

ENGLISH SUMMARY.

DURATION OF ACTIVITY PRESERVATION OF THE PATHOGENIC BACTERIA ORIGINATING FROM THE OTORHINOPHARYNGOLARYNGOLOGICAL INFECTIONS UNDER VARIOUS CONDITIONS.

Koichi Deguchi

Reserch Division, Tokyo Clinical Research Center

Many pathogenic bacteria found in the infections in the otorhinopharyngology are similar in kinds to those in the infections in the respiratory organs, and in addition, anaerobic bacteria are participated. Since the nutritional requirements of these bacterial strains are strict and delicate in nature, their activity is rapidly weakened unless sufficiently satisfactory conditions are provided in their storage.

The speaker of this lecture prepared 26 bacterial strains originating from the otorhinopharyngology infections in 10^4 CFU/ml, a smaller bacterial counts, and these were stored in a refrigerator, and duration of the activity preservation was examined using dry test tubes, physiological saline, Kenki-porter (ClinicalSupply) and TCS porter (Clinical Supply).

1) Among Aerobic GPC (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. lactiae*, *S. angihosus*, *S. pneumoniae*-type I, and *S. pneumoniae*-type III), activity loss was the fastest with Genus *Streptococcus* as determined by the dry test tubes and physiological saline, while Genus *Staphylococcus* preserved the activity relatively longer in the dry test tubes.

2) Among Aerobic GNR, activity loss of *H. influenzae* was the fastest, losing the activity within 2 hours in dry test tubes and

in physiological saline. However, *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* and *P. inconstans*) preserved their activities for 24-48 hrs in dry test tubes, and for 96-144 hrs in physiological saline. NF-GNR (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. cepacia* and *A. calcoaceticus*) preserved the activity for 48-72 hrs in dry test tubes.

3) Among Anaerobes (*P. magnus*, *P. asaccharolyticus*, *P. anerobius*, *S. intermedicus*, and *B. melaninogenicus*), all strains lost the activity within 2 hrs in dry test tubes, *P. magnus* and *P. asaccharolyticus* and *P. anerobius* lost the activity within 2 hrs, *B. melaninogenicus* within 2 hrs, and *S. intermedicus* in hrs in physiological saline.

4) Bacterial activity preservation in a Kenki-porter and TCS porter was excellent, and most bacterial strain preserved the activity for more than 144 hrs. However, the maximum duration of the activity preservation in a Kenki-porter was 48 hrs for *S. pneumoniae*-type III, 96 hrs for *H. influenzae* and *B. melaninogenicus* and 120 hrs for *S. pneumoniae*-type I. In a TCS porter, *H. influenzae* and *B. melaninogenicus* lost their activities by 120th hr.

5) Collection of the bacterial specimens from the patient in the otorhinopharyngology for the purpose of clinical bac-

terial examinations should be very careful in terms of preservations, because the parasitic bacteria in human body or in natural environment may preserve their activities for considerably longer time overcoming the different conditions of the preservation. However, clinically valuable, for the iden-

tification, pathogenic bacteria, such as H. influenzae, Genus Streptococcus Anaerobes, would lose the activity rapidly if the conditions of preservation are not suitable. As the result, the identification of the pathogenic bacteria will become difficult.

耳鼻咽喉科感染症患者由来株の保存条件による活性持続時間

出 口 浩 一 (東京総合臨床検査センター研究部)

はじめに

演者は、耳鼻咽喉科領域の感染症の起炎菌は、呼吸器感染症で起炎性を発揮する菌種と基本的には、同属、同種のものであり、加えて嫌気性菌も関与することを指摘してきた。

これらの菌種は、栄養要求がシビアであり、かつデリケートな性状を有するため、保存条件によっては、急速に活性を失う。一方、ある種の菌種は、保存条件の差による活性の減退がかなり緩慢なものもある。このことは、採取された検体の保存条件の差によって、検出される菌種に限界が生じることを意味している。感染症の起炎菌を決定するためには、① 検体の採取方法、② 保存方法、③ 検索方法の三つの条件が満たされていなくてはならない。本題では、このうち、保存方法に関する検討を報告したい。

検 討 方 法

1) 供試菌株

耳鼻咽喉科領域感染症患者由来臨床分離株の、下記26菌種を用いた。Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus anginosus, Strep-

tococcus pneumoniae-type I, Streptococcus pneumoniae-type III, Escherichia coli, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Serratia marcescens, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus inconstans, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas cepacia, Acinetobacter calcoaceticus, Haemophilus influenzae, Branhamella catarrhalis, Peptococcus magnus, Peptococcus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Streptococcus intermedius, Bacteroides meleninogenicus

