

臨床微生物学の「礎」を築いた人々

— 気道関連の微生物研究に携わった研究者達の技術と思索 — 5

Paul Ehrlich と Hans Christian Gram
(その3)帝京大学名誉教授
こん の まさ とし
紺 野 昌 俊
Masatoshi KONNO

前号では Ehrlich の研究者としての生き方を Charite 病院における臨床医としての期間、Koch の研究所から化学療法の拠点となった研究所に至る期間、その後“side-chain theory”に対する諸家からの批判の対応に追われた期間、およびその転機を求めての trypanrot の開発から salvarsan の開発に成功するまでの期間について記述しました。本号では salvarsan 開発の成功に関わる栄光と、その臨床応用において見られた Ehrlich の対応について記し、それに次いで Gram の研究者としての対比的な生き方を記して、そのまとめを記述していきたいと考えております。

Ehrlich は salvarsan の発見に関する講演の中で、何回も志賀潔と秦佐八郎に対する謝辞を述べております。しかし、問題はそれで済んだわけではありませんでした。何故ならば salvarsan を臨床で使用するに当たってのヒトでの安定性や毒性はもとより、投与量や投与経路もまだ定かでなかったからです。それでも Ehrlich の講演の反響は大きく、各国からの salvarsan の供給に対する要望が数多く寄せられました。しかし、いずれの時代の新薬開発でも同様なことかも知れませんが、臨床家の中には短絡的な理解からの医療行為をも含めて、過少投与による再発例や、過量投与による死亡あるいは重篤な副作用が

生ずる例 (Jarish-Herxheimer 反応^{1,2)}を含む)(註1)も目立ち始め、それらが社会的に過大に取り上げられたのは、今も昔も変わらないようであります。

Ehrlich は多くのクレームに接し、pH が酸性であった salvarsan に替わって中性に補正した Neosalvarsan を 1912 年に開発³⁾しておりますが、1914 年に地元の新聞紙に「Ehrlich は売春婦に salvarsan を強制的に投与した」との報道がなされ、Ehrlich も法廷で証言しなければならない事態も生じました。長年に亘って Ehrlich の心の底に流れていた「臨床で試してみたい」というリスクが、治験症例の集積を急がせる結果となったのかも知れません(註2)。

時は世界第一次大戦が勃発した年であります。その年、Ehrlich は 60 歳の誕生日を迎え、大勢の人々に囲まれて祝福を受けております。また、それまでの間においても多くの賞を受けております。栄光の頂点にあったと言うべきでしょうが、その反面に覆いかぶさってくる中傷の中で、心穏やかな日々ばかりではなかったように思われます。

Ehrlich は翌年の 1915 年 8 月に脳卒中で亡くなりました。遺体はフランクフルトのユダヤ人の墓地に埋葬されました。言わずもがなのことかも知れませんが、Ehrlich がユダヤ教徒であったことに対する

註1: Jarish-Herxheimer 反応は、ペニシリンが臨床で使用され始めてから注目されるようになったと理解されている面もありますが、実際は梅毒に罹患して菌が全身に分布していることの証となる発疹が生ずる第2期に該当する患者に salvarsan を投与した際に見られていたのが最初です。

