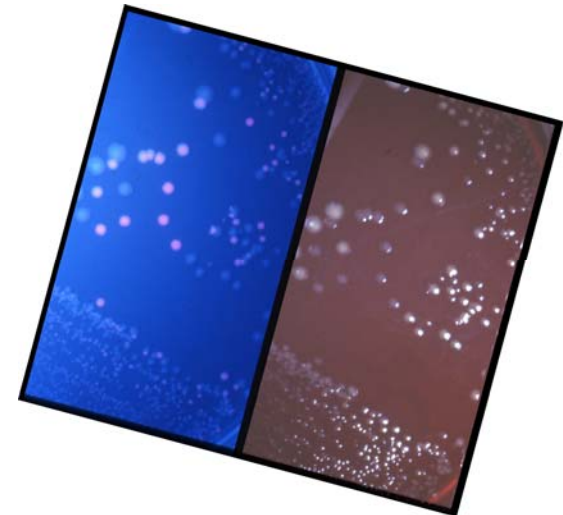
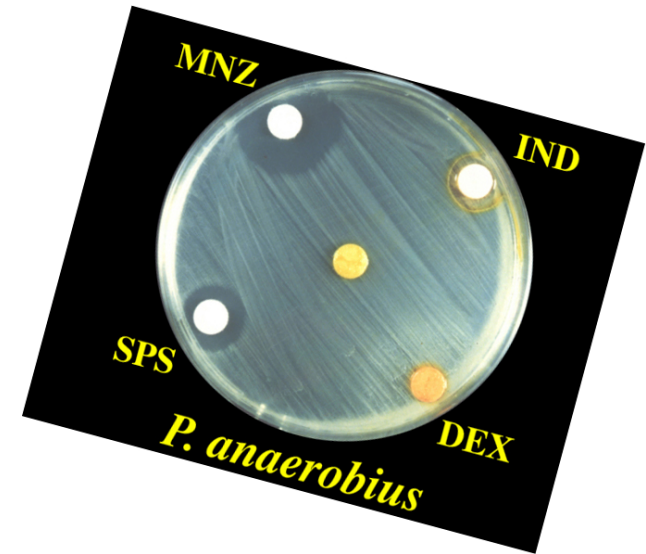
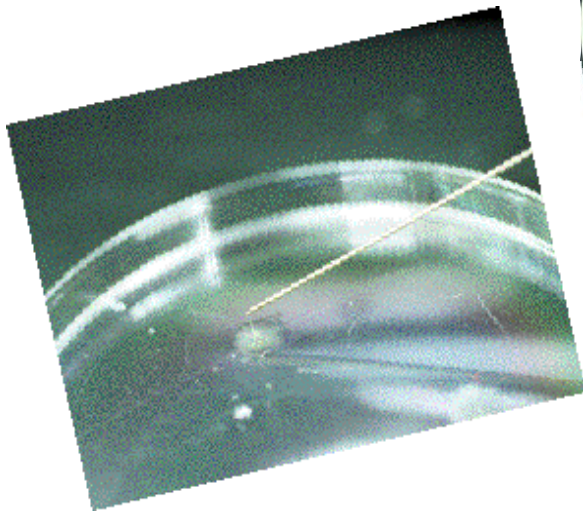
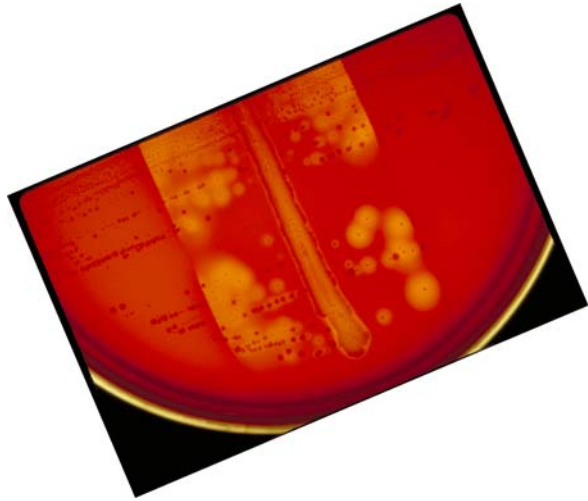


嫌気培養検査の留意点

Level 1 での同定を前提に



極東製薬工業株式会社
営業学術部 微生物グループ

嫌気性菌感染症

(日本臨床微生物学会編；臨床嫌気性菌検査法'97より)

嫌気性菌は好気性菌と共にヒトの各部位の常在菌叢を構成している。

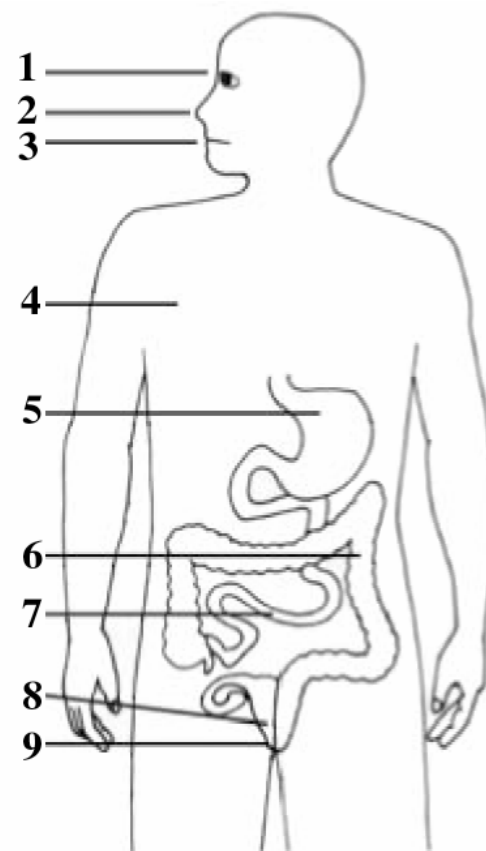
これらの常在菌叢は宿主（ヒト）にとって無害であるのみならず、外因性の病原菌の定着・感染を阻止する働きをしている。

しかしながら、時に何らかの原因により、生体の正常な防御機構に破綻を来した場合嫌気性菌感染症が成立する。

常在菌としての嫌気性菌

1.結膜のう	$10^{3\sim4}/g(10:1)$
2.鼻汁	$10^{1\sim4}/g(10:1)$
3.唾液	$10^{8\sim9}/g(3\sim10:1)$
歯牙表面	$10^9\sim10/g(1:1)$
歯齦のう	$10^{11\sim12}/g(1000:1)$
歯垢	$10^{11\sim12}/g(1000:1)$
4.皮膚	$10^{3\sim4}/cm^2(10:1)$
5.胃	$10^{2\sim5}/ml(1:1)$
6.結腸	$10^{11\sim12}/g(1000:1)$
7.小腸	$10^{4\sim5}/g(1:1)$
8.膾	$10^{8\sim9}/ml(5:1)$
9.外尿道	$10^{3\sim5}/ml(10:1)$

()内は嫌気性菌：好気性菌



ヒトの常在菌叢

(日本臨床微生物学会編；臨床嫌気性菌検査法'97より)

口腔、咽頭の常在菌叢を構成する菌種

真菌、偏性好気性菌、通性嫌気性菌

<i>Streptococcus</i> spp. (A群以外)	<i>Prevotella</i> spp.
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Porphyromonas</i> spp.
<i>Neisseria</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Leptotrichia</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Capnocytophage</i> spp.
Diphtheroids	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Candida albicans</i>	<i>Spirochetes</i> (<i>Treponema</i> spp.)
その他のYeast	<i>Veillonella</i> spp.
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Actinomyces</i> spp.
その他の <i>Enterobacteriaceae</i>	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	
その他の <i>Haemophilus</i> spp.	
(一過性の細菌)	
<i>Haemophilus influenzae</i> (40~80%)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (20~40%)	
<i>S. aureus</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> (5~20%)	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (5~10%)	

大腸の常在菌叢を構成する菌種

真菌、偏性好気性菌、通性嫌気性菌

<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Eubacterium</i> spp.
<i>Streptococcus</i> spp. (A群以外)	<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
Diphtheroids	その他の嫌気性球菌
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.
その他の <i>Proteus</i> 群	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Candida albicans</i>	その他の <i>Clostridium</i> spp.
その他のYeast	<i>Spirochetes</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Actinomyces</i> spp.
<i>Alcaligenes faecalis</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>S. aureus</i>	
<i>Mycobacterium</i> spp.	
Protozoa	

人体にみられる主要な嫌気性常在菌

部位	菌種
口腔内及び上気道	<i>Prevotella</i> (色素産生株), <i>Porphyromonas</i> 属, <i>Prevotella</i> 属 (色素非産生株, とくに <i>P. oralis</i>), <i>Bacteroides</i> 属 (<i>B. ureolyticus</i> など), <i>Fusobacterium</i> 属 (とくに <i>F. nucleatum</i>), <i>Peptostreptococcus</i> 属 (嫌気性レンサ球菌), <i>Veillonella</i> 属, <i>Actinomyces</i> 属, <i>Propionibacterium</i> 属
胃 (空腹時)	<i>Lactobacillus</i> 属
小腸 (中心に近い部分)	嫌気性レンサ球菌, <i>Lactobacillus</i> 属
大腸	<i>Bacteroides fragilis</i> group, <i>Porphyromonas</i> 属, <i>Fusobacterium</i> 属, anaerobic cocci (多くの菌種), <i>Clostridium</i> 属, <i>Eubacterium</i> 属, <i>Bifidobacterium</i> 属, <i>Propionibacterium</i> 属
生殖器, 腔, 頸管	<i>Prevotella</i> (色素産生株), <i>Porphyromonas</i> 属, <i>Prevotella</i> 属 (色素非産生株), <i>Bacteroides</i> 属, <i>Peptostreptococcus</i> 属, <i>Clostridium</i> 属, <i>Veillonella</i> 属, <i>Lactobacillus</i> 属, <i>Eubacterium</i> 属, <i>Propionibacterium</i> 属
尿道 (男性および女性)	<i>Propionibacterium</i> 属, <i>Peptostreptococcus</i> 属, <i>Bacteroides</i> (<i>Prevotella</i>) 属, <i>Fusobacterium</i> 属
皮膚	<i>Propionibacterium</i> 属, <i>Peptostreptococcus</i> 属

嫌気性菌感染症の疫学 臨床材料からの嫌気性菌の種類

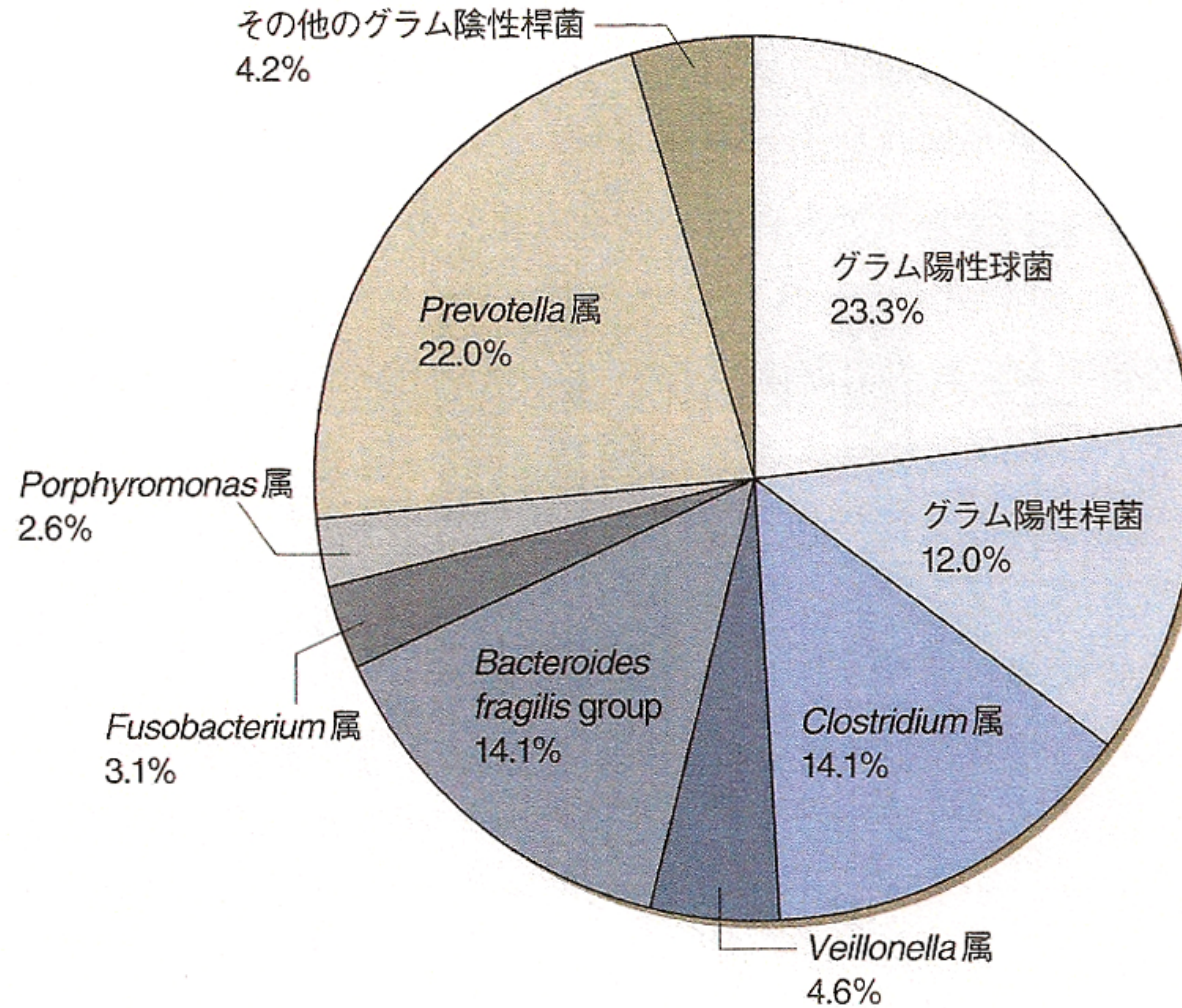


図6 臨床材料からの嫌気性菌の種類 (1994-2003年, 19,007株)

種々の感染に見られるグラム陰性の嫌気性菌

WADSWORTH-KTL Anaerobic Bacteriology Manual(6'th Ed.)

Incidence of specific anaerobes in various infections(Wadworth VA Medical Center experience 1991-1997)より

	血液	中枢神経系	頭頸部	歯科	TTA、 胸膜	肺	肛門膿瘍	褥瘡	皮膚軟部・ 骨(waist↓)	皮膚軟部・ 骨(waist↑)	虫垂	腹水	膀胱	他の 腹部
検体数	不明	103	225	8	651	128	17	22	777	327	183	不明	155	165
菌検出検体数	83	16	123	8	48	28	15	16	241	98	133	170	17	46
<i>B. fragilis</i>	26				1	3	5	9	33	6	70	61	2	18
<i>B. thetaiotaomicron</i>	4						2		9		41	23	1	12
他の <i>B. fragilis</i> group	12	1	2		1	3	7	6	31	4	177	140	3	44
<i>B. wadsworthia</i>					1	1			2	1	49	32		6
<i>C. gracilis</i>			4		1	2				3	1			
<i>Campyrobacter/B. ureolyticus</i>			5		2	1	2		16	4	7	2		1
<i>F. nucleatum</i>	3	4	23	9	10	5	1	3	18	26	23	24		7
<i>F. necrophorum</i>			2						3		13	9		
<i>F. mortiferum/varium</i>	1							1	2		8		1	5
他の <i>Fusobacterium</i> sp.	2		2				1		3	5	1	3	1	2
<i>P. asaccharolytica</i>		1	3				2	2	12		2	5		1
<i>P. gingivalis</i>			2	3							14	10		1
<i>P. levii-like organisms</i>			2		1				12	2		1		
<i>Porphyromonas</i> sp.			1					2	6	2	9	3		
<i>P. melaninogenica/denticola</i>	1	1	7	1	3	2			12	10				
<i>P. intermedia-nigrescens-palens</i>	1	1	23	5	9	3	1		9	9	15	8		
<i>P. loescheii, P. corporis</i>			7	1	3	1			7	10		1		
<i>P. bivia/disiens</i>			5		2		1	2	15	3	2	2		1
<i>P. oralis</i> group			2		2	1			3	3	3	3		
<i>P. oris/buccae</i>			29		5	1	1		10	7	2	6	2	2
<i>Prevotella</i> sp.	1		9	5	1	2	4	1	22	8				3
<i>Desulfomonas/Desulfovibrio</i>											7	6		2
<i>Sutterella wadsworthensis</i>							1		2	1	17	19		
<i>Veillonella</i> sp.	2		15		2	7			11	16	1	5	1	2
Other Gram-negative cocci							2		1					2

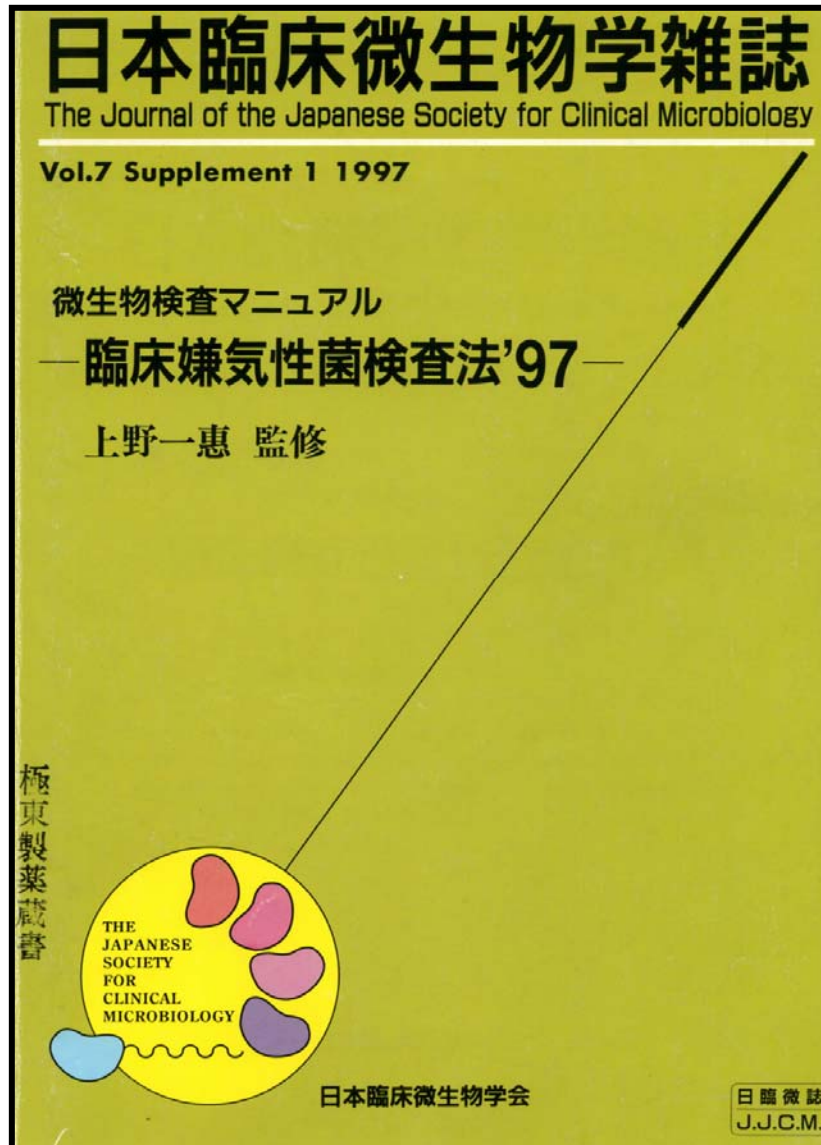
種々の感染に見られるグラム陽性の嫌気性菌

WADSWORTH-KTL Anaerobic Bacteriology Manual(6'th Ed.)