2) 保存条件

- ① 乾燥試験管 (スクリューキャップ, 滅菌中試験管),
- ② 生理的食塩水 (以下生食水),
- ③ ケンキポーター (クリニカルプライ),
- ④ TCS ポーター (クリニカルサプライ, TCS-Broth, Difco 2ml, CO₂を加えてある。)

3) サンプルの調製

上記1)の26菌種を TCS-Broth (Difco) と生食水を用いて10⁴CFU/ml程度の菌液とし、乾燥試験管とケンキポーターには耳鼻科用の細い綿棒を浸し、サンプルとした。生食水、

TCS ポーターは 10^4 CFU/mlに調製したものをそのまま用いた。各々のサンプルの保存期間は7日間とし、 5°C 程度の冷所で保存した。

4) 活性持続時間のチェック方法

初日は、2時間目、4時間目、6時間目、8時間目をチェックし、2日目以降は7日目まで各1回ずつ培養に供した。

成 績

各保存条件における26菌種の活性持続時間を表に示した。

1) 乾燥試験管、生食水での活性持続時間

乾燥試験管では、*S. pneumoniae*-type I は2時間、*S. pneumoniae* type III, *H. influenzae*, 嫌気性菌の5菌種は2時間以内に活性を失った。*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus* は乾燥試験管では、4~8時間、生食水では、8~24時間までが限度だった。

S. aureus, *S. epidermidis* は乾燥試験管では4時間、生食水では96時間活性を保持していた。また、腸内細菌科のGNR(8菌種)は、乾燥試験管が24~48時間、生食水では96~144時間、さらにNF-GNR(4菌種)は乾燥試験管が48~72時間、生食水では、96~144時間以上活性が持続した。

2) ケンキポーター、TCS ポーターでの活性持続時間

ケンキポーターでは、*S. pneumoniae* type IIIが48時間、*H. influenzae*, *B. melaninogenicus* は各々96時間、*S. pneumoniae*-type I は120時間までが保存限界だったが、その他の菌種は144時間以上の活性を保持していた。

TCS ポーターでは、*H. influenzae*, *B. melaninogenicus* が各々120時間までで活性を失ったが、残りの菌種は、144時間以上の活性を保持していた。

考 察

細菌検査を目的とした材料は保存条件を厳格におこなうことが大切であることは、いわば常識でもある¹⁾。また演者は、従来から細菌

検査材料の保存の重要性を強調して^{2), 3) 4)}きた。今回の成績では、肺炎球菌を含むレンサ球菌属、インフルエンザ菌、そして嫌気性菌は乾燥試験管、生食水では急速に活性を失った。

肺炎球菌を含むレンサ球菌属、インフルエンザ菌、嫌気性菌は耳鼻咽喉科領域における感染症の重要な起炎菌であるが、これらの菌種の検出頻度には施設間のバラツキがある。このバラツキは検体の保存条件の差が一因であると考えられる。一方、ブドウ球菌属、インフルエンザ菌を除く各種のグラム陰性桿菌は、保存条件の差を超越して活性持続時間が長い。従って保存条件によっては、起炎性を発揮している菌種は活性を失っているため検出されず、反対に起炎性の弱い菌種が活性を保持していたために検出されてくることもありうる。

尚、今回の検討に用いた菌数は 10^4 CFU/mlであるが、これらは感染病巣における菌量の下限に近いものと考えられる。しかし、現実には、この程度の菌量であっても確実に検出される必要があると考えたからである。従って、これらの成績は $10^7 \sim 10^8$ CFU/mlの菌数を用いた上野の成績⁵⁾などとは単純には比較できない。

結 論

耳鼻咽喉科領域感染症患者由来の26菌種を 10^4 CFU/mlの比較的少ない菌数に調製し、冷蔵庫内で保存して、乾燥試験管、生理的食塩水、ケンキポーター、TCS ポーターでの活性持続時間を検討した。

1) 好気性のグラム陽性球菌(*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. pneumoniae*-type I, *S. pneumoniae*-type III)場合は、乾燥試験管、生食水では、レンサ球菌属の活性減退が早く、反対にブドウ球菌属は乾燥試験管でも比較的長時間活性が持続した。

2) 好気性のグラム陰性桿菌のなかではイン

フルエンザ菌の活性減退が早く、乾燥試験管、生食水では2時間以内に活性を失った。しかし、腸内細菌科のグラム陰性桿菌(*E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. inc-onstans*)は乾燥試験管では24~48時間、生食水では96~144時間活性を保持していた。さらにブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌(*P. aeru ginosa*, *P. putida*, *P. cepacia*, *A. calcoacet- icus*)は乾燥試験管でも48~72時間活性を保持していた。