註2: Ehrlich は砒素化合物の動物感染実験が研究協力者の辞職によって一次頓挫した際に、それまでに最も効果が認められていた arsenophenyglycine (418号) を、Ehrlich の嘗ての学友であった Neisser など数人の医師に頼んで、いきなり臨床試験を実施しています。結果は製剤としては不安定であるのみならず死亡例もあった(前号註8参考文献24, 25)ということです。そのこともあって、Ehrlich は Salvarsan の臨床使用に当っては、当初は慎重な姿勢をとっておりました。そして、前記の Neisser をはじめとする数人の専門家に臨床試験を依頼しております。もちろん、その中には単なる臨床試験だけではなく、投与方法などについても検討した成績もあります。それらの結果は意外と早く Ehrlich のところに届けられたこととあって、Ehrlich は 1910 年 4 月にヴィースバーデンで開催された内科学会でそれらの臨床試験の結果を発表しております。その内容は第4期に入った梅毒では改善は見られないが、初期梅毒と回帰熱には勝れた効果を示すというものでした。その際、Ehrlich はまだ予備的な検討段階であることを強調したのですが、「梅毒に対して抜群の効果をもたらした」とするニュースが広く報道され、忽ちのうちに salvarsan の供給にかかわる依頼が Ehrlich の許に殺到しました。Ehrlich はせめて 1 万人か 2 万人の患者におけるテストが終了するまで待つて欲しいと訴えたのですが、それは通ぜず、結局 Höchst 社で製造した 65,000units の salvarsan を要望のあった医師に無償で分け与えることになりました。そこに大きな誤りがあったようです。参考までに salvarsan の初期の臨床試験にかかわる論文は、その殆どが“Munch med Wschr. 1910 ; 57”または“Berlin klin Wschr. 1910 ; 47”に収録されていますが、それらの著者名と題名まで記載すると多くのスペースを必要としますので、ここでは割愛させて頂きました。

社会的迫害については、Ehrlich は自らの研究生活の中で彼自身の言葉としては一切発しておりません。Ehrlich にはそのような社会的制約についての批判は全く持ち合わせていなかったのでしょうか。Ehrlich の異常とも思える精力的な研究姿勢の裏側には、そのような迫害に対しての抵抗姿勢があったようにも受け取れるところもあります。第一次世界大戦に敗れたドイツは共和国へと移行して行くのですが、やがて台頭してきたナチスのために Ehrlich の未亡人と娘はユダヤ人としての迫害を受けることになりました。そのことをも、私たちの記憶に留めるべきでしょう。

やっと、Gram について記述するところに到達しました。このシリーズの冒頭で述べたことを繰り返しますが、Ehrlich と Gram の間には直接的な関係は何もありません。ただ、アニリン色素を通じての間接的な接点がありました。記憶を新たにするために、本誌の“*Diplococcus pneumoniae*”が主題であったシリーズ(その2)の中で記したことを繰り返しますが、Friedländer と Fränkel のクループ性肺炎の病因菌発見にかかわる論争は、Friedländer が肺炎で死亡した患者の肺組織標本を Ehrlich のアニリン色素を用いた染色法に準じて染色し、その病巣内の菌を培養すると「爪状に膨隆した大きな集落」であったということから始まったということです。そして、その染色には Gram も関係しておりました。

Gram はデンマーク人で、父親は法律学の教授をしていたということですから、経済的には恵まれた環境にあったというべきでしょう。Gram 自身は植物学に興味を持ち、大学時代には顕微鏡の使用に精通していました。そして1878年(25歳)にMDの資格を得て、1883年には黄疸や悪性貧血にかかわるヒトの赤血球の大きさについての論文を書いて学位を得ております。したがって、Gram もまた Ehrlich が得意としたアニリンを基礎とした血液の染色法は知っていたこととなります。

一方、Gram が細菌学の研究に入るようになった動機には、1883年にコペンハーゲン大学の細菌学の

教授 Salomonsen (註3) の講義を聴いたことによるとした伝記もありますが、実際の Gram は細菌学を専攻しようとしたのではなく、内科医としての経験を積み上げることにありました。そのために Salomonsen の紹介で大学院としての認定を受けているベルリンの Friedrichshain 病院に研修留学にきていたことになります。同病院には Friedländer が1881年から教授として在籍しておりました。Gram はそこで腎臓の組織を染め分ける研究に従事しております。何故 Gram が腎臓に興味を抱いたのか分からないとする説もありますが、Friedländer は1883年に髄膜炎菌性敗血症における腎皮質壊死の第1例を報告⁴⁾しています。恐らく、そのために腎組織を染め分けるよう Gram に指示したものと思われます。