Incidence of specific anaerobes in various infections(Wadworth VA Medical Center experience 1991-1997)より

	血液	中枢神経系	頭頸部	歯科	TTA、 胸膜	肺	肛門膿瘍	褥瘡	皮膚軟部・ 骨(waist↓)	皮膚軟部・ 骨(waist↑)	虫垂	腹水	膀胱	他の 腹部
検体数(前表に同じ)	不明	103	225	8	651	128	17	22	777	327	183	不明	155	165
菌検出検体数(前表に同じ)	83	16	123	8	48	28	15	16	241	98	133	170	17	46
<i>Gemella morbillorum</i>			7			1			1	2	13	2		2
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>					1			1	13	3	22	12		2
<i>P. asaccharolyticus</i>	1		6				2	6	26	4	1	2		
<i>F. magna</i>	1		13		1		3	3	64	8	2	1		1
<i>M. micros</i>	1	1	16	2	8		3	3	13	21	37	24		7
<i>P. prevotii/tetradius</i>	1		8				1	6	41	7	1	1		
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1		1		1		3	2	12	3	3	1		1
Anaerobic <i>Streptococcus</i> spp.		2	13		3				10	8	8	4	1	4
<i>Staphylococcus asaccharolyticus</i>			2		2				2	1		1		1
<i>Clostridium perfringens</i>	16								5	3	1	4	1	1
他の <i>Clostridium</i> spp.	13		2		1		4		15	10	36	41	1	12
<i>Actinomyces</i> spp.		1	19		4		1		21	15	10	4		5
<i>Bifidobacterium</i> spp.			7						2	1	1	4		1
<i>Eggerthella lenta</i>	1		1		1					2	21	12		2
<i>Eubacterium</i> spp.	2		3						5	1	11	6		2
<i>Lactobacillus</i> spp.	1		11	2	4				9	9	19	10		6
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	8	22		16			1	15	13	5	23	9	4
<i>Propionibacterium</i> spp.	2	1	8		1		1		2	1				
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>					3						6	4		

嫌気性菌検査マニュアル



臨床嫌気性菌検査法' 97

検体のカテゴリー

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

カテゴリーA-1；

採取時に十分注意を払えば、**汚染を避けうるか、極めて少なくすることが可能な検体**。これらは重症感染症の検体であることが多い。

対象となる検体；

- 血液、髄液、中枢神経系感染症由来の無菌的に採取された膿
- 心のう液、心のうまたは心筋の生検組織
- 経皮的肺穿刺吸引液（肺膿瘍）、経皮的胸腔刺吸引液（膿胸）
- 関節液、骨髄
- 手術時に採取された検体（肺、中枢神経系、心、胸膜、骨・関節、軟部組織）
- 各種生検材料

検体のカテゴリー

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

カテゴリーA-2；

採取時に常在菌による汚染防止対策を十分に講じても、**常在菌の混入が避けがたいが、嫌気培養の価値が高い検体**。これらの検体からは分離菌種数が相当多い場合があるので重症例からの分離菌以外は同定を簡略化しても良い。

対象となる検体；

- 経皮的気管吸引物（Transtracheal aspiration; TTAによる吸引物）
- 常在菌の混入を防止する目的のプロテクテッドブラシによる気管支鏡検査で採取した検体（定量培養が必要）
- 腹腔鏡を用いて採取した骨盤腔吸引液、カテーテルによる子宮吸引物
- 軟部組織からの穿刺吸引物（ガス壊疽など）
- ろう孔深部から採取した吸引物、開放創の周辺の皮膚を消毒し、深部から採取した穿刺吸引物
- 膀胱穿刺尿

検体のカテゴリー

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

カテゴリーA-3；

口腔内あるいは下部消化管の破綻が原因となった感染症由来の、偏性嫌気性菌を主体とした極めて多菌種の細菌が存在している検体。偏性嫌気性菌だけで10種以上が分離される頻度が極めて高く、同定の簡略化を行わなければルーチン検査では処理できない。集落の形態などにより推定同定が比較的容易にできる嫌気性菌選択培地を追加使用し詳細な同定は必要なものに限定する方針が望まれる。

対象となる検体；

- 口腔・耳鼻咽喉部の膿瘍からの穿刺吸引液
- 腹水、腹腔からの穿刺液
- 手術時のスワブ材料、胆汁、T-チューブ由来材料、ドレナージ液
- 骨盤内膿瘍からの穿刺液

検体のカテゴリー

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

カテゴリーB；

常在菌による汚染が避けられず、分離菌の病原的意義の解釈が極めて困難な検体。ルーチンには嫌気性菌検査をすべきでないが、対象菌が特定されている場合、あるいは感染症に関心の高い主治医からの強い要望がある場合には嫌気培養を行う。国際的観点から、これらの材料から分離された偏性嫌気性菌をカテゴリーAからの嫌気性菌と同様に扱ってはならない。安易にカテゴリーAと同様の扱いで学会発表、学術論文投稿などを行うと問題になることが多い。

対象となる検体；

- 咽頭・鼻咽頭および歯肉スワブ
- 創部・潰瘍部の表面をスワブで拭ったもの
- 膣・頸管スワブ、排せつ尿・カテーテル尿、喀痰
- 腸管内容物（吸収不良症候群の場合を除く）
- 避妊用リング(IUD)

嫌気性菌検査に必要な患者情報

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

- ・ 患者氏名
- ・ 年齢
- ・ 疾患名
- ・ 基礎疾患
- ・ 症状
- ・ 検査所見
- ・ 抗菌薬使用の有無
(種類)
- ・ 検体の種類
- ・ 採取部位
- ・ 検体の採取法
- ・ 採取時間
- ・ 嫌気性菌検査を
依頼する理由
- ・ 目的とする(推定)
嫌気性菌

材料の採取法、採取医療と検査開始までの許容時間

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

材料の種類と採取量	許容時間
吸引材料	
滅菌試験管に入れた場合	
ごく少量 (1ml未満)	10分以内
少量 (1ml)	30分以内
大量 (2ml以上)	2～3時間以内
嫌気性容器に入れた場合	
ごく少量	30分以内
1ml以上	2～3時間以内
組織、生検材料	
滅菌容器に入れた場合	30分以内
滅菌容器に入れて嫌気性バッグに入れた場合	
または嫌気性容器に入れた場合	1～3時間以内
スワブで採取した材料	
嫌気性輸送容器(乾燥防止が可能な)に入れた場合	1時間以内
嫌気性輸送培地を使用した場合	2～3時間以内

検体の採取に際しての注意事項

(日本臨床微生物学会編：臨床嫌気性菌検査法'97より)

- (1)常在菌叢の混入を避けるために、注射器、カテーテルによる採取を原則とし、スワブによる採取は、下記の理由から**極力避ける**。
 - a.検体の**採取量が少ない**。(0.1ml 以下)
 - b.常在菌叢による**汚染の可能性が高い**。
 - c.**乾燥しやすい**。
 - d.**コットンファイバーに細菌が粘着する**。
 - e.スワブを直接塗布した**グラム染色標本の質が悪い**。
- (2)採取した検体を出来るかぎり、**空気に曝さない**。
- (3)**採取時間を記録する**。

The Current Clinical Technologist Vol. 3, No.4 1998 より

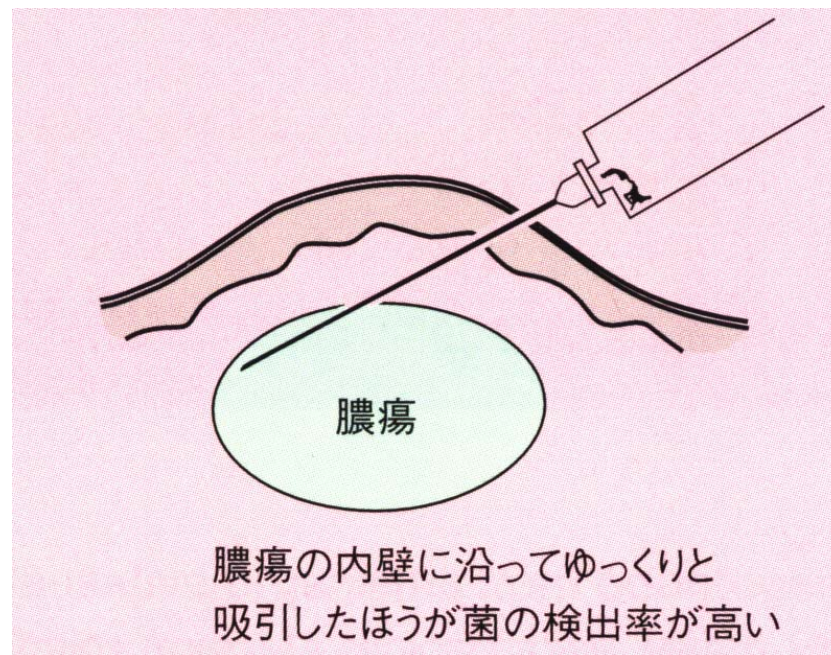
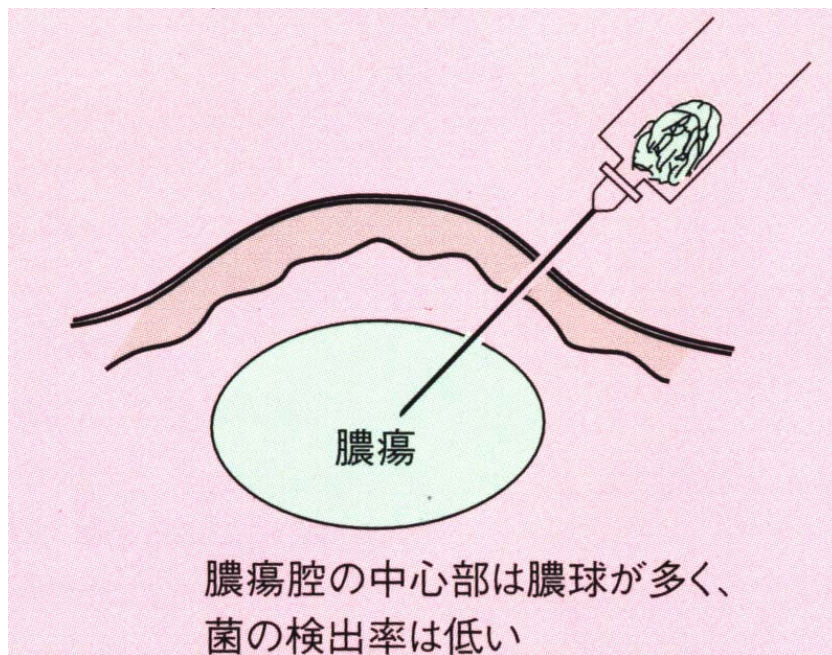
検査結果を いかに読むか

歯科・口腔外科領域の検体

Identification from Odontogenic Bacterial Infections

東海大学医学部 口腔外科学教室
佐々木 次郎, 金子 明寛

Jiro Sasaki, Akihiro Kaneko



検査開始時の留意事項

- 混在が予想される好気性菌はなにか。
- 初代培養時に必要な平板培地（選択培地）はなにか。
- 想定される菌種は、最低限、どの程度の培養時間が必要か。
- 増菌培養の必要性はないか。



検体の前処理と培地への接種

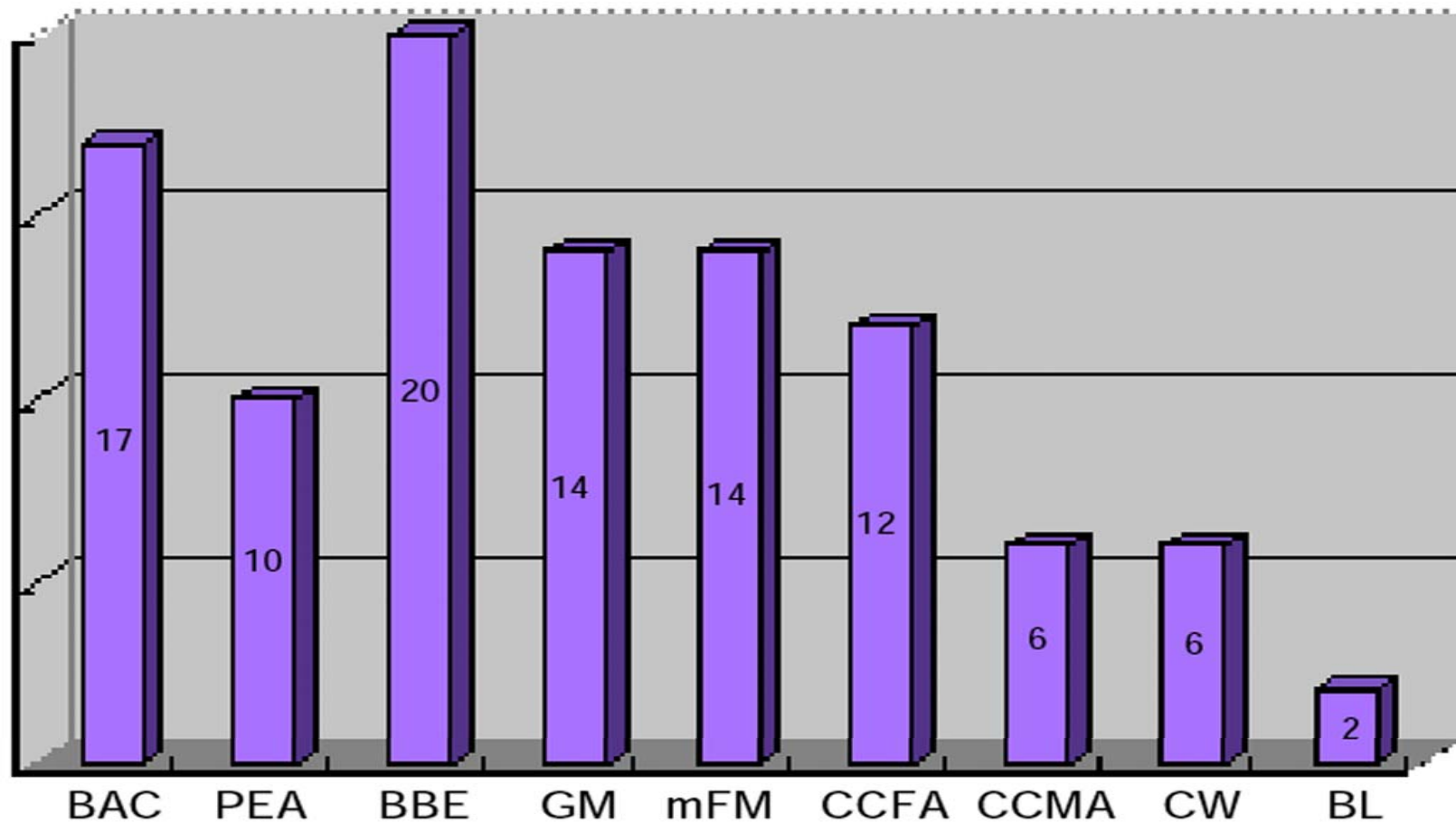
- 吸引物；Vortex で均質化後、パスツールピペットで平板には1滴(非化膿性の場合は2~3滴)ずつ、HK 半流動培地には底部から接種する。(0.5~1mL)
- スワブ；2本採取してある場合は1本を塗抹標本用とし、もう1本を0.5~1 ml の還元された液体培地で十分に洗い出し管壁でスワブを搾り出す。この液を吸引物と同様に接種する。
- 組織・骨片；還元された液体培地 1 ml とともに滅菌ホモジナイザーに入れ、懸濁液とする。
- 接種前の均質化が必須。スポイト様の短いものは不可
- 平板・半流動培地へのスワブでの接種は不可。
- 何れも嫌気チャンバー内での操作が望ましいが、大気中で行う場合、極力手早くする。

供給側から見た選択培地併用の現状

- 非選択培地単独が多いが、併用でも PEA-BHK、あるいは BBE が多く、時に選択培地のみ(!)が使用されている例もある。
- PEA-BHK は好気性 GNB に混在する GPB、GPC の選択に適するが GNB の一部が抑制される点に対する配慮は？
- BBE は *B. fragilis* group、*Bilophila wadsworthia*、*Fusobacterium* spp. の一部など、20%胆汁耐性菌に適応であるが、使用する検体種類は妥当か？
- 嫌気培養加算の変遷(110⇒～65⇒70⇒80)にもかかわらず、分離培養よりも、同定にコストを投入する傾向は変わらない。