3) 嫌気性菌は検討した5菌種(*P. magnus*, *P. asaccharolyticus*, *P. anaerobius*, *S. inter- medius*, *B. melaninogenicus*)のすべてが乾燥試験管では2時間以内に、生食水でも、*P. magnus*, *P. asaccharolyticus*, *P. anaerobius* は2時間以内、*B. melaninogenicus* は2時間、*S. intermedius* は8時間までで活性を失った。

4) ケンキポーター、TCSポーターの保存性は秀れていて、大部分の菌種が144時間以上の活性を保持していた。しかし、ケンキポーターでは、*S. pneumoniae*-type IIIが48時間、*H. influenzae*, *B. melaninogenicus* は各々96時間、*S. pneumoniae*-type Iは120時間が保存限界だった。また、TCSポーターでも、*H. influenzae*, *B. melaninogenicus* が120時間までで活性を失っていた。

5) 耳鼻咽喉科領域の細菌検査を目的とした患者採取材料は、採取したその瞬間から必要な保存条件を確保すべきである。なぜなら、ヒトの体内や自然環境に常任している菌種は保存条件の違いを超越して活性持続時間が長い、起炎菌としての価値が高いインフルエンザ菌、レンサ球菌属、嫌気性菌などは保存条件が満たされていないと急速に活性を失い、起炎菌の決定を困難にするからである。

文 献

- 1) 厚生省監修：微生物検査必携，197，
日本公衆衛生協会，1966。

- 2) 出口浩一：Primary infection を主とした患者から検出される細菌の様相—検出される菌種の特徴について—その3。メヂヤサークル26：239，1981。

- 3) 出口浩一：臨床細菌学の現場からみた細菌感染症の様相，26 ビーチャム薬品（非売品）1983。

- 4) 出口浩一：婦人性器感染の起炎菌の検索、検体の採取と保存方法について，第一回産婦人科感染症研究会学術講演会記録集（投稿中）

- 5) 上野一恵：検査材料：の採取および取扱い方，嫌気性菌と嫌気性菌症，19，医学書院，1972。

耳鼻咽喉科患者由来株の保存条件による活性持続時間

菌種	保存条件	乾燥試験管	生理的食塩水	ケンキポーター	TCSポーター
<i>Staphylococcus aureus</i>		4 8	9 6	>1 4 4	>1 4 4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		4 8	9 6	>1 4 4	>1 4 4
<i>Streptococcus pyogenes</i>		6	2 4	>1 4 4	>1 4 4
<i>Streptococcus agalactiae</i>		8	2 4	>1 4 4	>1 4 4
<i>Streptococcus anginosus</i>		4	8	>1 4 4	>1 4 4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (type I)		2	8	1 2 0	>1 4 4
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (type III)		< 2	4	4 8	>1 4 4
<i>E. coli</i>		4 8	1 2 0	>1 4 4	>1 4 4
<i>Citrobacter freundii</i>		2 4	1 2 0	>1 4 4	>1 4 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		2 4	9 6	>1 4 4	>1 4 4
<i>Enterobacter cloacae</i>		4 8	1 2 0	>1 4 4	>1 4 4
<i>Serratia marcescens</i>		4 8	1 4 4	>1 4 4	>1 4 4
<i>Proteus mirabilis</i>		4 8	1 2 0	>1 4 4	>1 4 4
<i>Proteus vulgaris</i>		4 8	1 2 0	>1 4 4	>1 4 4
<i>Proteus inconstans</i>		4 8	1 2 0	>1 4 4	>1 4 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		4 8	9 6	>1 4 4	>1 4 4
<i>Pseudomonas putida</i>		4 8	>1 4 4	>1 4 4	>1 4 4
<i>Pseudomonas cepacia</i>		7 2	>1 4 4	>1 4 4	>1 4 4
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		7 2	>1 4 4	>1 4 4	>1 4 4
<i>Haemophilus influenzae</i>		< 2	< 2	9 6	1 2 0
<i>Branhamella catarrhalis</i>		2	8	>1 4 4	>1 4 4
<i>Peptococcus magnus</i>		< 2	< 2	>1 4 4	>1 4 4
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>		< 2	< 2	>1 4 4	>1 4 4
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>		< 2	< 2	>1 4 4	>1 4 4
<i>Streptococcus intermedius</i>		< 2	8	>1 4 4	>1 4 4
<i>Bacteroides melanogenicus</i>		< 2	2	9 6	1 2 0

24 : 1 day 48 : 2 days 72 : 3 days 96 : 4 days 120 : 5 days 144 : 6 days >144 : 7 days