Gram は腎組織標本をゲンチアナバイオレットで染めてみましたが、一様に染まるだけで腎組織を識別することはできませんでした。しかし、その標本の上に誤ってアルコールを流してしまったところ、標本が漂白されるということがありました。Gram が漂白された標本を検鏡しますと、細菌らしき物体が標本中に転々と青く染まっているのが観察されました(註4)。Gram はそのことを直ちに Friedländer に報告しております。その時期は Friedländer が50例以上に亘る肺炎で死亡した患者の肺組織から莢膜を有する菌を分離することと、肺の病巣内での菌の存在を明確にして発表⁵⁾しようとしていた2週間前のことでした。Friedländer はその方法を自らの肺組織標本中の細菌の判別に利用できるかもしれないと考えました。組織標本ですから、必ずしも鮮明な像としては観察されませんでした。1883年11月に公表された Friedländer の報告⁵⁾では、Gram の方法にしたがって染色した標本中に濃い青色に染まる球菌が観察されたと記載されています。

ただし、この Friedländer の報告には留意すべきことがあります。それは Friedländer は同上の肺組織から検出される細菌について、追加実験としてさらに2例の肺切片の培養をしております。重要なことは、その際に検出された菌はそれまでに得られた

註3: Salomonson (1849年生～1924年没)は Koch や Pasteur と同世代に生きた細菌学者で、1882年に Koch の研究所を訪れ、結核菌の染色法について Koch の手法を学んでおります。

註4: 肺炎で死亡した患者の腎臓からチェーン状に繋がった球菌を顕微鏡下で観察したのは Koch です。当時は肺炎や髄膜炎に伴って発症する敗血症と共に、腎盂腎炎に伴う尿路性敗血症の例も多かったと推察されます。また、それに伴って剖検によって腎組織内に球菌あるいは桿菌が多数に観察される例も多かったと思われる。

「爪状に膨隆した大きな集落」とは異なり、「中央が陥凹した小さな集落」であったことです。そして、小さな集落の菌については Gram の方法にしたがって染色をしておりますが、アルコールで脱色しても青く染まったままであることをも確認しております。しかし、Friedländer はこの小さな集落の菌についての検討はそれ以上行わずに、先の症例から得られた爪状に膨隆した大きな集落からの菌について動物実験を実施しております。もし、この時に Friedländer が「爪状に膨隆した大きな集落」の菌についてもアルコールで脱色して観察していれば、この二つの菌は明らかに異なる菌であることに気が付いたはずで、そうであれば、その後の Friedländer の対応は全く異なっていたと思われる。

要するに Friedländer は「爪状に膨隆した大きな集落」も「中央が陥凹した小さな集落」も同一の菌と錯誤したことによって、大きな誤りに嵌まり込んでしまったこととなります。正に「九仞の功を一簣に欠いた」といふべきかもしれません。それから、もう一つ重要なことがあります。それは Gram もまた、この時点で Friedländer の誤りに気付いていないことです。しかし、Gram が改めて Friedländer が作成したゲンチアナバイオレットで染色された 20 症例の肺組織標本を観察しようと考えたのは、恐らく後学のために Friedländer が作成した標本を検鏡してみようという軽い気持ちであったと思われる。そして、それらの標本を無水アルコールで洗浄しますと、いずれの標本も脱色されましたが、検鏡すると 19 症例の標本においては脱色されずに青く染まる球菌が標本中に点在しているのが認められましたが、1 例においては漂白されて無色となった菌が観察されました。

Gram はこの事実を自らの著者名で 1884 年 3 月に論文として発表⁶⁾しております。そして、その論文の中で、以下のように記しております。「莢膜を有する球菌によるクループ性肺炎の 1 例において、滲出液の満ちた細胞の総てではないが、多くの球菌が見出されている。そして、それらの菌はヨード剤の