国内における選択培地

('92 九州地区施設% n=65) *

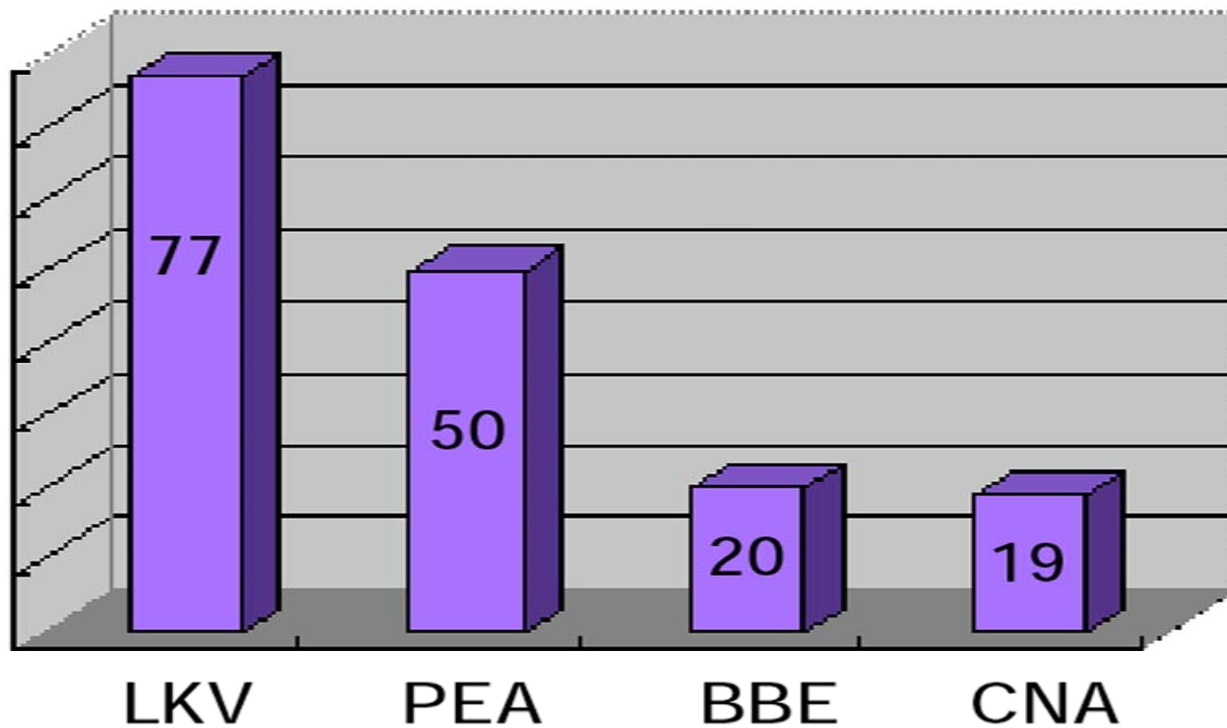


* ; 第7回九州地区卒後教育セミナーテキスト、'92

国外における選択培地

Use of Selective media

(% of laboratories using medium, n=79)



Goldstein et al. 1992

本邦での data との差異は？

扁桃周囲膿瘍124例からの分離菌種*

<i>S.pyogenes</i>	56(45.2%)	<i>F.necrophorum</i>	47(37.9%)
<i>S.milleri</i> group	33(26.2%)	<i>P.melaninogenica</i>	47(37.9%)
<i>H.influenzae</i>	13(10.5%)	<i>P.intermedia</i>	40(32.3%)
Viridans streptococci	13(10.5%)	<i>P.micros</i>	34(27.4%)
10株未満の菌種	28株(11菌群)	<i>F.nucleatum</i>	32(25.8%)
		<i>A.odontolyticus</i>	29(23.4%)
		<i>P.oralis</i>	18(14.5%)
		<i>P.loescheii</i>	16(12.9%)
		<i>V.parvula</i>	16(12.9%)
		<i>B.gracilis</i>	11(8.9%)
		<i>E.corrodens</i>	11(8.9%)
		<i>Prevotella</i> spp.	10(8.1%)
		10株未満の菌種	96株(28菌群)

* Jousimies-Somer, 1993

口腔外科領域からの嫌気性菌報告

- 栗山智有、斎木康正、他：口腔外科領域感染症からの嫌気性菌分離率と β -lactamase 活性. 嫌気性菌感染症研究 26:41-45, 1996.
- 材料；金沢大学医学部附属病院歯科口腔外科の顎口腔領域化膿性感染症による閉塞膿瘍を有する患者156名、（過去に切開や穿刺した症例は除外。注射器にて穿刺吸引した材料を嫌気ポーターに注入、4時間以内に培養操作を開始。

栗山らの検出菌種と株数(156検体)

Aerobes	# of isolates
<i>Streptococcus constellatus</i>	61
<i>Streptococcus mitis</i>	24
<i>Streptococcus oralis</i>	23
<i>Streptococcus intermedius</i>	12
<i>Corynebacterium</i> spp.	11
<i>Neisseria</i> spp.	9
<i>Streptococcus sanguis</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
<i>Staphylococcus</i> spp.	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Lactobacillus</i> spp.	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2
<i>Eikenella corrodens</i>	2
<i>Actinomyces israeli</i>	1
<i>Branhamella catarrhalis</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Haemophilus paraphrophilus</i>	1
<i>Haemophilus segnis</i>	1
<i>Haemophilus</i> spp.	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Moraxella osloensis</i>	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	1
<i>Streptococcus mutans</i>	1
Total	185

Anaerobes	# of isolates
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	64
<i>Peptostreptococcus micros</i>	63
<i>Prevotella intermedia</i>	46
<i>Gemella morbillorum</i>	26
<i>Prevotella oralis</i>	25
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	24
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	18
<i>Prevotella buccae</i>	17
<i>Prevotella corporis</i>	17
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	16
<i>Prevotella melaninogenica</i>	14
<i>Prevotella loescheii</i>	13
<i>Prevotella oris</i>	11
<i>Veillonella</i> spp.	10
<i>Bacteroides capillosus</i>	8
<i>Eubacterium lentum</i>	7
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	6
<i>Propionibacterium acnes</i>	6
<i>Bifidobacterium</i> spp.	5
<i>Actinomyces meyeri</i>	3
<i>Campylobacter rectus</i>	3
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	3
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	2
<i>Fusobacterium varium</i>	2
Unidentified GNB	2
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1
<i>Mobiluncus</i> sp.	1
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	1
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1
<i>Prevotella denticola</i>	1
<i>Propionibacterium propionicum</i>	1
Total	417

S. intermedius と *P. gingivalis* の混在

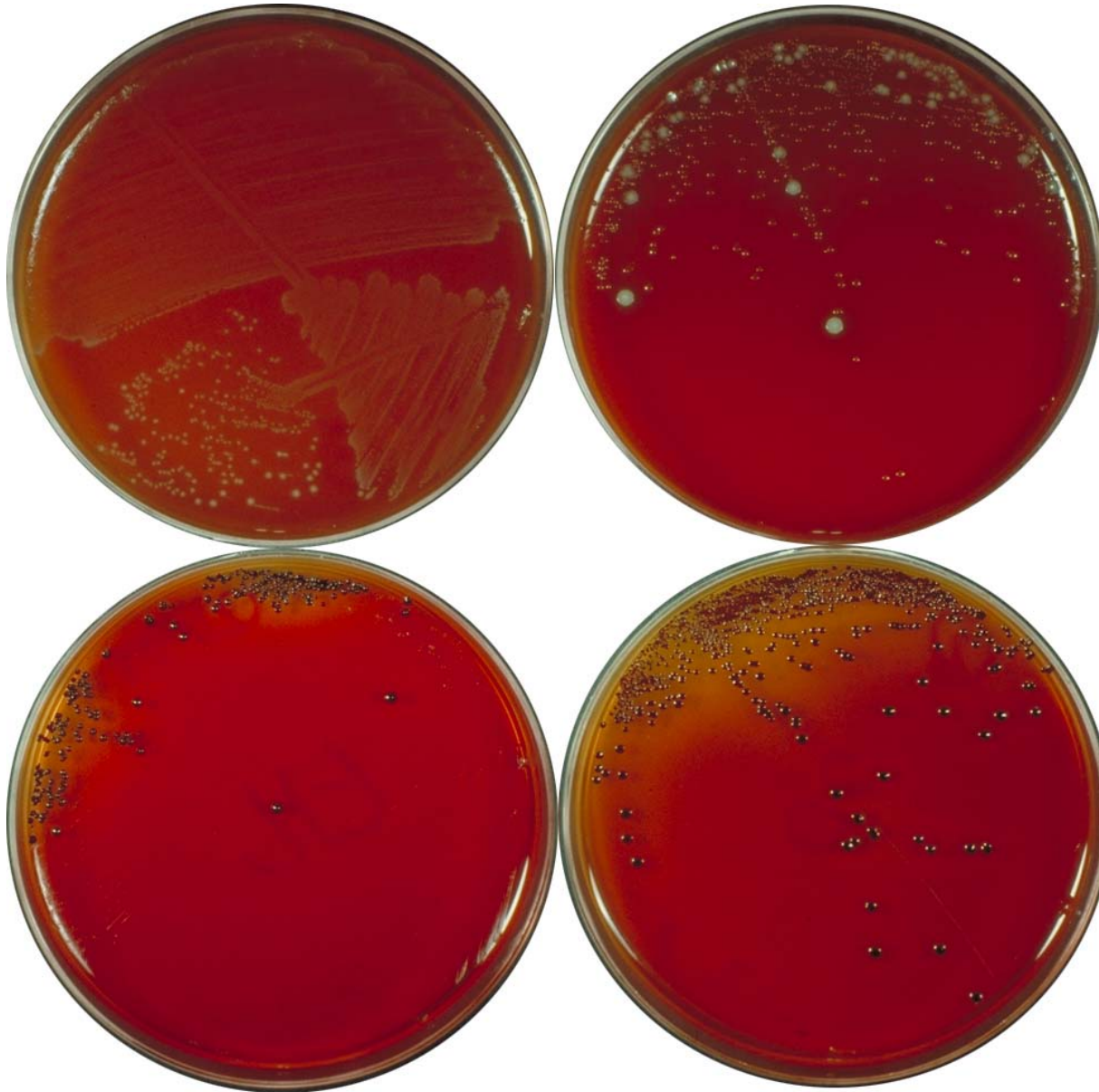
江成 博、他(1992):嫌気性無芽胞グラム陰性桿菌と*Streptococcus sp.*の混在する材料を想定した分離培養に関する実験的検討. 嫌気性菌感染症研究, 22: 74-83.

Table 2. *Porphyromonas gingivalis*/*Streptococcus intermedius*

GNR:GPC Ratio	Direct Inoculation						After Enrichment culture					
	BHK-RS			PV-BHK			BHK-RS			PV-BHK		
	Streaking Zone #			Streaking Zone #			Streaking Zone #			Streaking Zone #		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
99:1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9:1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1:1	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
1:9	-	-	-	+	+	3	-	-	-	+	+	-
1:99	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

*: difficult to pick up

P. gingivalis / *S. intermedius* の混合接種



- 上の2枚は BHK-RS、
下の2枚は PV-BHK

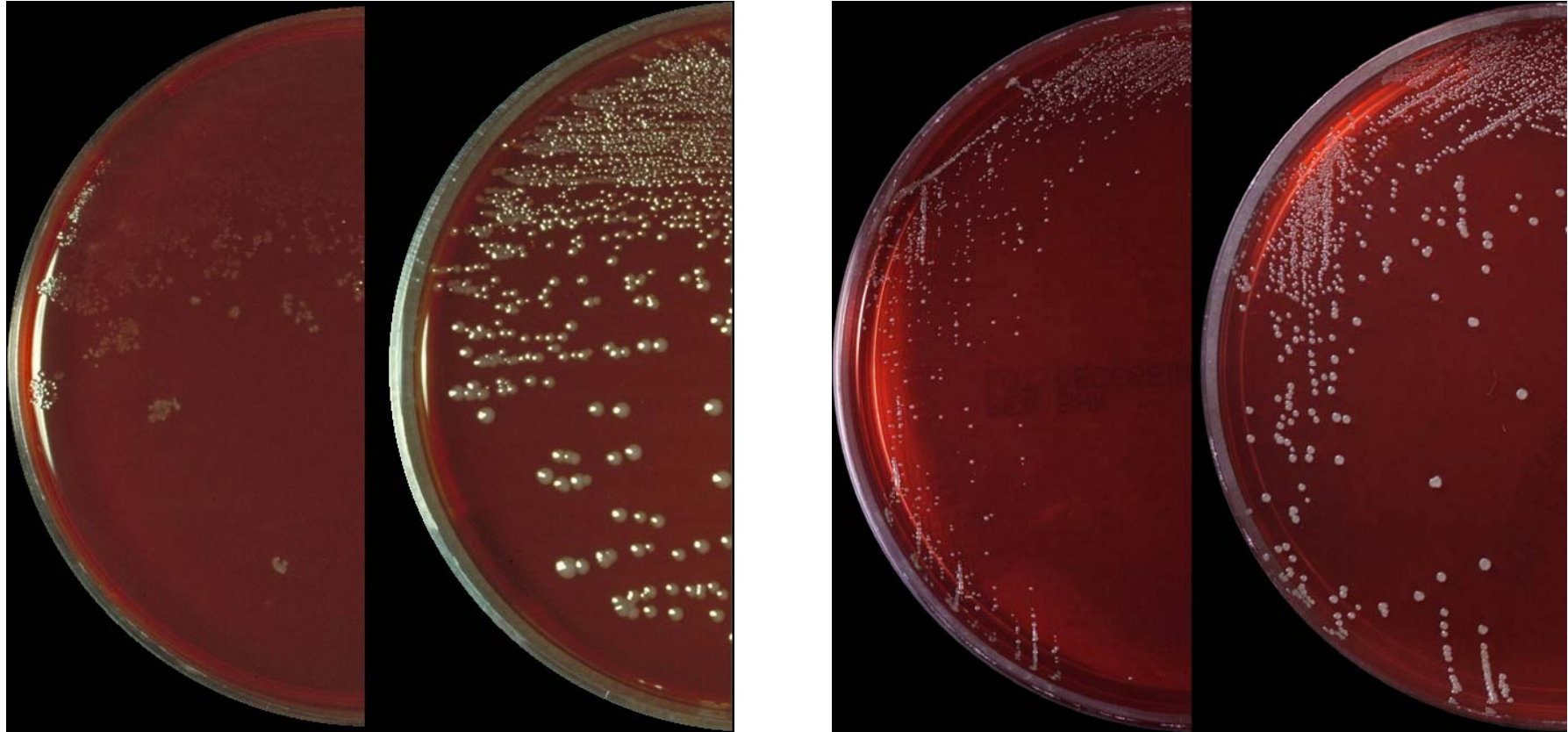
- 左側は増菌後、右側は
直接接種時であり、増
菌後の非選択培地では
P. gingivalis は釣菌
不能

BHK-RS と PV-BHK



- 口腔の拭い取り材料を非選択培地である BHK-RS (左) と嫌気性グラム陰性菌選択培地である PV-BHK に接種・培養 (要介護者の口腔ケア前の材料を定量接種)
- BHK-RS の密集部には黒色集落形成菌は殆ど見られない。
- PV-BHK 上に発育した集落は、その殆どが嫌気性グラム陰性桿菌であった

PEA-BHK と PV-BHK の特徴



- BHK-R と PEA-BHK に *P. mirabilis*、*Peptostreptococcus anaerobius* を混合接種（左）
- PEA-BHK と PV-BHK に接種した *Fusobacterium nucleatum*（右）

PV-BHK と BBE の相違点

菌 種 (菌 群)	PV- BHK	BBE	備 考
<i>B. fragilis</i> group	発 育	発 育	
<i>Bilophila wadsworthia</i>	発 育	発 育	BBE>PV-BHK
<i>Prevotella/Porphyromonas</i> spp.	発 育 (抑制)	非発育	<i>Streptococcus</i> spp.の 共存下で抑制
<i>F. mortiferum/varium</i>	発 育	発 育	
<i>F. necrophorum/nucleatum</i>	発 育	非発育	<i>Streptococcus</i> spp.の 共存下で抑制

菌種同定の Level 別

- Level 1 の同定；同定キットを使用しないで同定する。Level 1a と Level 1b に分ける。いずれも初代培養所見、塗抹などの基本的性状の観察を行うが、**Level 1b** では釣菌集落について 2 日程度で判定できる追加試験を行う。
- Level 2 の同定；いわゆる**簡易同定キット**を用いて同定する方法である。前項の Level 1a から行う場合を Level 2a、Level 1b を併用する場合を Level 2b とする。
- Level 3 の同定；**Level 2b** に加え、**GLC** により代謝産物の分析を併用する方法。

レベル1aの同定で報告の際に使用する細菌名

Clostridium perfringens

Clostridium sp.

(*Clostridium speticum*, *Clostridium tetani*)

Propionibacterium acnes

Actinomyces israelii group (*Actinomyces israelii* / *Propionibacterium propionicus*)

嫌気性無芽胞グラム陽性桿菌

Peptostreptococcus anaerobius

Peptostreptococcus spp.

*Streptococcus**

***Bacteroides fragilis* group**

a) ***Bacteroides vulgatus***

b) その他の***Bacteroides fragilis* group**

Fusobacterium mortiferum* / *varium

Bilophila wadsworthia

Pigmented *Prevotella* / *Porphyromonas*

***Bacteroides ureolyticus* group**

Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium necrophorum

偏性嫌気性グラム陰性桿菌

***Veillonella* sp.**

偏性嫌気性グラム陰性球菌

赤字はβ-lactamase 産生菌種, 菌株を含む。

偏性嫌気性菌の嫌気血液寒天培地で
見られる**集落の特徴**と**グラム染色所見**
の特徴により判別

臨床嫌気性菌検査法'97

【概略】

推定同定を正確に実施するために、主要な偏性嫌気性菌の嫌気血液寒天培地でみられる集落の特徴とグラム染色所見の特徴をつかんでおく必要がある。

【培地試薬または試験法】

1. 嫌気血液寒天培地；継代培養と同培地を用いた耐気性試験
2. 嫌気血液寒天培地またはチョコレート寒天培地；耐気試験のため
3. BBE寒天培地；胆汁に対する耐性の試験
4. 嫌気血液寒天培地；逆CAMP試験(*Streptococcus agalactiae*を準備)による*Clostridium perfringens*の同定または卵黄寒天培地；リパーゼ, レシチナーゼ試験による*Clostridium*の同定
5. 15%過酸化水素水；カタラーゼ試験
6. スポットインドール試薬；インドール試験
7. メトロニダゾールディスク(5 μ g)；*Peptostreptococcus* と *Streptococcus* の鑑別
8. SPSディスク(1000 μ g)；*P. anaerobius*の同定
9. 硝酸塩ディスク；硝酸塩還元試験
10. 純アルコール；芽胞の確認
11. 紫外線照射箱；嫌気血液寒天培地上のPigmented *Prevotella* / *Porphyromonas*の赤レンガ色の蛍光, および*Fusobacterium necrophorum*の黄緑色の蛍光などの確認

レベル**1b**の同定で報告の際に使用する細菌名

Peptostreptococcus anaerobius

Peptostreptococcus spp.

