斬新であった。しかしながら現状では菌種同定コストと精度、医療環境の変化(嫌気培養加算の減算)などの問題を抱えている。

そこで、これらの問題をふまえつつ、学会 Manual の嫌気性グラム陰性桿菌の Level 1 での同定法に対応する方法論の確認・確立を目的とした。

今回の検討にあたっては既存培地の利用、2~3日で結果が得られること、判定が容易であること、予備還元・嫌気培養コストなどの周辺コストの低減を図るとともに簡易同定キットを使用する Level 2 での同定精度の向上に資することも要件とした。

II. 方法

【今回の検討に供試した培地の調製法】

ES-HK 培地; ES の加水分解と H₂S 産生を確認する。HK 半流動培地 1L あたり esculin 1g、クエン酸鉄アンモニウム 0.5g を加える。

Bile-HK 培地; 20%胆汁存在下での発育を確認する。HK 半流動培地 1L あたり胆汁末 20g を加える。

CV-HK 培地; 0.001% Crystal violet 耐性を確認する。HK 半流動培地 に 0.001% に crystal violet を加える。

F/F-HK 培地; ギ酸・フマル酸要求性を確認する。HK 半流動培地 にギ酸ナトリウム、フマル酸ナトリウムをそれぞれ、最終濃度 3g/L に加える。

* 滅菌は 115°C、15分とし、急冷・凝固する。

【供試菌種と接種法】

供試菌種;

Bacteroides fragilis, *B. thetaiotaomicron*, *Bilophila wadsworthia*, *Fusobacterium mortiferum*(2株), *F. varium*, *F. nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *P. levii*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *Prevotella bivia*, *P. oralis*, *Wollinella* sp.

接種法;

各供試菌株をブルセラHK寒天培地 (RS) で前培養し、その 1 集落 (一部の菌株については数集落) を釣菌、0.5mL の菌液とした。この調製菌液を各培地に Pasteur pippet で 0.1mL ずつ接種した。培養は好気培養とし、35°C、2~3日観察、判定した。

III. 結果

検討菌株の培養結果を Fig. 1、Table 1. に示す。また、Table 2. に学会 Manual 法との対応を示した。



Fig. 1. 検討菌株の培養結果

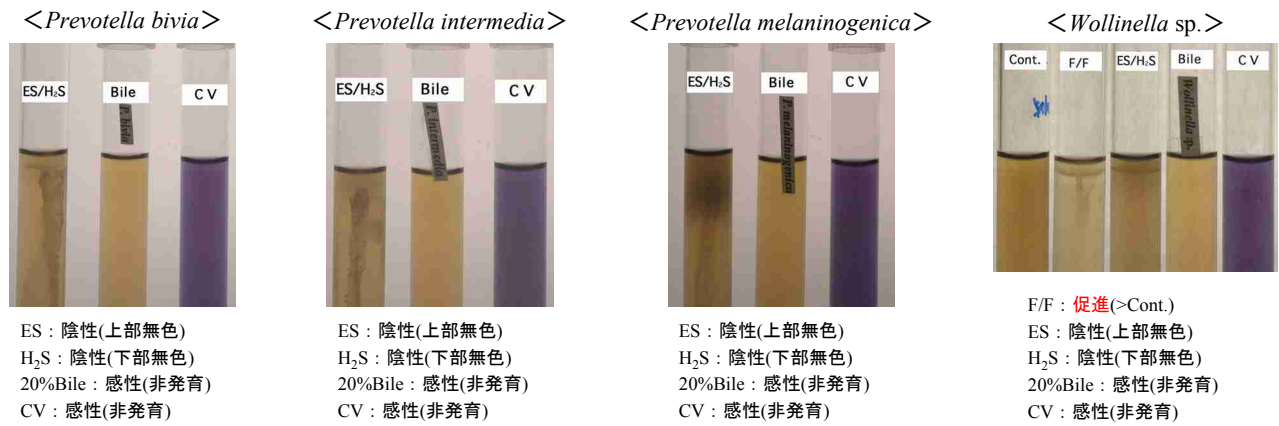


Fig. 1. 検討菌株の培養結果(続き)