添加の有無にかかわらず、アルコールで容易に漂白される。Friedländer が動物の感染再現実験に用いた菌は、総てこの症例から検出された菌である。Friedländer が実験に供した動物の 25 例の肺組織の標本についても検討したところ、幾つかの症例においてはヨード剤の添加によって脱色されずに青く染まる球菌が見出されたが、それらの菌に莢膜の形成は認められなかった。細菌の莢膜の有無を組織標本中で実証することは困難である」というものでした。

Gram はこの時カウンター染色は施していません。当初の Friedländer の肺組織標本を染色する際にはカウンター染色としてビスマルクブラウンを使用しておりますが、この際のビスマルクブラウンの使用は莢膜を染色する目的で使用されたもので、今日のグラム染色で使用されているサフラニンなどは使用目的は異なります。また Friedländer が「爪状に膨隆した集落」を用いて動物での感染再現実験をした標本に認められた脱色されなかった青色の菌は肺炎球菌ではなく汚染によるものと思われる。

しかし、ここでも解しかねることがあります。それは当時の Friedländer は Gram が論文を投稿した医学誌“Fortschr Med”の編集委員をもしておりました。Friedländer が公表している論文も“Fortschr Med”によるものが多いのですが、そのことから考えると Gram の書いた論文も公表される前に Friedländer は目を通してははずです。それなのに何故 Friedländer は自らの見解の誤りを訂正することもなく、4 月のベルリンで開催された内科学会に「真性の肺炎」と題する発表をしたのでしょうか（註 5）。そして彼の演題の一つ前に組まれた Fränkel の演題によって、彼が肺炎の原因菌とした菌は真の病因菌でないと否定された時に、何故グラム染色のことを話さなかったのでしょうか。先に Friedländer は「九仞の効を一簣に欠いた」と記しましたが、そうではなく彼の頭の中には菌の変異に関する奇妙な確信があったのかもしれないとの思いがいたします。

いずれにしても Gram は彼が公表した論文⁶⁾の最後に「この染色法を用いると Schizomycetes の検査

註 5: 1884 年 4 月にベルリンで開催された内科学会での Friedländer の発表演題は、抄録によりますと“Die genuine pneumonie” (Verhandl Kong inn Med. 3 : 31, Apr 1884) となっております。また、この学会で Friedländer の研究の誤りを初めて指摘した Fränkel の演題は“Ueber die genuine Pneumonie” (ibid. 3 : 17, Apr 1884) で Friedländer の演題とほぼ同様な演題で、Friedländer の一つ前に発表しております。どちらが本当の真性 (genuine) に肺炎であったのか、人生の皮肉さを感じます。