Streptococcus spp.

Clostridium perfringens

Clostridium speticum

Clostridium tetani

***Clostridium* spp.**

Propionibacterium acnes

偏性嫌気性無芽胞グラム陽性桿菌(蜘蛛状微小集落)

Veillonella sp.

偏性嫌気性グラム陰性球菌

Bacteroides ureolyticus group

(*Bacteroides fragilis* group, *Campylobacter gracilis*, *Sutterella wadsworthensis* など)

Bilophila wadsworthia

色素産生*Prevotella* / *Porphyromonas* (*porphyromonas gingivalis*)

Fusobacterium nucleatum

Fusobacterium necrophorum

Fusobacterium mortiferum* / *varium

Fusobacterium spp.

Bacteroides vulgatus

***Bacteroides fragilis* group**

色素非産生嫌気性グラム陰性桿菌 (色素非産生*Prevotella* spp. など)

***Clostridium* spp. (*C. clostridiforme*, *C. ramosum*, *C. symbiosum* など)**

偏性嫌気性菌(未同定)

赤字はβ-lactamase 産生菌種, 菌株を含む。

臨床嫌気性菌検査法'97

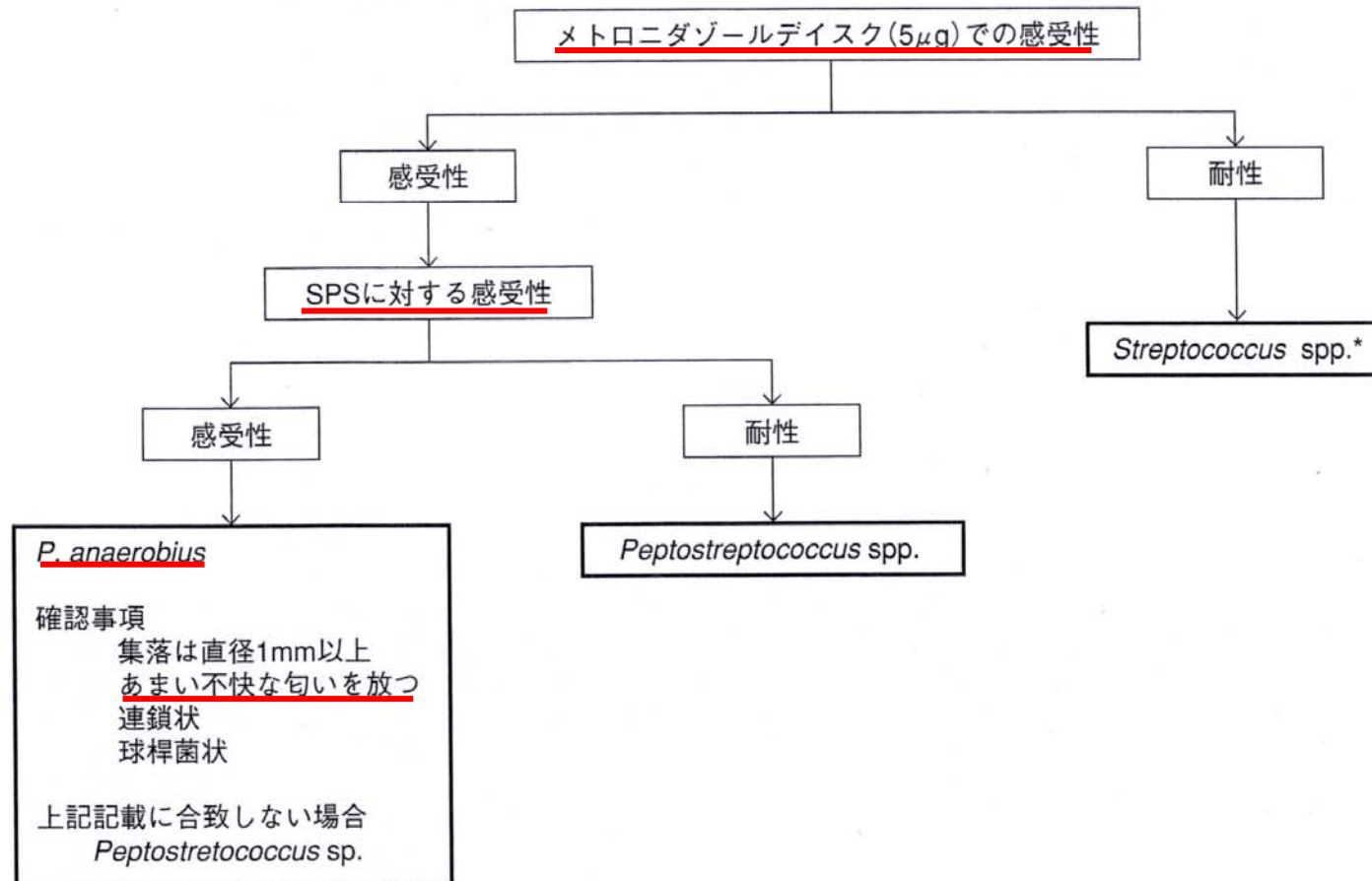
【概略】

バクテロイデス培地, 変法FM培地, BBE培地を組み合わせ偏性嫌気性グラム陰性桿菌をグループ分けして同定を進める。同定用キットの使用は考えない。

【培地試薬または試験法】

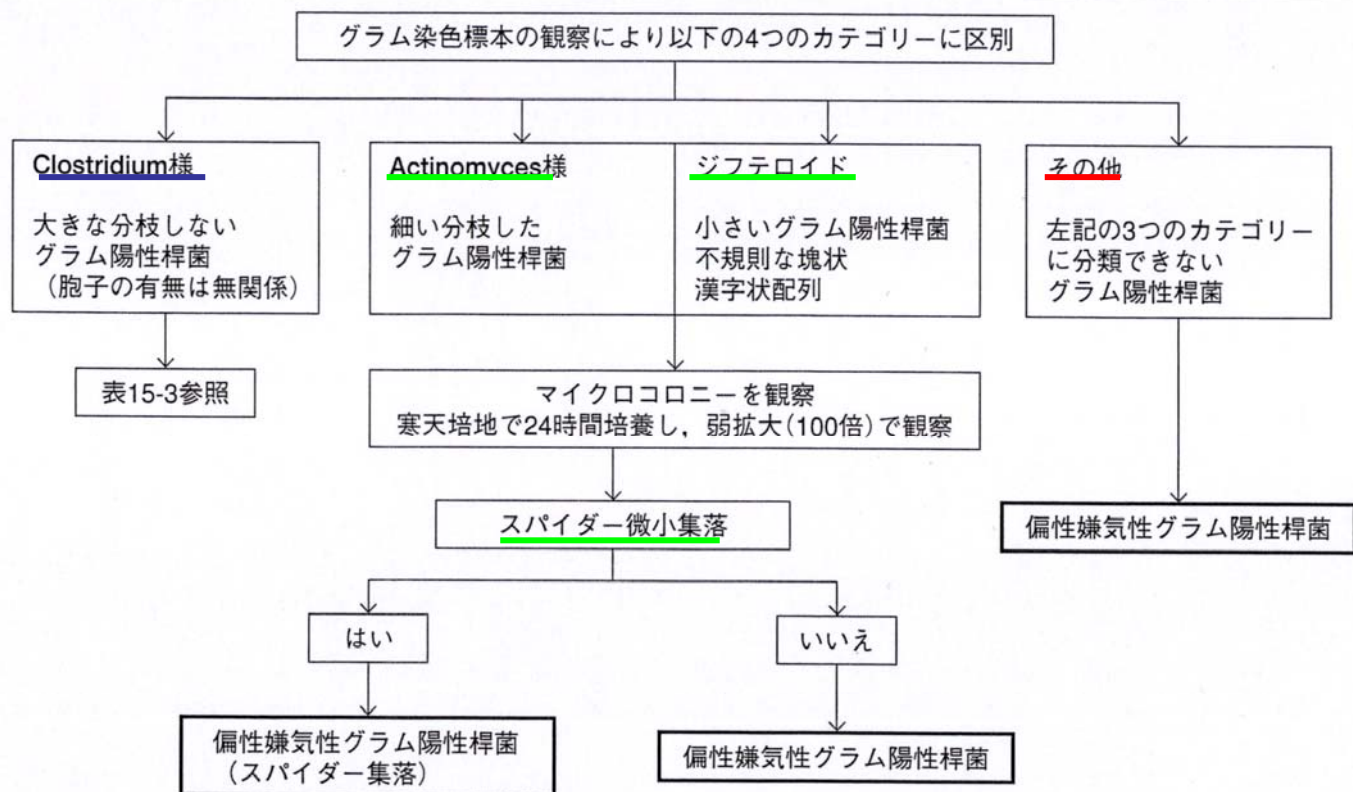
1. 嫌気血液寒天培地；継代培養と同培地を用いた耐気性試験
2. メトロニダゾールディスク(5 μ g)；*Peptostreptococcus* と *Streptococcus* の鑑別
3. バンコマイシンディスク(5 μ g)；耐性感受性の判定, グラム染色性の確認,
Porphyromonas の推定のため
4. SPSディスク(1000 μ g)；*P. anaerobius*の同定
5. 硝酸塩ディスク；硝酸塩還元試験
6. インドール；インドール試験
7. 還元されたバクテロイデス培地, 変法FM培地, BBE培地；発育の有無の確認
8. 卵黄反応；レシチナーゼおよびリパーゼ試験
9. 15%過酸化水素水；カタラーゼ試験
10. 胆汁ディスク；BBE寒天培地は使用できない
11. 追加試験
ウレアーゼ試験, アルカリフォスファターゼ試験, ゼラチン試験, エスクリン加水分解, 各種糖分解試験(ラクトース, セロビオース, シュクロース, サリシン, キシロース, ザイラン, グルコース, マルトース, トレハロース, マルトース, ラムノース, アラビノース)

表15-1 クラス1b 偏性嫌気性グラム陽性球菌の同定



注 *P. micros*がSPS感受性を示すことがある
ただし、集落直径1mm以下で、
不快な臭いのない小球菌である。

表15-2 レベル1b 偏性嫌気性グラム陽性桿菌／球桿菌の推定同定



注

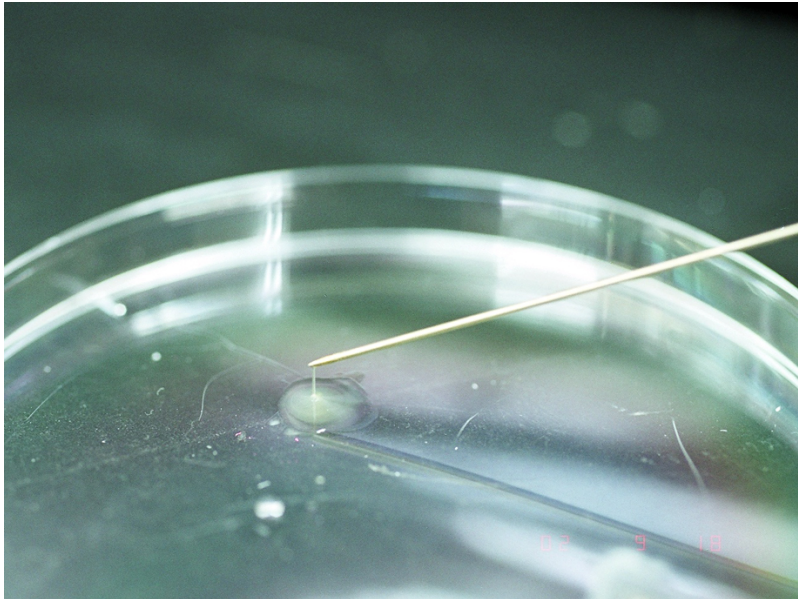
Clostridium spp.の細胞がすべて大きいわけではなく、また*Clostridium* spp.のすべてがグラム陽性に染まるわけではない。そのような菌種はその他のカテゴリーに入る。

グラム陰性に染まる *Clostridium* spp.には *C. clostridioforme*, *C. ramosum*, *C. symbiosum*, *C. innocuum* などがある。

Actinomyces spp.以外の嫌気性グラム陽性桿菌も細かい分枝した形を呈する。また*Actinomyces* spp.が、いつも細かい分枝した形を呈するとは限らない。

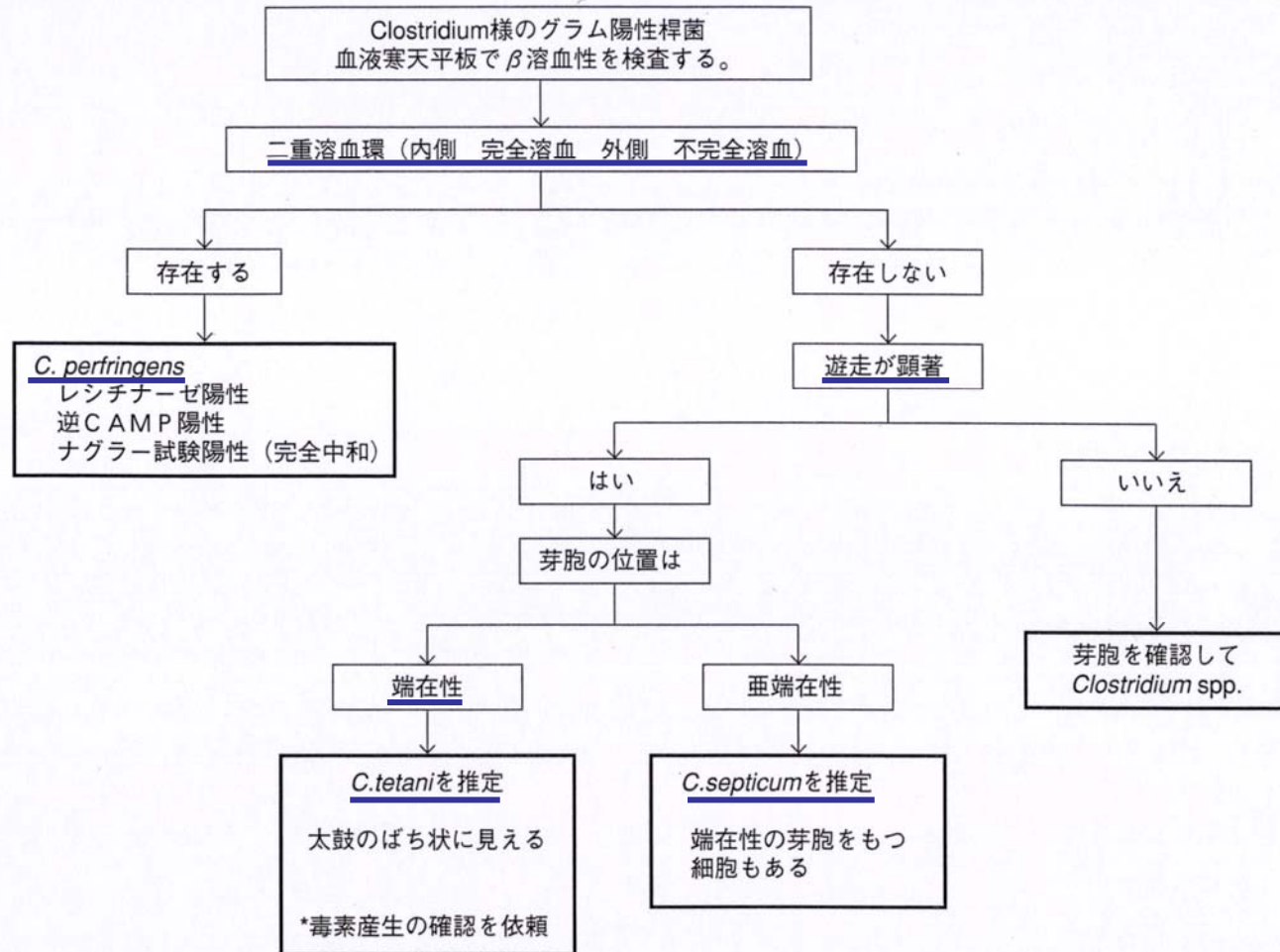
注意：Clostridium-likeとかActinomyces-likeという言葉は検査室内での使用に限る。分離株の最初の作業上のグループ分けに有用であるが、それらはグラム染色所見に基づいた単なる記載上の用語である。

グラム染色性の確認（Ryuの方法）



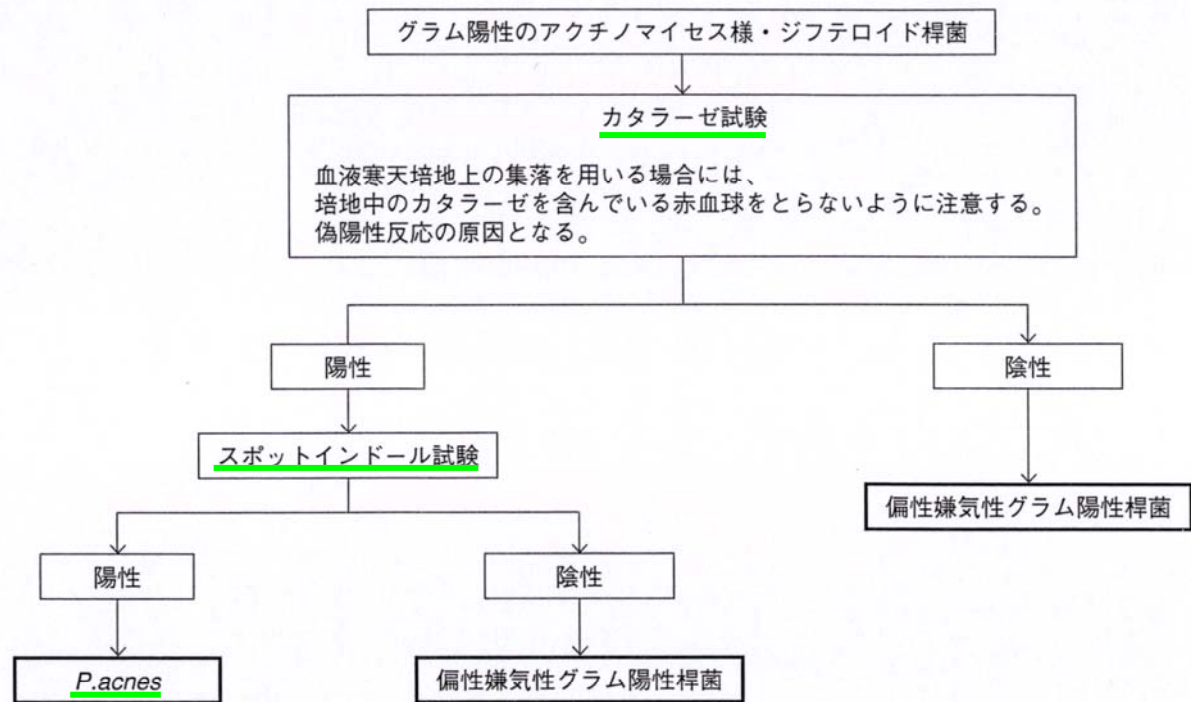
- グラム陰性桿菌の同定に際しては、必ずグラム染色性の確認を行う。
- 補助的方法としてはRyuの方法が良い。