Table 1. 検討菌株の培養結果

供試菌株	ES	H ₂ S	Bile	CV	F/F stimul.	備考
<i>B. fragilis</i>	+	-	R	S	•	*: 黒色
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+	-	R	S	•	*: 黒色
<i>B. wadsworthia</i>	-	+	R*	R	•	*: 促進
<i>F. nucleatum</i>	-	-	S	R	•	
<i>F. mortiferum 02</i>	+	-	R	R*	•	*: 黒褐色、*: CV脱色
<i>F. mortiferum 42</i>	+	-	R	R*	•	*: 同上、写真には示さず
<i>F. varium</i>	-	+	R	R*	•	*: CV脱色
<i>P. gingivalis</i>	-	-	S	S	•	
<i>P. levii</i>	-	-	S	S	•	
<i>P. bivia</i>	-	-	S	S	•	
<i>P. intermedia</i>	-	-	S	S	•	
<i>P. melaninogenica</i>	-	-	S	S	•	
<i>P. oralis*</i>	+	-	S	S	•	*: 培養3日、写真には示さず
<i>Wollinella sp.</i>	-	-	S	S	+	*: F/F > Cont.

Table 2. 検討結果のまとめ

Level 1bでの菌種名 (臨床マニュアル '97)	BAC/mFM/BBE Growth	今回の供試菌株 (計14株)	ES-HK ES H ₂ S	Bile-HK Growth	CV-HK Growth	F/F-HK Stimul.
色素産生 <i>Prevotella/Porphyromonas sp.</i>	(+)/-/ -	<i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. levii</i>	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	• • • •
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+/-/+	•	• •	• •	• •	• •
<i>B. vulgatus</i> 以外の <i>B. fragilis</i> group	+/-/+	<i>B. fragilis</i> <i>B. thetaiotaomicron</i>	+ - + -	+ - + -	- - - -	• •
<i>Bilophila wadsworthia</i>	-/+/+	<i>B. wadsworthia</i>	- +	+ +	+ +	•
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-/+/-	<i>F. nucleatum</i>	- -	- -	+ +	•
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-/+/-	•	• •	• •	• •	• •
<i>Fusobacterium mortiferum/varium</i>	-/+/+	<i>F. mortiferum 02</i> <i>F. mortiferum 42</i> <i>F. varium</i>	+ - + - - +	+ + + + + +	+ + + + + +	• • •
<i>Fusobacterium sp.</i>	-/+/-	•	• •	• •	• •	• •
色素非産生グラム陰性桿菌 (Non-pigmented <i>Prevotella sp.</i> など)	(+)/-/ -	<i>P. bivia</i> <i>P. oralis</i>	- - + -	- - - -	- - - -	• •
<i>Bacteroides ureolyticus</i> group	•	<i>Wollinella sp.</i>	- -	- -	- -	+ +
<i>Clostridium sp.</i> (<i>C. clostridioforme</i> 、 <i>C. ramosum</i> 、 <i>C. symbiosum</i> * など)	+/-/-	•	• •	• •	• •	• •
偏性嫌気性菌 (未同定)	•	•	• •	• •	• •	• •

IV. 考察

嫌気培養加算の減算など医療環境の変化への対応という視点と培養を前提とする菌種同定における「基本性状の重視」の立場から本検討を実施した。

既存 HK 半流動培地に 1 ~ 2 種の成分を添加する確認培地として臨床嫌気性菌検査法'97 の Level 1 の嫌気性グラム陰性桿菌同定用としての適応を評価した。その結果、平板培地と異なり運動性、ガス産生の確認も可能であることから、その適応が確認された。また抗菌剤の影響が無いため、より詳細な性状確認が可能であることから Level 2 での簡易同定キットの弱点を補完する用途にも適していると考えられる。

V. 結論

今回の方法は学会 Manual の Level 1 の同定法(平板法)に比して下記の特徴がある。

1. 既存培地への 1 ~ 2 種の試薬追加のみで自家調製は容易である。
2. 予備還元・嫌気培養が不要であり、周辺コストが低減できる。
3. 運動性、ガス産生、20%Bile 感受性菌の esculin 水解能など基本的性状が確認できる。
4. 平板法で不可避な抗菌剤の影響がない。

以上から、好気性陰性桿菌における TSI, LIM, SC などの確認培地のごとく簡易に使用でき、学会 Manual の平板法と同等以上の鑑別能が期待できる。