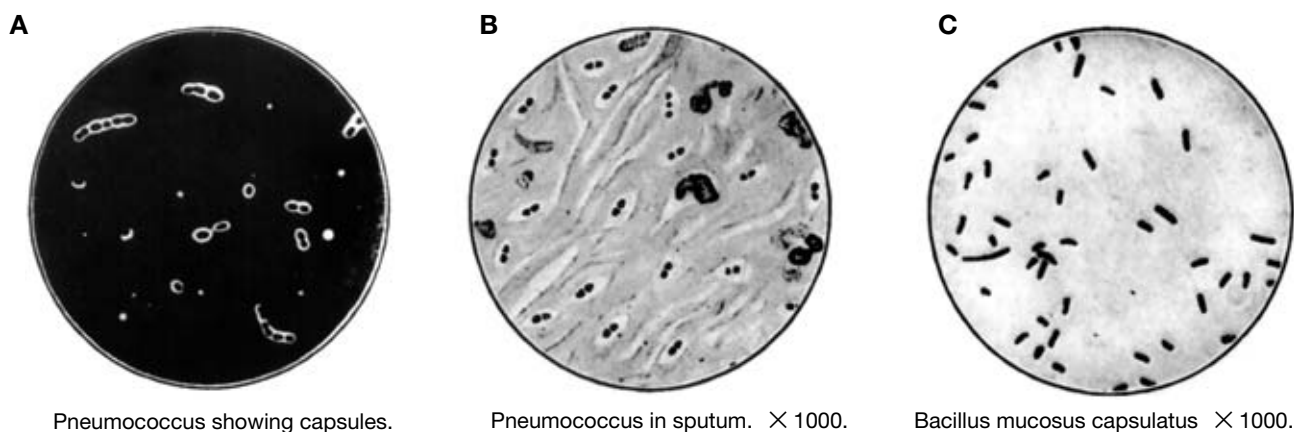


図1

1916年に発行された細菌学書 (Bacteriology. General, pathological and intestinal. Ed Al Kendall. Philadelphia & New York. 1916) に掲載されている肺炎球菌と肺炎桿菌の模写図です。グラム染色が公表されたのは1884年ですから、何年頃に発行された細菌学書から色刷りのグラム染色像が表示されるのかと考え、1919年までに発行された手許にある本(数冊)を調べてみましたが、殆どが文章による説明のみで、写真はもとよりイラストもあまり参考になるようなものが掲載されていません。図Aには当時 Friedländer と Fränkel の肺炎球菌についての論争があったことから、菌そのものより、莢膜を有しているか否かということの方が重要視され、莢膜染色は一般の染色法よりも先に Hiss の染色法や墨汁法(当時はインドインクを使用)がよく用いられておりました。図Bは肺炎球菌の喀痰像(こんなにきれいに見えることはありませんが)、図Cに肺炎桿菌(当時はまだ Klebsiella 属としての分類ではなく、標記のとおり、*Bacillus mucosus capsulatus* として、むしろ鼻硬化症の起炎菌として注目されていました)を示しますが、莢膜を有するといっても、肺炎球菌との相違は明らかなようにみえますが、グラム染色がまだ未公開の時代に Friedländer は何故間違ったのでしょうか。

は遥かに容易になるが、不完全な部分があることも承知の上で公表することとした。願わくば他の研究者によって実用性が高められることを願っている」と書いております。

しかし、Friedländer と Fränkel の論争の間においては、Gram の論文は全くといってよいほど無視されております。わずかに Friedländer が反論する言葉に窮して1886年に「Weichselbaum が肺炎から双球菌を培養できたのは全症例中の3分の2である。それらの菌が Fränkel の主張する菌と一致するとしても、肺炎の肺組織を顕微鏡下で観察して双球菌を最初に見出したのは当方である。Gram の考案した染色では球菌は染色され、桿菌は漂白されるが、共に莢膜を有していることが重要で、当方が見出した桿菌でも大葉性肺炎は惹起される」という見解を述べる際に引用されたという程度のものでありました。

当時のドイツで発行されている細菌学の成書を調べると、Gram の論文発表2年後の1886年に発行された Flügge 編集の“Die Mikroorganismen”によると、グラム染色のことを23行に亘って文中に記載しています(註6)。そして、そのパラグラフの冒頭には「Gramの方法は組織の中の菌を染め分けることに役立つ。また多数の菌種の鑑別診断についての意味をも持っている」と記されております。そのことから考えると、当時のグラム染色は病巣内に菌が存在するか否かということの証明と、その病巣にある細菌の菌種を鑑別する検査法として役に立つとして捉えられていたようです。いずれにしても、今日のグラム染色が持っている臨床的意義とは多少意味が異なっていたと言わねばならないでしょう。

しかし、それから10年後の1896年に改編された同書によりますと、大幅に改修されてグラム染色の

註6: 該当する細菌学の成書は1886年にLeipzigのVogel社より出版された“Die Mikroorganismen. Mit besonderer Berücksichtigung der Ätiologie der Infektionskrankheiten”の第2版ですが、衛生学の教科書をBreslau大学の衛生学教授 Flügge C が大きく改修して編集したということもあって、第1版の編集スタイルに準じて分担執筆者の記載がされておられません。この書を選んだ理由は、本文で述べたようにGramが論文を発表したのが1884年ですから、それになるべく近い時期に発行された書であったからです。ただし、この原著は手許ではなく、手許にあるのは英語版でKing college HospitalのCheyne WWの訳でLondonのThe New Sydenham Societyより出版されたものです。該当する記述はpp784-785に記されています。