表15-3 レベル1b Clostridium様の偏性嫌気性グラム陽性桿菌の同定

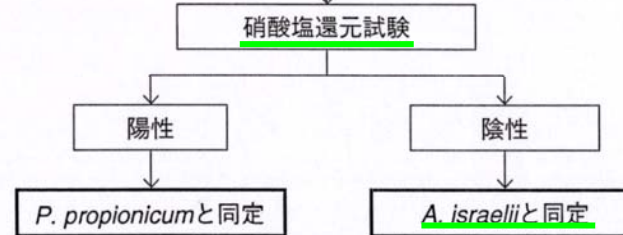


すべてのclostridiaが大きいわけではない。また、すべてのclostridiaがグラム陽性に染まるわけではない。
また、遊走の程度は 培地の水分含量により影響されるので、過度に乾燥した培地は遊走の有無を見るには不適である。

表15-4 レベル1b 偏性嫌気性グラム陽性アクチノマイセス様・ジフテロイドの推定同定

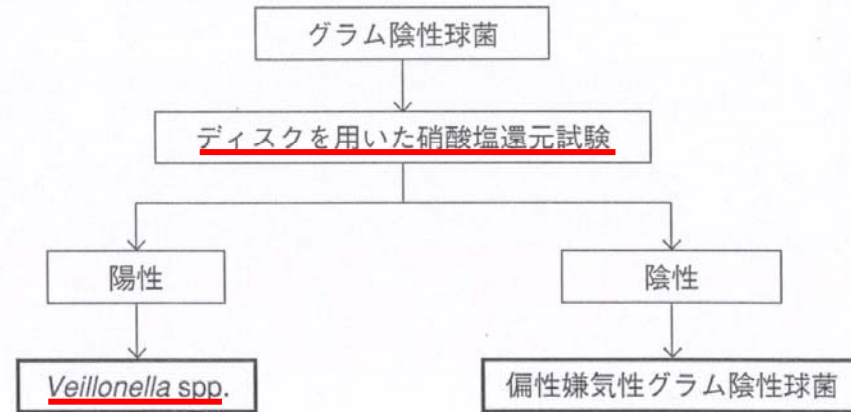


注； マイクロコロニーの観察で蜘蛛様コロニー 発見



それ以外は Actinomyces sp. と同定する。

表15-5 レベル1b 偏性嫌気性グラム陰性球菌の同定



注；赤い蛍光を発すると記載されている書物もあるが、はっきりしない。Veillonella spp.のあるものは硝酸塩還元陰性である。この場合には生化学検査を実施する。少し慣れが必要であるが、Ryuの方法(3%KOH法)で糸引き現象(グラム陰性)を確認できる。

Level 1 での GPC の同定

(*Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella* spp.の記載は学会Manualには無し)

嫌気培養で分離されるグラム陽性球菌の Level 1b での同定

江成 博 極東製薬工業株式会社

Level 1b での細菌名	MNZ (5 μg/disk)	SPS (1mg/disk)	備 考	そ の 他
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	S	S	集落径；1mm 以上、 DEX；+、 甘い不快臭	<i>Peptostreptococcus</i> spp. は BA 上の集落 周囲が褐色化しない点で <i>Streptococcus</i> spp. とは異なる
<i>Peptostreptococcus micros</i>	S	R ^S	集落径；1mm 以下、 DEX；-、 不快臭なし	
その他の <i>Peptostreptococcus</i> sp.	S	R	・	
<i>Streptococcus</i> sp.	R	R	BA 上の集落周囲は多量の乳酸により褐色化する	
<i>Streptococcus parvulus</i>	S	R	<i>Streptococcus</i> spp. のなかで本菌種のみ偏性嫌気性	臨床材料からの分離は少ない
<i>Abiotrophia defectiva</i> 、あるいは <i>Granulicatella</i> sp.*	R	・	システインまたはピリドキサル存在下、あるいは staphylococci などの近傍で発育 本菌群は好気性菌*であり、臨微学会のマニュアルには 記載されていない	耐気性試験には BHK-RS などが望ましい(好気性 菌用の BA は不可) *；HK 半流動培地での所見は嫌気性菌を思わせるため、誤認の可能性あり

*；Penicillin torelant な株が存在する

R^S；SPS disk 周囲に阻止円が見られる株が存在する

・；未確認、または適応なし

Level 1 での GPB、GNC の同定

嫌気培養で分離されるグラム陽性桿菌の Level 1b での同定

江成 博 極東製薬工業株式会社

Level 1b での細菌名	鏡検所見のカテゴリー	二重溶血	顕著な遊走	芽胞の位置	蜘蛛様集落	硝酸塩還元	備考
<i>Clostridium perfringens</i>	Clostridium 様 大きな分岐しない グラム陽性桿菌 (芽胞の有無は無関係)	有	無	・	・	・	逆 CAMP テスト陽性
<i>Clostridium tetani</i>		無	有	端在	・	・	
<i>Clostridium septicum</i>			無	垂端在	・	・	
<i>Clostridium sp.</i>		無	無	芽胞確認要	・	・	
<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinomyces 様、あるいは	・	・	必要に応じて 無芽胞を 確認(Et-OH テスト)	有	陽性 陰性 ・	CAT、IND 陽性
<i>Propionibacterium propionicum</i>	ジフテロイド(細い分岐したグラム陽性桿菌、						左記以外は
<i>Actinomyces israelii</i>	小さいグラム陽性桿菌、不規則な塊状、漢字 状配列)						<i>Actinomyces sp.</i> とする
偏性嫌気性グラム陽性桿菌	その他(上記以外)	<i>Actinomyces</i> 様、あるいはジフテロイドのカテゴリーに入らないもの					

赤字は β -lactamase 産生株が存在

・ ; 未確認、あるいは適応なし

嫌気培養で分離されるグラム陰性球菌の Level 1b での同定

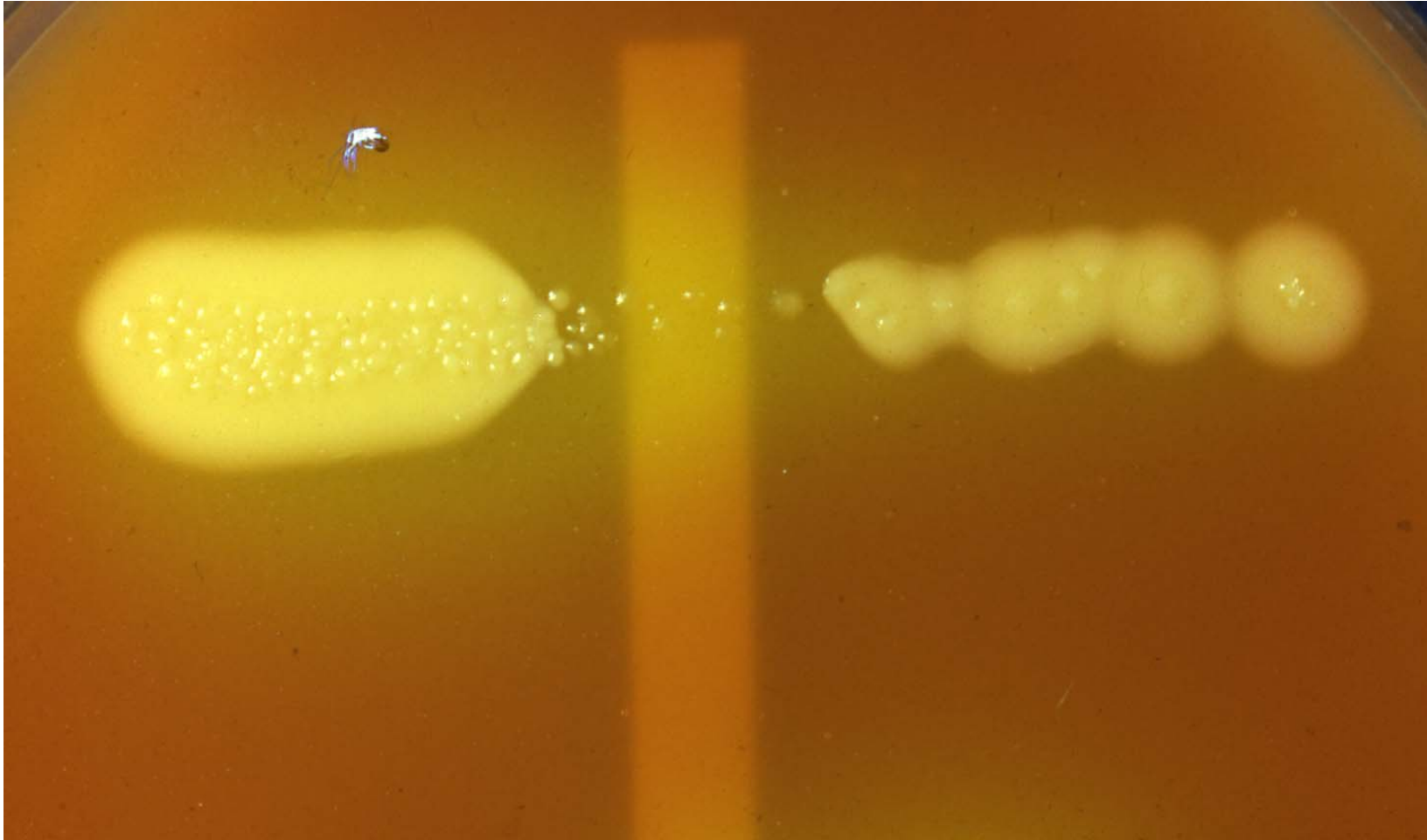
江成 博 極東製薬工業株式会社

Level 1b での細菌名	硝酸塩還元試験(ディスク法)	備考
<i>Veillonella sp.</i>	陽 性	硝酸塩還元陰性の <i>Veillonella sp.</i> も存在 脱色が悪い株は 3%KOH で確認
偏性嫌気性グラム陰性球菌	陰 性	・

赤字は β -lactamase 産生株が存在

・ ; 未確認、あるいは適応なし

抗毒素口紙による *C. perfringens* の同定



Reverse CAMP test(RCT) による *Clostridium perfringens* の鑑別



- ブルセラ HK 寒天培地 (RS) 上に垂直に *Streptococcus agalactiae* (GBS) を画線する。
- 次に直交方向に被検菌株を画線、一夜、嫌気培養する。
- *C. perfringens* は GBS の近傍で三日月型の相乗溶血を示す。(97~96%)^{1), 2)}

- 1) Hansen, M, V., and L. P. Elliott. 1980. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: Reverse CAMP Test. *J. Clin. Microbiol.* 12:617-619.
- 2) Buchanan A. G. 1982. Clinical Laboratory Evaluation of a Reverse CAMP Test for Presumptive Identification of *Clostridium perfringens*. *J. Clin. Microbiol.* 16:761-762.

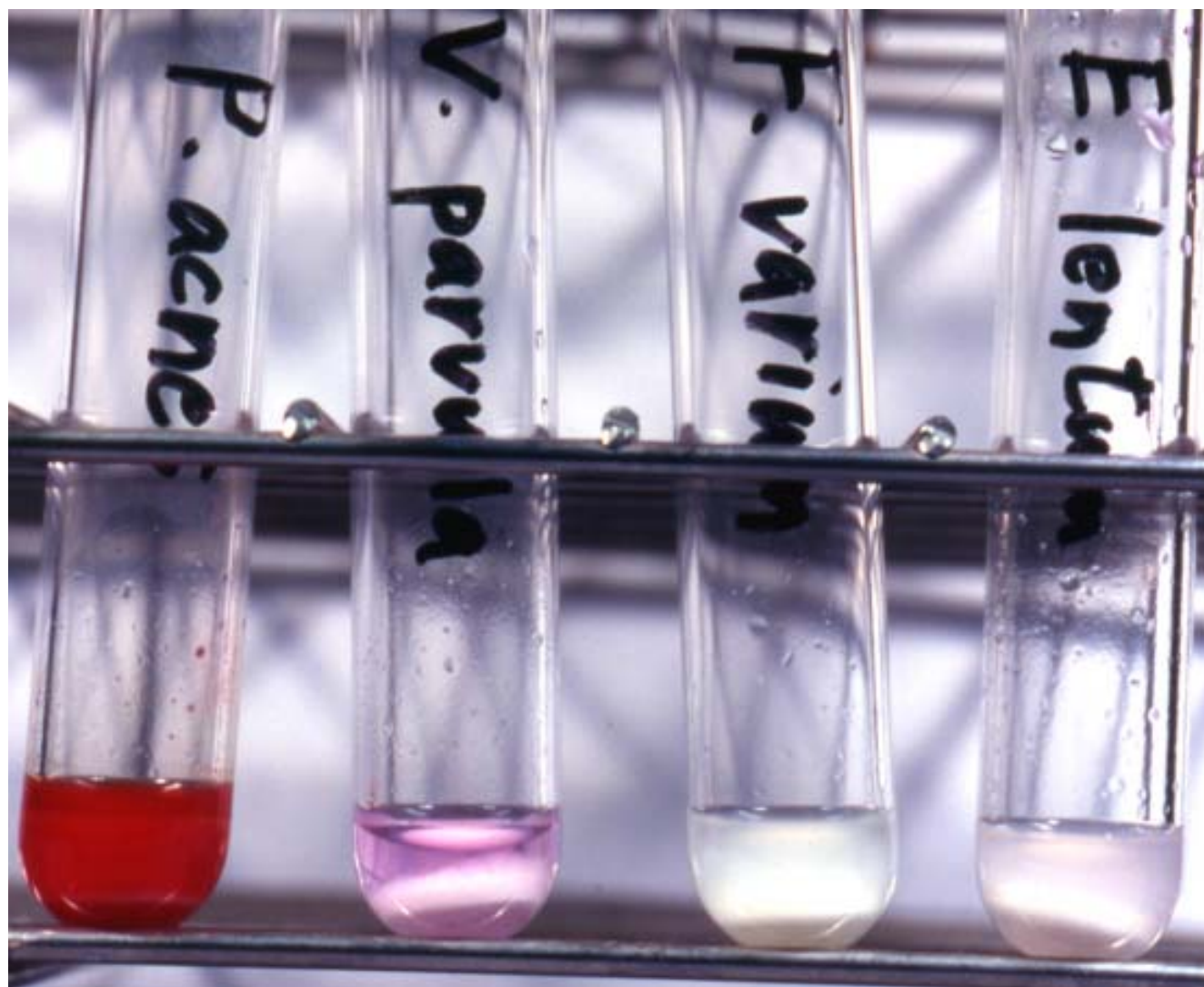
Mobiluncus sp. の CAMP test



- Bacterial vaginosis(BV) に関与すると考えられている。
- BHK-RS 上に垂直方向に画線した *Staphylococcus aureus* の近傍で *Mobiluncus* sp. は相乗溶血を示す。また、この性状を利用して分離培養時に鑑別釣菌が可能である。*

*清水克彦、他：*Mobilucis* 属の分離法に関する実験的検討. 嫌気性菌感染症研究, 18:247-254, 1988.