グラム染色 ×1000

図2

図1の説明でも述べたように、当時の細菌学書を調べてみても、グラム染色の紹介や手順は記載されていますが、実際のグラム染色像は掲載されておりません。この図は1913年発行の“Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Ed W Kolle & A Wassermann. 6 Bd, Jena, Gustav Fischer. 1913”に掲載されていた、たった1枚のカラーのグラム染色像です。致死量である連鎖球菌をマウスの臀部に接種後5日目の膿瘍形成部位からの膿汁を染めたとの記載があり、以下のように説明しております。レフレルによるメチレンブルー染色法では一様に染まって組織と菌との区別が困難であるが、グラム染色では鮮明に区別されるとあります。参考までに記しておきますが、このグラム染色像は1923年のHuckerらによってカウンター染色としてサフラニンが使用される以前の像です。この像の説明では青く染まる連鎖球菌のこののみが強調されていますが、むしろ、赤く染まった白血球の周囲に散らばる赤い小さな顆粒の方が気になります。

方法を「組織標本の染色」と「細菌の鑑別」という二つの項目に分けて3頁に亘って書かれています(註7)。また、組織標本の染色にはGram-Güntherの変法やWeigertの変法なども記載されており、アニリン水加ゲンチアナバイオレットに変わってクリスタルバイオレットを使用すると鮮明な像が得られるということも記載されています。

グラム染色が一般的な細菌の鑑別とその有無に実際に活用され始めたのは1920年頃からと思われます。それに伴ってさまざまな改良がなされました。代表的な改良が行われた文献の主なものを参考文献として記載^{8~17)}(註8)しましたが、スペースの関係

上、これ以上のグラム染色にかかわる記述は控えさせていただきます。しかし、グラム染色は数々の改良が加えたにもかかわらず、その名を変えずに今日まで日常の診療に使われていることを最後に申し上げておきたいと思います。

Gramはその後スイス、イタリアを周って、ストラスブルグでジギタリス製剤の用法や中毒にかかわる薬理学の研修を受けていますが、1885年にコペンハーゲンに戻って開業医となっております。数年後、招かれてコペンハーゲン大学で薬理学の講師を兼任し、その間には薬学関連のCommissionの議長をも務めておりますが、何よりも医学部の教育に熱

註7: 該当する書は上記“Die Mikroorganismen. Mit besonderer Berücksichtigung der Ätiologie der Infektionskrankheiten”の第3版で、1896年にFlügge Cの編集で出版されたものですが、執筆者はKolle Wによるものでpp539-541に記述されています。また、同様な記述はFriedberger E. Die allgemeinen Methoden der Bacteriologie. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Ed Koll W, Wassermann A, Gustav Fischer, Jena. Erst Bd, 1903. pp414-435にも記述されています。

註8: グラム染色の改良にかかわる論文は1920年頃から目に付き始めております。その中でグラム染色を汎用し易いように改良したのはHuckerらによって、退色し易いアニリン水加ゲンチアナバイオレットをクリスタルバイオレットに変えたこととカウンター染色としてサフラニンを使用したことが挙げられます。その他の改良もグラム染色の一次染色の変法、ヨード剤の変法、さらには脱色剤としてのアルコールの変法など、各手順において用いる試薬に及んでいます。

心であったということ、1900年には医学部の教授に推挙されておりますが、それを辞退したという極めて謙虚で誠実な人柄であったようです。一般の人々からも信望の厚い臨床医として受けとめられていたということです。Friedländer とはその後も親しくしていたようですが、Friedländer が結核で早く亡くなられたことを悲しんだということです。しかし、グラム染色について書いた論文は前記の一篇のみで、その後は細菌にかかわる論文は一篇も書いておりません。Friedländer の肺組織標本での一件に心の痛みを感じていたように思われます。

ようやく同世代に生きた Ehrlich と Gram という二人の細菌にかかわる研究をしてきた医師の生き方について書き終えるところに到達しました。このシリーズの冒頭にも記したことですが、Ehrlich が成し遂げた研究成果に比して Gram が為し得た研究は菌を染色するというたった一つのことだけです。しかし、グラム染色の名は多くの改良が加えられていますが、今日でも最も大切な検査法の一つとして、多くの医療関係者の日常的な会話の中で交わされている用語であります。それに比して Ehrlich の名は、彼が展開した華麗な論理は今も医療の底辺を流れています、日常の医療会話の中に出ることは滅多にありません。

研究者としては Ehrlich を見習うべきなのか、それとも Gram に共感を抱くのか、さらに付け加えるならば、志賀潔や秦佐八郎のような研究姿勢（本シリーズ Paul Ehrlich と Hans Christian Gram (その1)、(その2) 参照) を一時的でも体験することが必要なのか、さまざまな思いをこれらの記述から感じとって頂ければ有り難いと考えております。

文 献

- 1) Jarisch A. Therapeutische Versuche bei Syphilis. Wien med Wschst. **45** : 721-771, 1895.
- 2) Herxheimer K, Krause I. Über eine bei Syphilitischen vorkommende Quecksilberreaktion. Dtsch med Wschr. **28** : 895-897, 1902.
- 3) Ehrlich P, Berthein A. Über das salzsaure 3,3'-Diamino-4,4'-dioxarsnobenzol und seine nächsten Verwandten. Berch Dtschr Chemisch Gesell. **45** : 756-766, 1912.
- 4) Friedländel C. Über Nephritis scarlatinosa. Fortschr Med. **1** : 81-89, 1883.
- 5) Friedländel C. Die Mikrokokken der Pneumonie. Fortschr Med. **1** : 715-733, 1883.
- 6) Gram C. Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. Fortschr Med. **2** : 185-189, 1884.
- 7) Friedländer C. Weitere Arbeiten über die Schizomyceten der Pneumonie und der Meningitis. Fortschr Med. **4** : 702-705, 1886.
- 8) Atkins KN. Report of Committee on descriptive chart. Part III. A modification of the gram stain. J Bacteriol. **5** : 321-324, 1920.
- 9) Kopeloff N, Beerman P. Modified gram stains. J Infect Dis. **31** : 480-482, 1922.
- 10) Hucker GJ, Conn HJ. Method of Gram staining. NY St Agric Exp Stn Geneva Tech Bull. **93** : 1-37, 1923.
- 11) Davis JC. A gram stain for smears of blood cultures, body fluids and tissues. Am J Med Technol. **42** : 417-426, 1976.
- 12) Burdash NM, Bennet CE, Glassman AB. Bacterial gram staining by conventional and strip methods. Health Lab Sci. **14** : 282-283, 1977.
- 13) Lauer BA, Reller LB, Mirrett S. Comparison of acridine orange and Gram stains for detection of microorganisms in cerebrospinal fluid and other clinical specimens. J Clin Microbiol. **14** : 201-205, 1981.
- 14) Mirret S, Lauer BA, Miller GA, et al. Comparison of acridine orange, methylene blue, and Gram stains for blood cultures. J Clin Microbiol. **15** : 562-566, 1982.
- 15) Mansour JD, Schram JL, Schulte TL. Fluorescent staining in intracellular and extracellular bacteris in blood. J Clin Microbiol. **19** : 453-456, 1984.
- 16) Clarridge JE. Gram-positive bacilli. Clinical and Pathogenic Microbiology. Ed. BJ Howard. Chicago, Mosby. 1987, pp417-433
- 17) Romero S, Schell RF and Pennell DR. Rapid method for the differentiation of Gram-positive and Gran-negative bacteria on menbrance filters. J Clin Microbiol. **26** : 1378-1382, 1988.