硝酸塩還元試験



MNZ, SPS 感受性試験

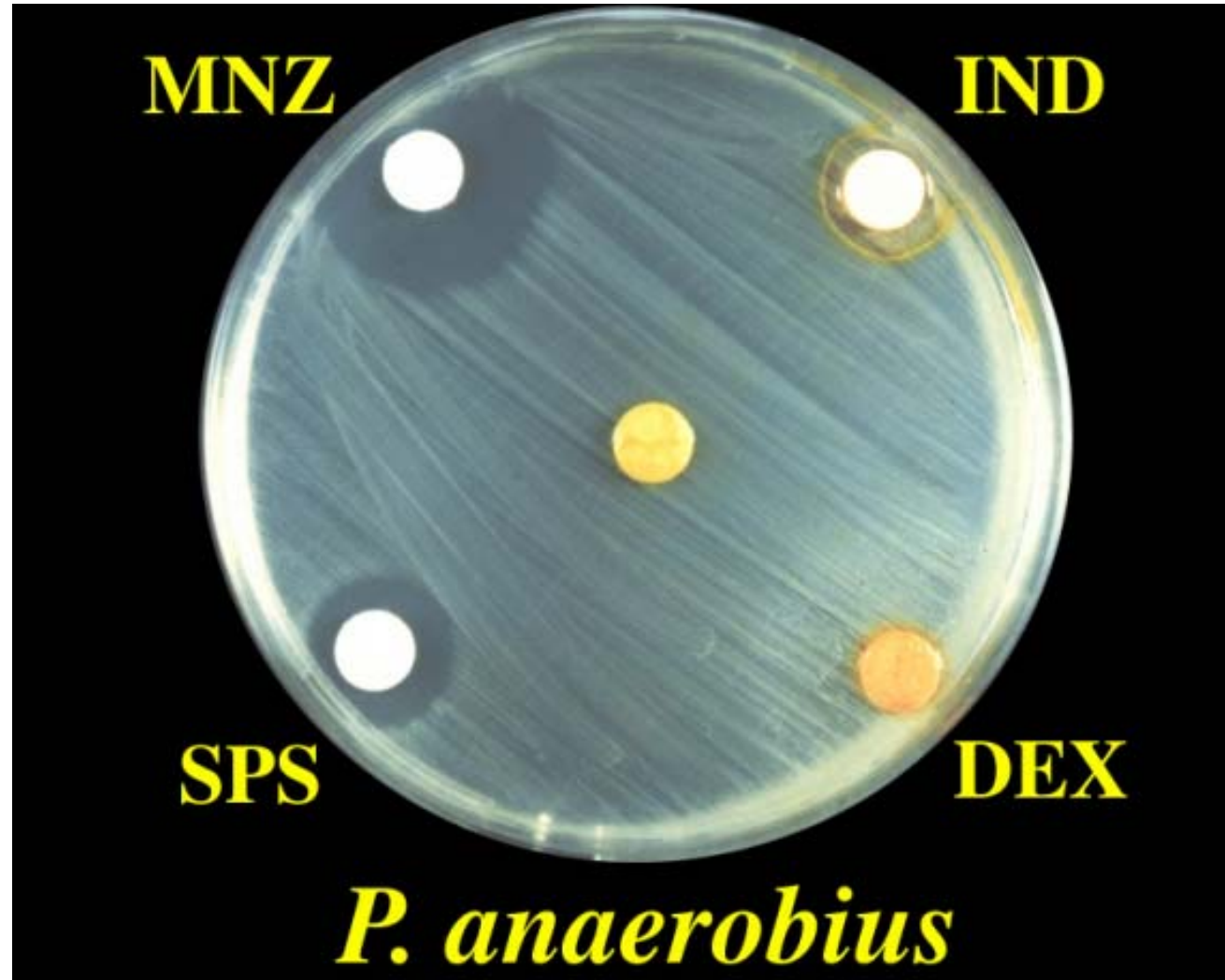
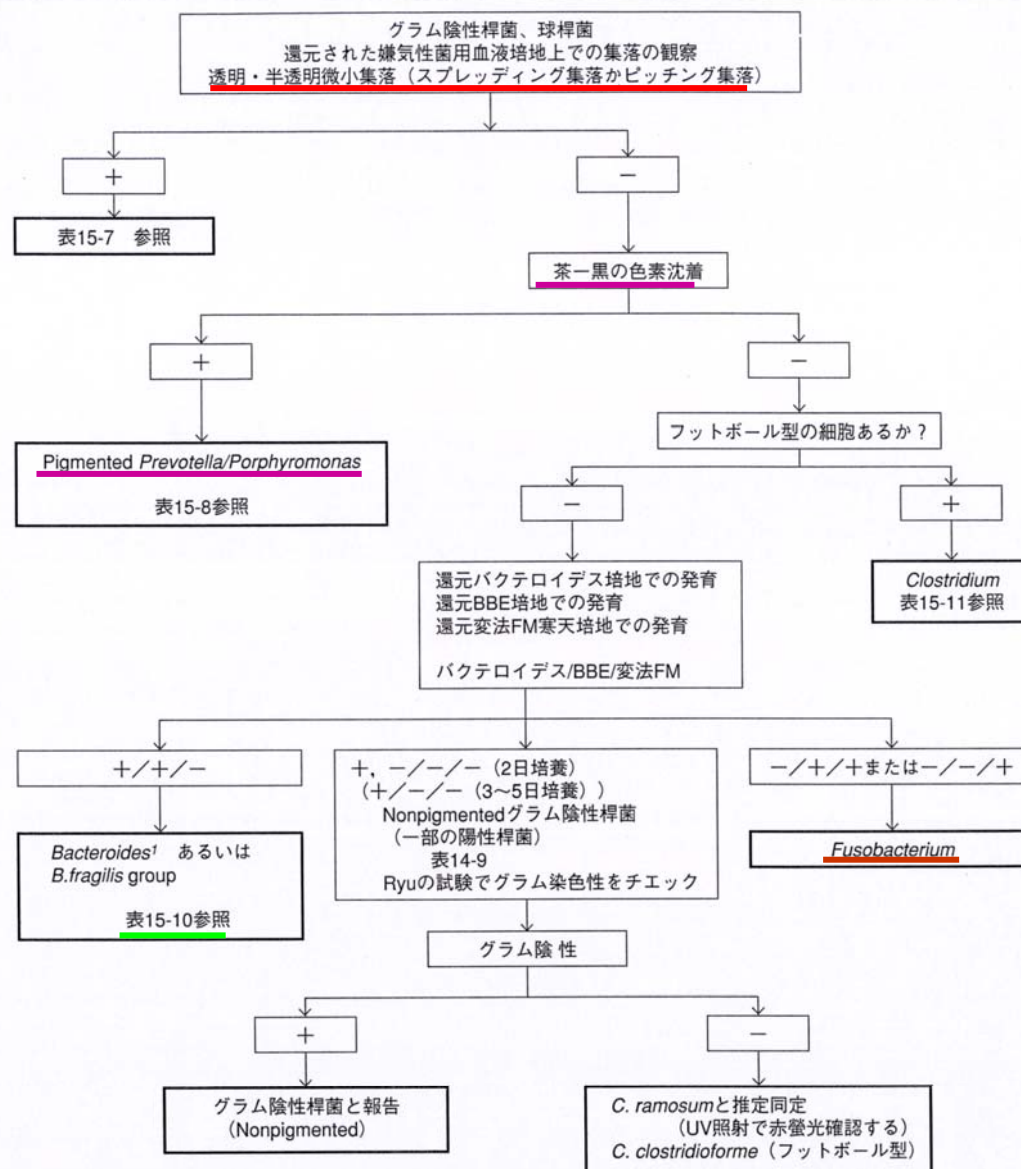
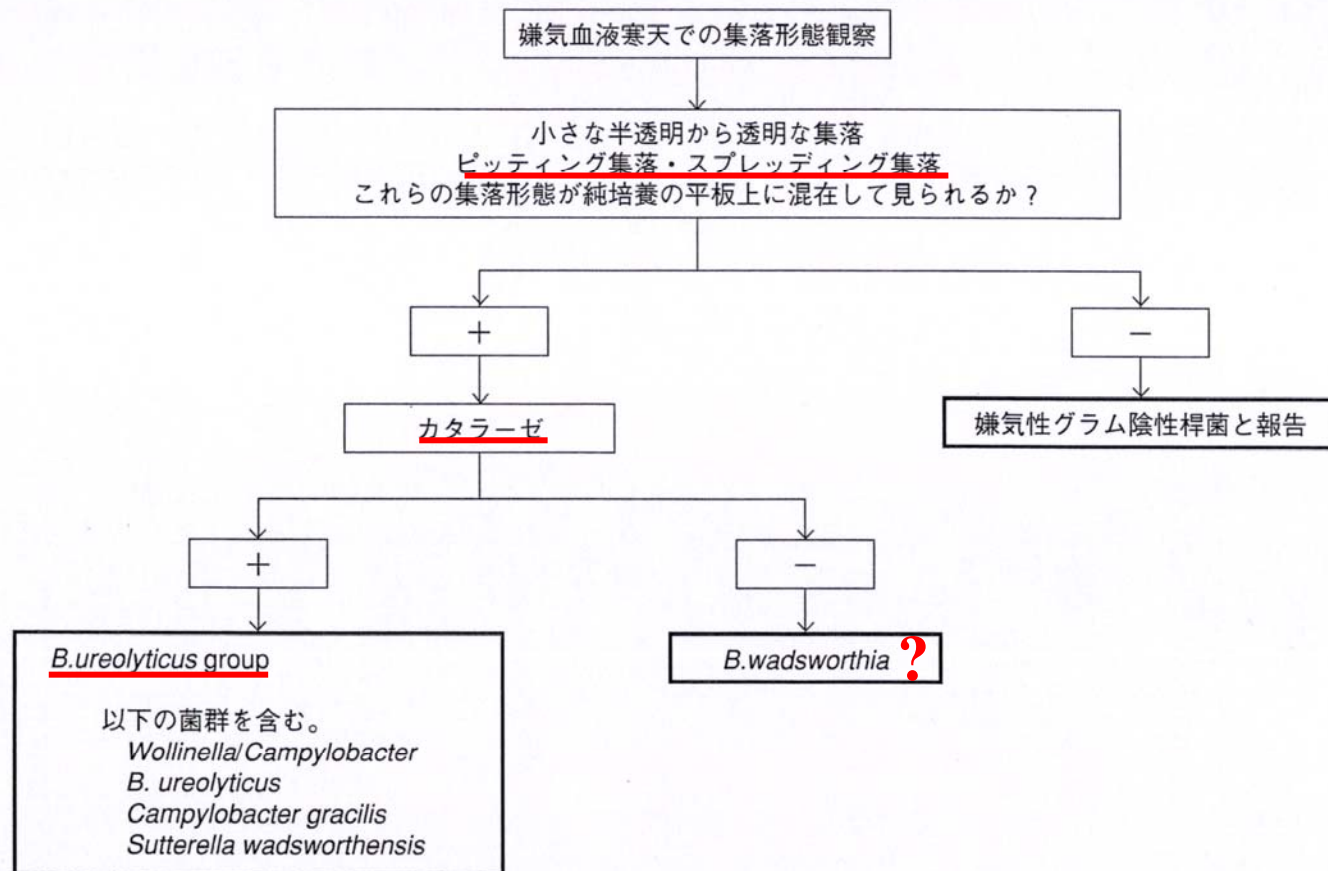


表15-6 レベル1b 偏性嫌気性グラム陰性桿菌/球桿菌の推定同定



注：1；*Bacteroides*とは、*B.fragilis*, *B.thetaiotaomicron*, *B.vulgatus*, *B.ovatus*, *B.uniformis*, *B.eggerthii*, *B.caccae*, *B.stercoris*, *B.distasonis*など新しい分類による*Bacteroides*を言う。

表15-7 レベル1b 嫌気性用血液寒天培地で小さな半透明から透明の集落を生じる嫌気性グラム陰性桿菌/球桿菌(微好気性菌を含む)の推定同定



注； *Wollinella curva* と *W.recta* は *Campylobacter curvus*, *C.rectus*に再分類された。*C.curvus*, *C.rectus*, *B. ureolyticus*, *C.gracilis*, *Sutterella* は、微好気性菌の基準に合致する。炭酸ガス培養では発育しない。これらの菌種は 液体培地中の発育で蟻酸とフマル酸を必要とする。

表15-8 レベル1b 黒色集落を形成する嫌気性グラム陰性桿菌/球桿菌 長波長の紫外線で
蛍光を発する偏性嫌気性グラム陰性桿菌の同定

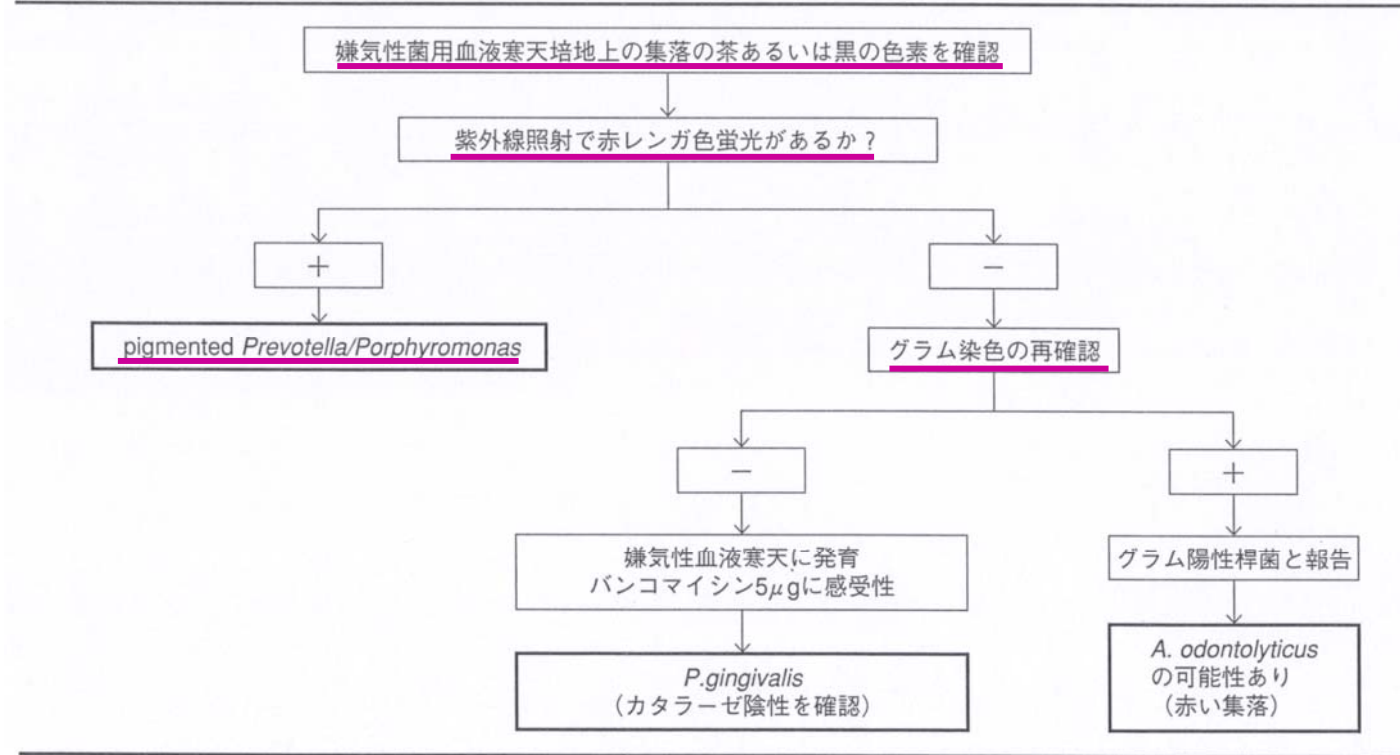
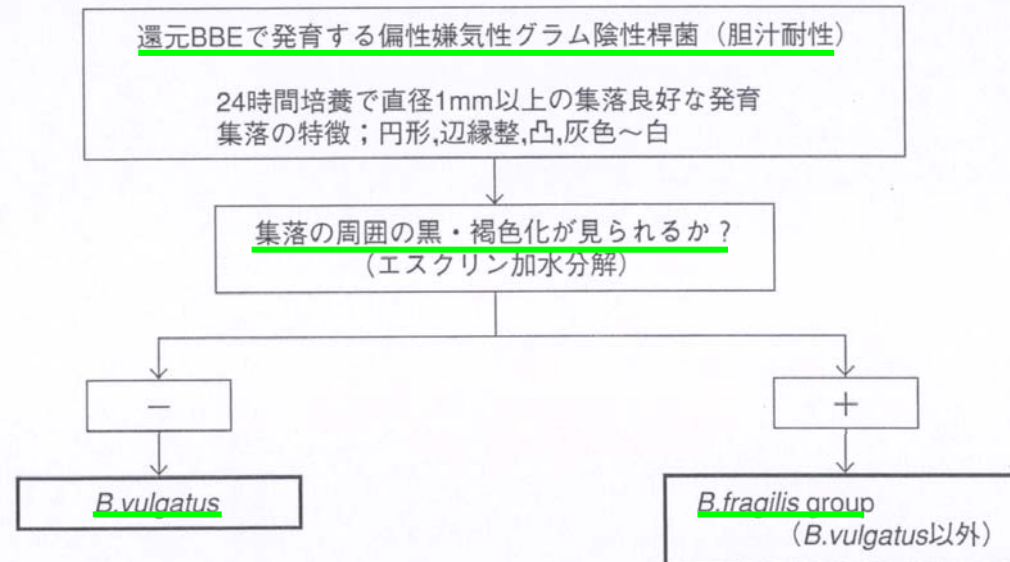


表15-9 レベル1b 変法FM培地に発育する偏性嫌気性グラム陰性桿菌の推定同定

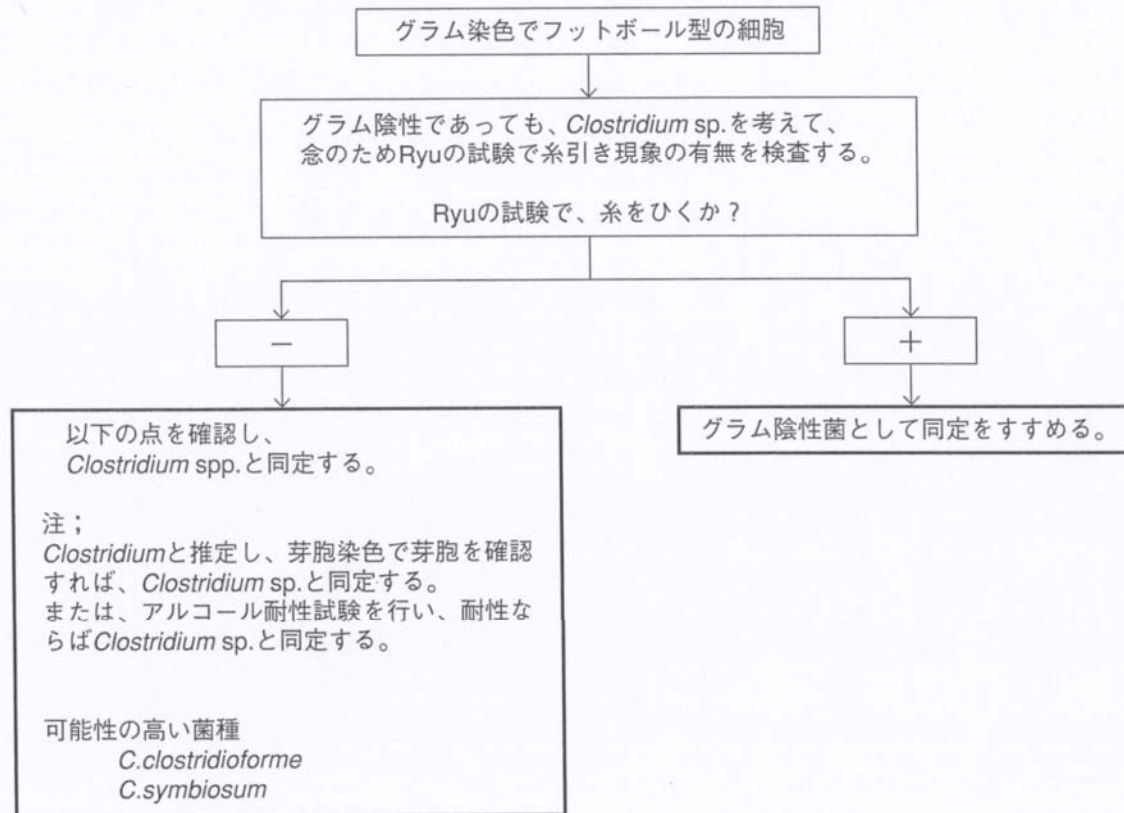


表15-10 レベル1b バクテロイデス培地、BBE寒天に発育する偏性嫌気性グラム陰性桿菌
球桿菌の推定同定



注； *Bacteroides fragilis* groupは、臨床細菌学的に極めて重要な嫌気性菌であるので、市販のマイクロシステムを用いて、菌種レベルでの同定を行いたい。*B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* およびその他に分類する。

表15-11 レベル1b フットボール型の細胞を有する嫌気性菌



グラム陰性菌の鑑別・同定

- グラム陰性菌の鑑別・同定は黒色集落形成性桿菌、*Bacteroides fragilis* group、*Fusobacterium* spp.、色素非産生菌、球菌 (*Veillonella* spp.)、その他を大別する。
- グラム陰性桿菌と *Clostridium clostridioforme* などを誤認しないように留意する。
- 陰性桿菌においては胆汁(20% Bile)、エスクリン(ES)加水分解、色素(Crystal violet)感受性、球菌は硝酸塩還元が基本的鑑別性状として有用である。
- 初代平板（時に検体も）は 365nm UV 照射下で蛍光を確認する。

Level 1 での GNB の同定

嫌気培養で分離されるグラム陰性桿菌の Level 1b での同定

江成 博 極東製薬工業株式会社

Level 1b での細菌名	Pitting または Spreading	黒色～茶色集落	BAC/mFM/BBE*	Ryu の方法 (3%KOH)	Football 菌体	長波長 UV 下での蛍光	備 考								
色素産生 <i>Prevotella/Porphyromonas</i> sp.	無	有	(+)/-/-	溶解 (グラム陰性)	無	レンガ赤	<i>P. gingivalis</i> は蛍光無								
<i>Bacteroides vulgatus</i> *		無	無			+/ - / + *	.	.	* ; ES 陰性						
<i>B. vulgatus</i> 以外の <i>B. fragilis</i> group									BBE(4日)で結晶析出*の場合、 <i>B. fragilis</i> と推定						
<i>Bilophila wadsworthia</i>									- / W + / +	CAT 強陽性、多形性桿菌					
<i>Fusobacterium nucleatum</i>									- / + / -	BBE で黒目玉様集落					
<i>Fusobacterium necrophorum</i>									.	.	パン屑または平滑集落				
<i>Fusobacterium mortiferum/varium</i>											紡錘状菌体				
<i>Fusobacterium</i> sp.											臍(ヘソ)のある集落、				
色素非産生グラム陰性桿菌 (Non-pigmented <i>Prevotella</i> sp. など)									有	目玉焼様集落、悪臭
<i>Bacteroides ureolyticus</i> group															<i>F. varium</i> ; ES : 陰性
<i>Clostridium</i> sp.(<i>C. clostridioforme</i> 、 <i>C. ramosum</i> *、 <i>C. symbiosum</i> **など)	無		+/ - / -	溶解せず (グラム+)	有	.	液体(半流動)培地など血液無添加の培地ではギ酸/フマル酸を要求する								
偏性嫌気性菌(未同定)	Et-OH テストで芽胞確認								

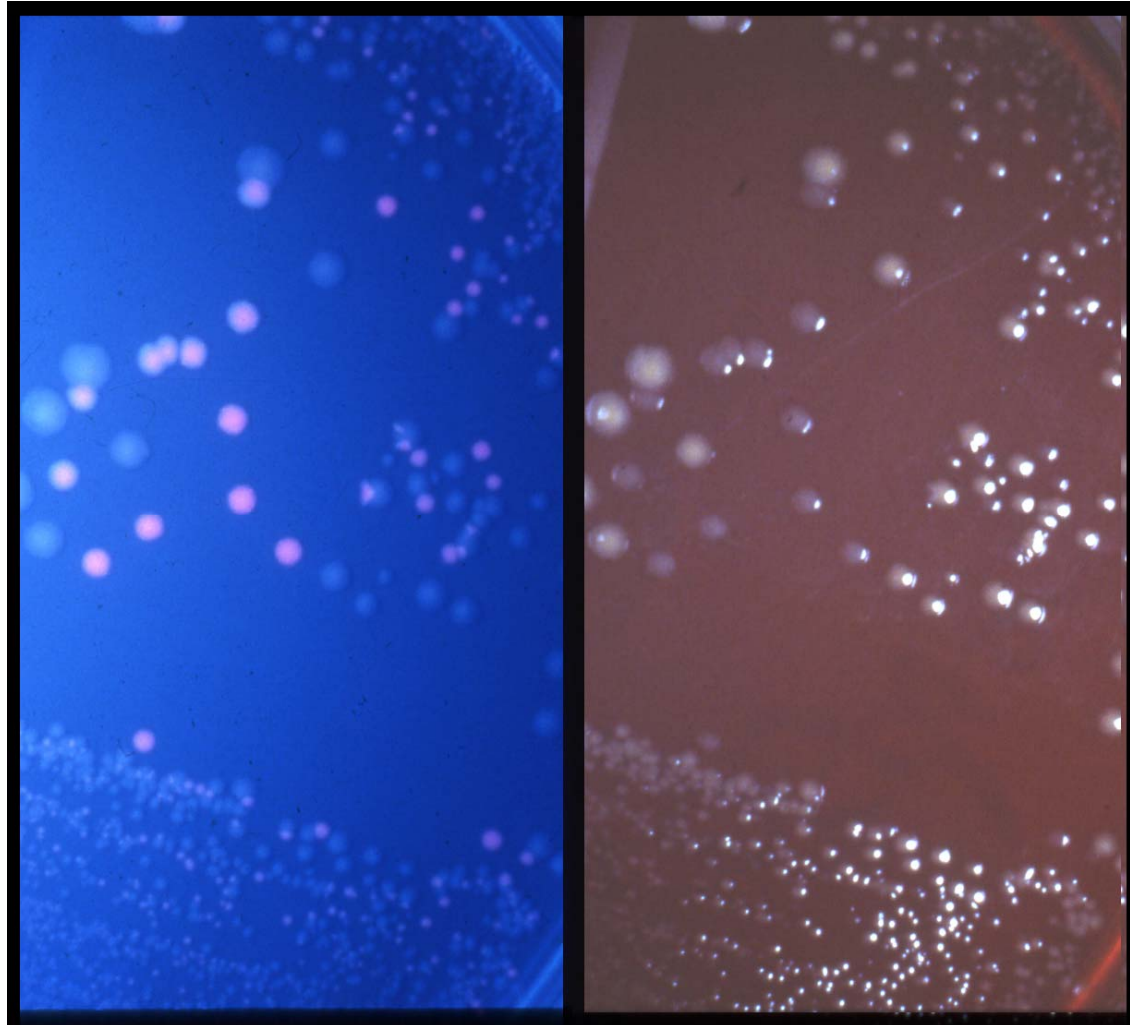
赤字は β -lactamase 産生株が存在

. ; 未確認、あるいは適応なし () ; 例外有

* : 結晶析出率は50~67%程度

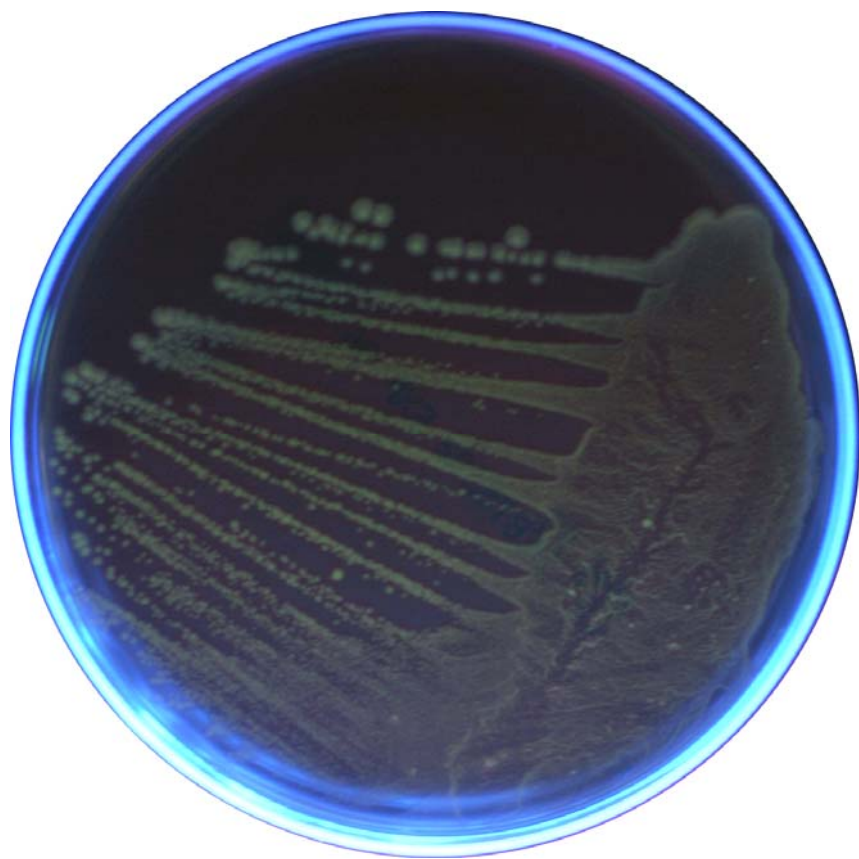
* : BAC:バクテロイデス培地、mFM:変法 FM 培地、BBE:BBE 寒天培地

P. loescheii , *S. intermedius* 混在時の平板所見



- 写真左側は 365nm UV 照射下の所見で *P. loescheii* は蛍光(淡桃色)を発している。(黒色化しにくい菌株)
- 写真右側は同平板の通常照明下での所見で *P. loescheii* は半透明集落、白色集落は *S. intermedius* である。

F. necrophorum の紫外線照射下での蛍光(左)

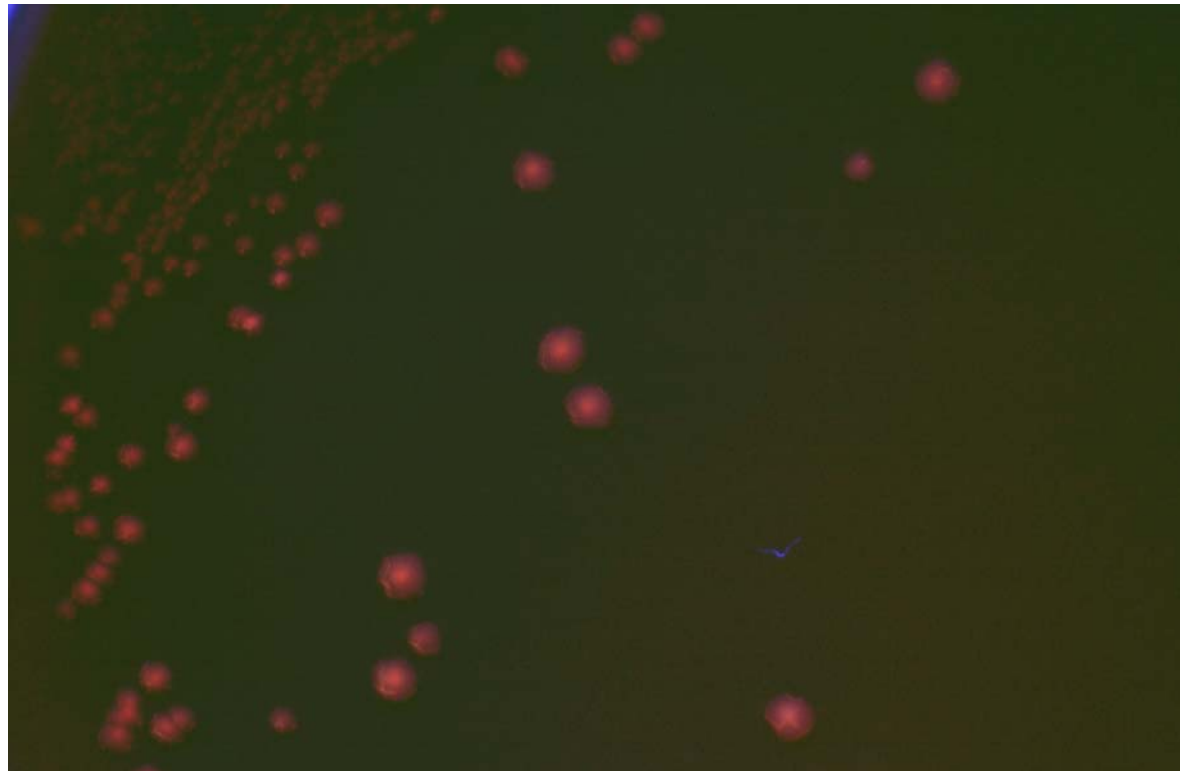


365 nm UV 照射下



通常光照明下

C. ramosam の紫外線照射下での蛍光



嫌気性菌鑑別法の検討

日本臨床微生物学会 2005(京都)
(考察の頁まで20枚)

極東製薬工業(株)微生物学術課¹⁾、山口県立中央病院中央検査部²⁾

江成 博¹⁾、国広誠子²⁾

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。

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。

さらに Level 2 の同定における簡易同定キットの弱点を補完する方法としても適している。

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；

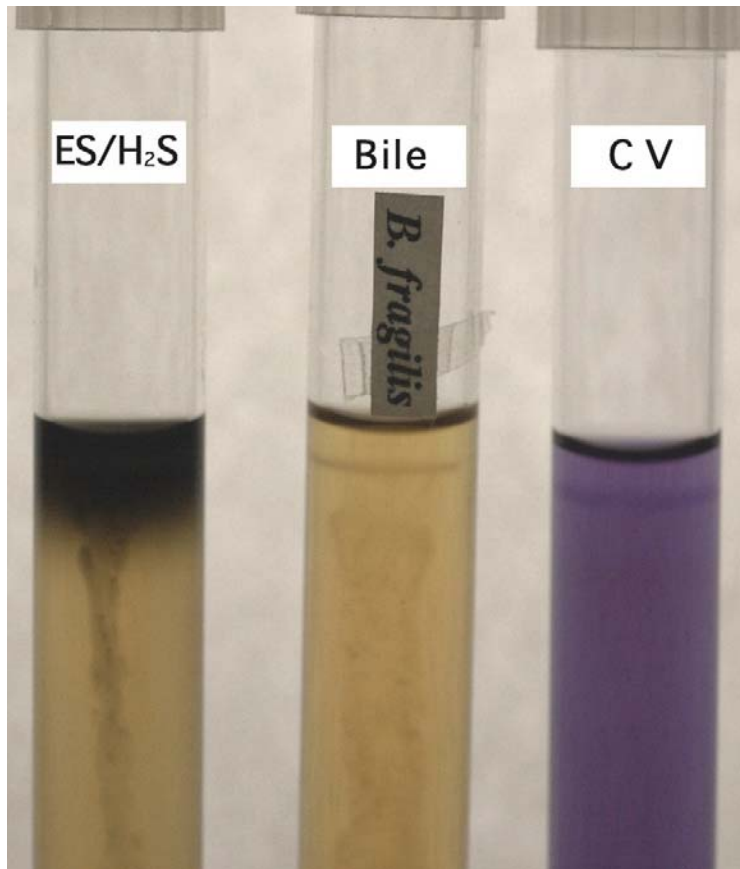
各供試菌株をブルセラHK寒天培地(RS)で前培養し、その1集落(一部の菌株については数集落)を釣菌、0.5mLの菌液とした。

この調製菌液を各培地にPasteur pipette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。

検討菌株の培養結果一覧

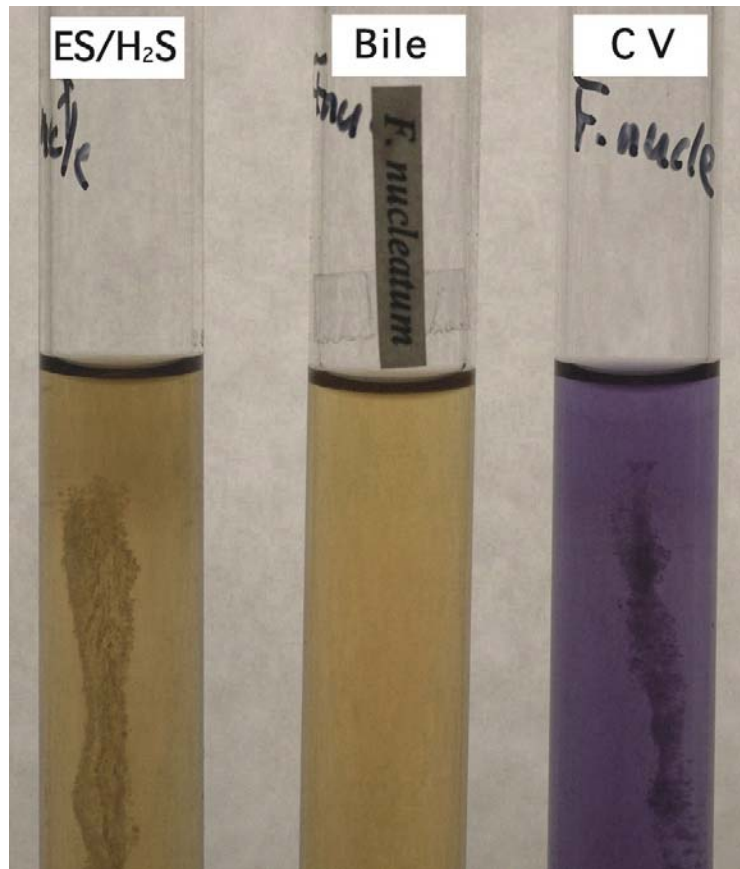
供試菌株	ES	H ₂ S	Bile	CV	F/F stimul.	備 考
<i>B. fragilis</i>	+*	-	R	S	.	* : 黒色
<i>B. thetaiotaomicron</i>	+*	-	R	S	.	* : 黒色
<i>B. wadsworthia</i>	-	+	R*	R	.	* : 促進
<i>F. nucleatum</i>	-	-	S	R	.	
<i>F. mortiferum</i> 02	+*	-	R	R*	.	* : 黒褐色、* : CV脱色
<i>F. mortiferum</i> 42	+*	-	R	R*	.	*,* : 同上、写真には示さず
<i>F. 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</i> sp.	-	-	S	S	+*	* : F/F > Cont.

Bacteroides fragilis



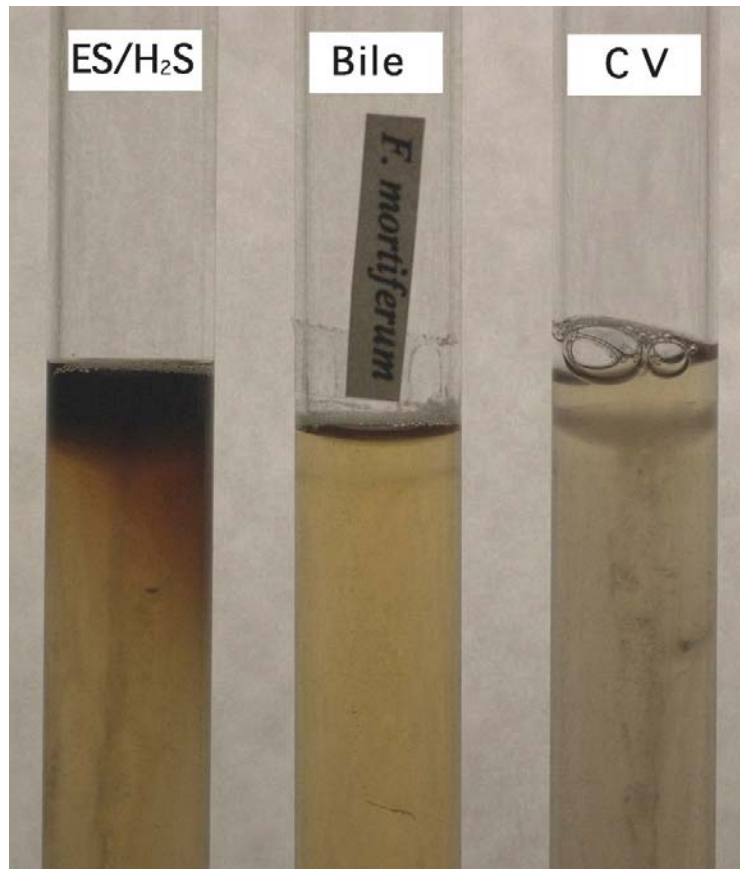
- **ES** : 陽性(上部黒色)
- **H₂S** : 陰性(下部無色)
- **20%Bile** : 耐性(発育)
- **CV** : 感性(非発育)

Fusobacterium nucleatum



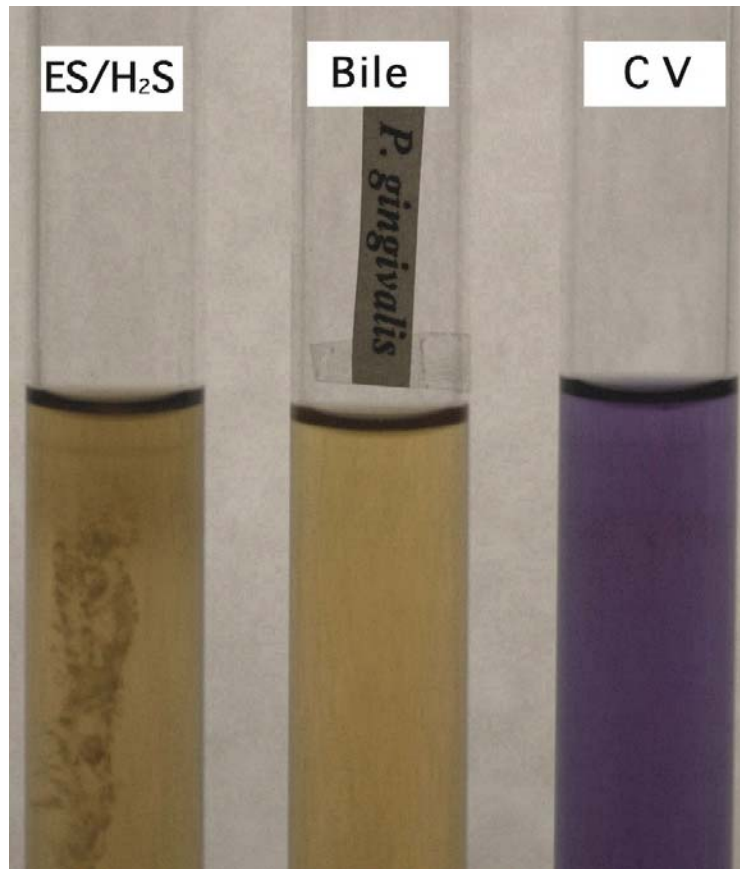
- ES : 陰性(上部無色)
- H₂S : 陰性(下部無色)
- 20%Bile : 感性(非発育)
- CV : 耐性(発育)

Fusobacterium mortiferum



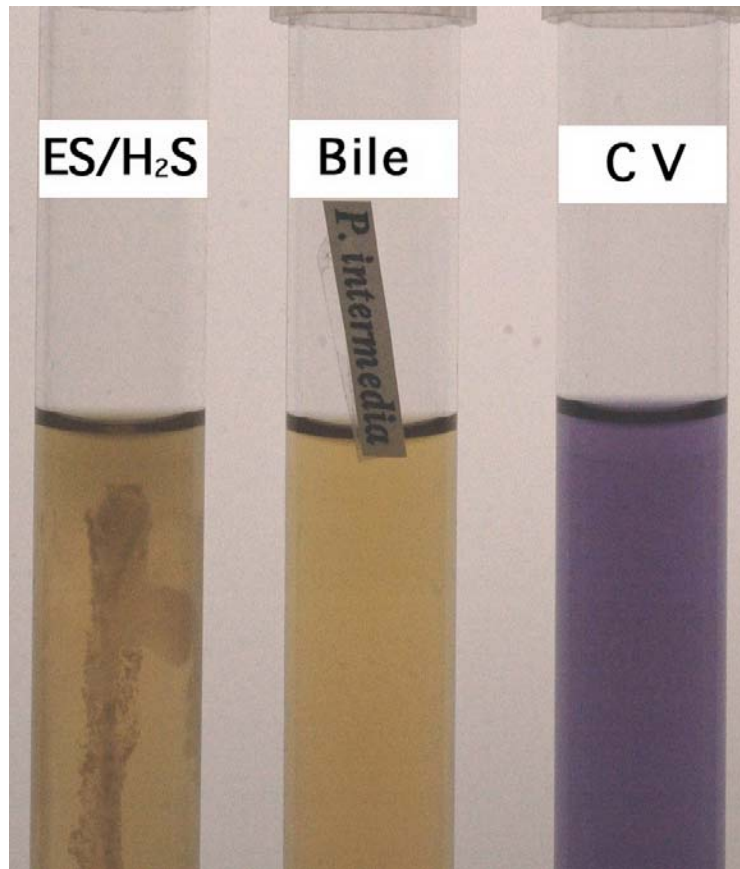
- ES : 陽性(上部**黒褐色**)
- H₂S : 陰性(下部無色)
- 20%Bile : 耐性(発育)
- CV : 耐性(発育・**脱色**)

Porphyromonas gingivalis



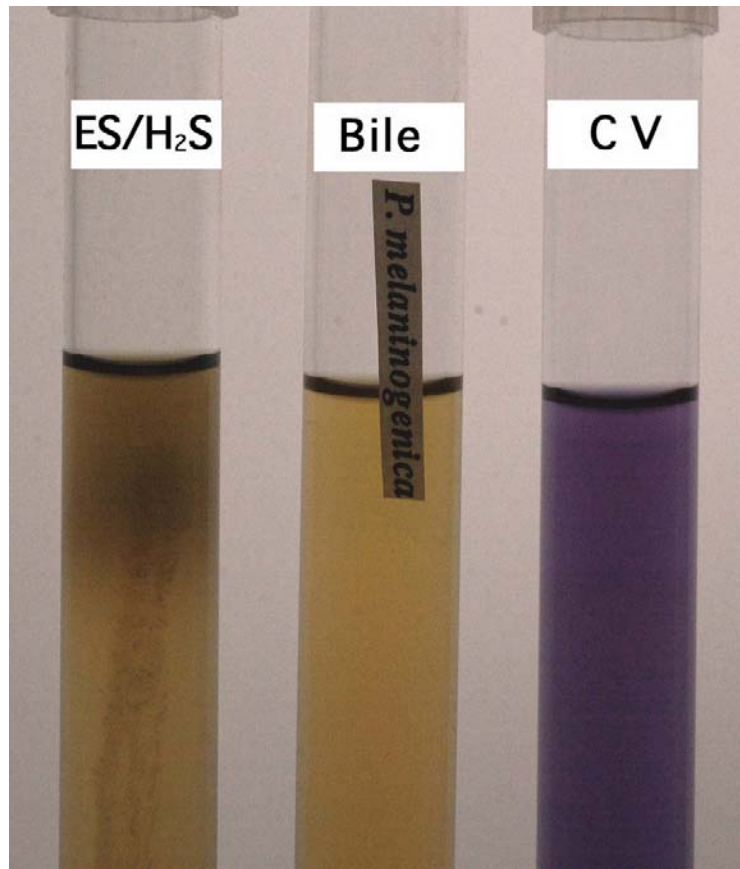
- ES : 陰性(上部無色)
- H₂S : 陰性(下部無色)
- 20%Bile : 感性(非発育)
- CV : 感性(非発育)

Prevotella intermedia



- ES : 陰性(上部無色)
- H₂S : 陰性(下部無色)
- 20%Bile : 感性(非発育)
- CV : 感性(非発育)

Prevotella melaninogenica



- ES : 陰性(上部無色)
- H₂S : 陰性(下部無色)
- 20%Bile : 感性(非発育)
- CV : 感性(非発育)

検討結果のまとめ

Level 1bでの菌種名 (臨微マニュアル '97)	BAC/mFM/BBE Growth	今回の供試菌種 (計14株)	<u>ES-HK</u>		<u>Bile-HK</u>	<u>CV-HK</u>	<u>F/F-HK</u>
			ES	H ₂ S	Growth	Growth	Stimul.
色素産生 <i>Prevotella/Porphyromonas</i> sp.	(+)/-/-	<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</i> 02	+	-	+	+	.
		<i>F. mortiferum</i> 42	+	-	+	+	.
		<i>F. varium</i>	-	+	+	+	.
<i>Fusobacterium</i> sp.	-/+/-	
色素非産生グラム陰性桿菌 (<i>Non-pigmented Prevotella</i> sp. など)	(+)/-/-	<i>P. bivia</i>	-	-	-	-	.
		<i>P. oralis</i>	+	-	-	-	.
<i>Bacteroides ureolyticus</i> group	.	<i>Wollinella</i> sp.	-	-	-	-	+
<i>Clostridium</i> sp. (<i>C. clostridioforme</i> 、 <i>C. ramosum</i> 、 <i>C. symbiosum</i> * など)	+/-/- *; mFM:+	
偏性嫌気性菌 (未同定)	

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。

Bile-HK, ES-HK, CV-HK による鑑別のまとめ

Level 1b での菌名	供試菌種	20% Bile	Esculin*	H ₂ S	CV	備考
色素産生 <i>Prevotella</i> / <i>Porphyromonas</i> sp.	<i>P. gingivalis</i>	S	—	—	S	UV 下で蛍光なし
	<i>P. intermedia</i>	S	—	—	S	
	<i>P. levii</i>	S	—	—	S	
	<i>P. melaninogenica</i>	S	—	—	S	
<i>B. vulgatus</i>	(<i>B. vulgatus</i>)	R	—	—	S	
<i>B. fragilis</i> 以外の <i>B. fragilis</i> group	<i>B. fragilis</i>	R	+	—	S	
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	R	+	—	S	
<i>B. wadsworthia</i>	<i>B. wadsworthia</i>	R	—	+	R	CAT 強陽性
<i>F. necrophorum</i>	<i>F. necrophorum</i>	S	—	—	R	UV で黄緑色蛍光
<i>F. nucleatum</i>	<i>F. nucleatum</i>	S	—	—	R	
<i>F. mortiferum</i> / <i>varium</i>	<i>F. mortiferum</i> 02	R	+	—	R	
	<i>F. mortiferum</i> 42	R	+	—	R	
	<i>F. varium</i>	R	—	+	R	
色素非産生 GNB	<i>P. bivia</i>	S	—	—	S	
(<i>Clostridium</i> sp.)	(<i>C. clostridioforme</i>)	R	+	—	S	Gas 産生 (Et-OH test)

* ;ES-HK は GNB に限らず、他の菌群にも使用可

- 今回示した Bile-HK, ES-HK, CV-HK は汎用性のある HK 半流動培地を基礎培地としたことから嫌気性の GNB に限らず広範な菌群に対する適応が期待できる。
- 従来の学会平板法に比し、嫌気培養が不要であることも培養コストに資すると考える。

グラム陰性嫌気性菌の基本的性状

	Pit.	PIG	Br_R fluo.	紡錘状 菌体	CAT	IND	MOT	Growth in		ES hyd.	H ₂ S	VCM (5 μg)	KM (1mg)	CL (10 μg)	LIP	F/F 促進	NR	UR
								CV	20% bile									
<i>B. fragilis</i> group			-		V	V		-	+	+ ⁻		R	R	R	-			
Other <i>Bacteroides</i> spp.					- ⁺	V		-	- ⁺			R	R	V				
Pigmented species		+	+ ⁻		- ⁺	V		-	-			V	R	V	V			
<i>Porphyromonas</i> spp.		+ ⁻	+ ⁻		V	+ ⁻		-	-			S	R	R	- ⁺			
<i>Prevotella</i> spp.		+	+		-	V		-	-			R	R ^s	V	V			
<i>P. intermedia</i> - <i>P. nigrescens</i>		+	+		-	+		-	-			R	R ^s	S	+ ⁻			
<i>P. loeschei</i>		+	+		-	-		-	-			R	R	V	V			
Other <i>Prevotella</i> spp.		-	-		- ⁺	- ⁺		-	-			R	R	V	- ⁺			
<i>Campylobacter</i> spp./ <i>B. ureolyticus</i>	V				- ⁺	-	V		-			R	S	S	-	+	+	V
<i>B. ureolyticus</i>	V				-	-	-		-			R	S	S	-	+	+	+
<i>Campylobacter</i> spp.	V				-	-	+ ⁻		-			R	S	S	-	+	+	-
<i>C. gracilis</i>	V				-	-	-		-			R	S	S	-	+	+	-
<i>Sutterella</i> sp.	V				-	-	-		+			R	S	S	-	+	+	-
<i>Bilophila</i> sp.	-				+	-	-	+	+		+	R	S	S	-	-	+	+ ⁻
<i>Desulfomonas pigra</i>	-				V	-	-		V			R	S	R	-	-	- ⁺	- ⁺
<i>Desulfovibrio</i> spp.	-				V	-	+		V			R	S	R	-	-	V	- ⁺
<i>Fusobacterium</i> spp.				V	-	V		+	V			R	S	S	V			
<i>F. nucleatum</i>				+	-	+		+	-			R	S	S	-		-	
<i>F. necrophorum</i>				-	-	+		+	- ⁺			R	S	S	+ ⁻		-	
<i>F. varium</i> / <i>F. mortiferum</i>				-	- ⁺	V		+	+	-/+	+/-	R	S	S	- ⁺			
Gram-negative cocci					V	-			-			R	S	S	-		V	
<i>Veillonella</i> spp.					V	-			-			R	S	S	-		+	

Level 1 での GNB の同定

嫌気培養で分離されるグラム陰性桿菌の Level 1b での同定

江成 博 極東製薬工業株式会社

Level 1b での細菌名	Pitting または Spreading	黒色 ~ 茶色集落	BAC/mFM/BBE*	Ryu の方法 (3%KOH)	Football 菌体	長波長 UV 下での蛍光	備 考								
色素産生 <i>Prevotella/Porphyromonas</i> sp.	無	有	(+)/-/-	溶解 (グラム陰性)	無	レンガ赤	<i>P. gingivalis</i> は蛍光無								
<i>Bacteroides vulgatus</i> *		無	* ; ES 陰性						
<i>B. vulgatus</i> 以外の <i>B. fragilis</i> group									+/-/+*	BBE(4日)で結晶析出*の 場合、 <i>B. fragilis</i> と推定					
<i>Bilophila wadsworthia</i>									-/W+/+	CAT 強陽性、多形性桿菌 BBE で黒目玉様集落					
<i>Fusobacterium nucleatum</i>									-/+/-	パン屑または平滑集落 紡錘状菌体					
<i>Fusobacterium necrophorum</i>									臍(ヘソ)のある集落、	
<i>Fusobacterium mortiferum/varium</i>														-/+/+	目玉焼様集落、悪臭 <i>F. varium</i> ; ES : 陰性
<i>Fusobacterium</i> sp.														-/+/-	
色素非産生グラム陰性桿菌 (Non-pigmented <i>Prevotella</i> sp. など)									有	
<i>Bacteroides ureolyticus</i> group															.
<i>Clostridium</i> sp.(<i>C. clostridioforme</i> 、 <i>C. ramosum</i> *、 <i>C. symbiosum</i> **など)	無	.	+/-/-	溶解せず (グラム+)	有	.	Et-OH テストで芽胞確認 * : <i>C. ramosum</i> は赤色蛍光 ** : <i>C. symbiosum</i> は mFM に発育								
偏性嫌気性菌(未同定)								

赤字は β -lactamase 産生株が存在

. ; 未確認、あるいは適応なし () ; 例外有

* : 結晶析出率は50~67%程度

* : BAC:バクテロイデス培地、mFM:変法 FM 培地、BBE:BBE 寒天培地

関連資料

- 国広誠子、他(1985):嫌気性菌選択培地としてのPEA寒天培地の検討.臨床と微生物,12:87-93.
- 加藤幸太郎、他(1990):耳鼻科、口腔外科領域における嫌気性菌の検出状況.嫌気性菌感染症研究, 20; 60-65.
- 第7回九州地区微生物検査検査研修会(1992):卒後教育セミナーテキスト.
- H.Jousimies-Sommer, et al(1993):Bacteriologic Findings in Peritonsillar Abscesses in Young Adults. Clin. Inf. Dis. (Suppl 4):S292-298.
- 江成 博、他(1992):嫌気性無芽胞グラム陰性桿菌と*Streptococcus* sp.の混在する材料を想定した分離培養に関する実験的検討.嫌気性菌感染症研究,22:74-83.
- 江成 博、他(1993):嫌気性菌用選択培地の再評価の試み.嫌気性菌感染症研究,23;28-33.
- 江成 博、他(1994):嫌気性菌用選択培地の再評価の試み(続報).嫌気性菌感染症研究,24;74-80('94)
- 栗山智有、他(1996):口腔外科領域感染症からの嫌気性菌分離率と β -lactamase活性.嫌気性菌感染症研究,26:41-45.
- 江成 博(2001):嫌気性初代培養についての供給側からの提言.JARMAM,12:39-46.
- Christensen J. J. and Richard R. Facklam. 2001. *Granulicatella* and *Abiotrophia* Species from Human Clinical Specimens. J. Clin. Microbiol. 39:3520-3523.
- WADSWORTH-KTL ANAEROBIC BACTERIOLOGY MANUAL(6'th Ed.)
- 日本臨床微生物学会編;臨床嫌気性菌検査法'97 上野一恵 監修
- 川村千鶴子、中村利彦、渡邊邦友、他(2002):5年間で経験した*Fusobacterium*が関与する感染症108例の臨床細菌学的解析.感染症学雑誌,76:23-31.