




令和5年度 結核研修会

2024年3月2日




結核菌の検査

南京都病院 臨床検査科

佐藤 葉月





世代時間が長い(1分裂にかかる時間)

→ 12~24時間(一般細菌:10分~1時間)

結核菌

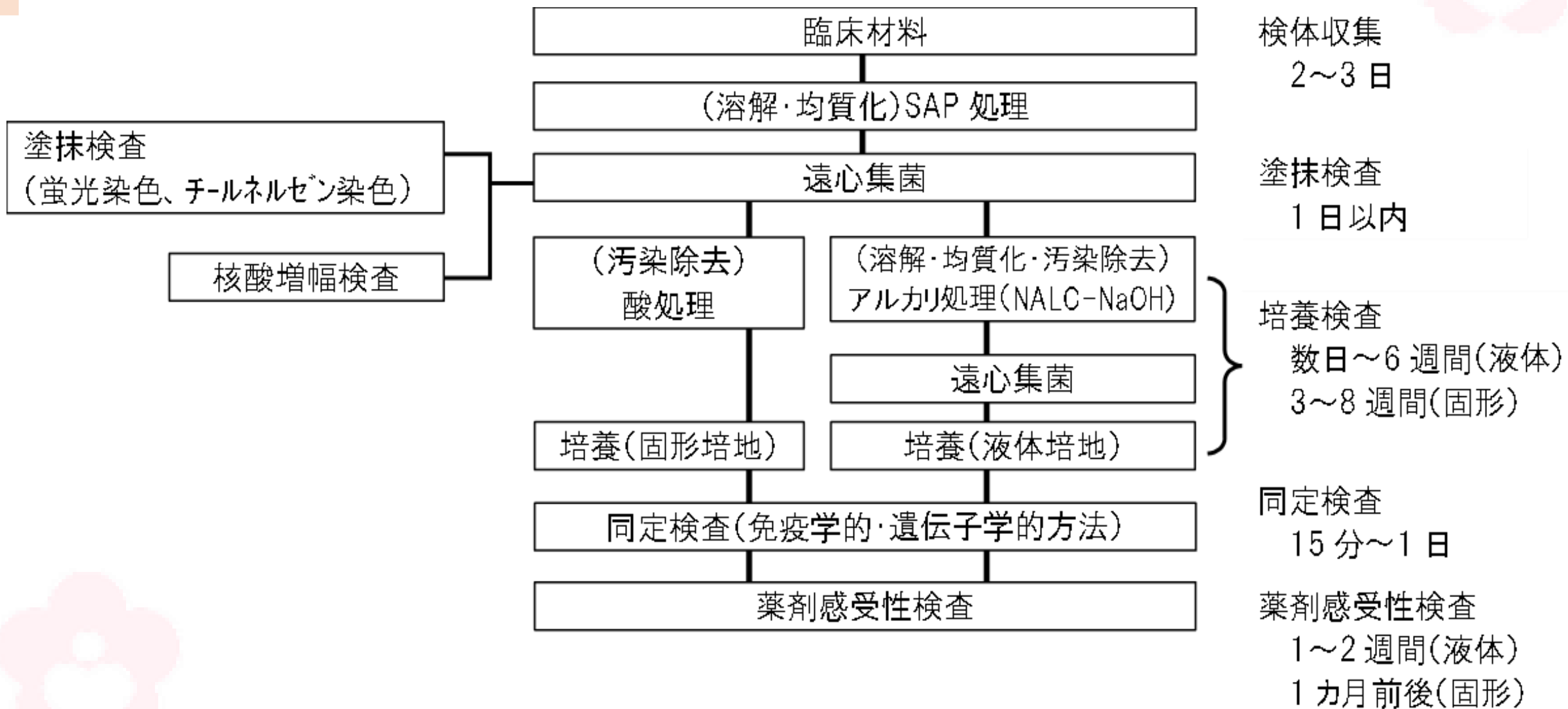
空気感染をする。

菌体に脂質が多いので、特別な染色法が必要。

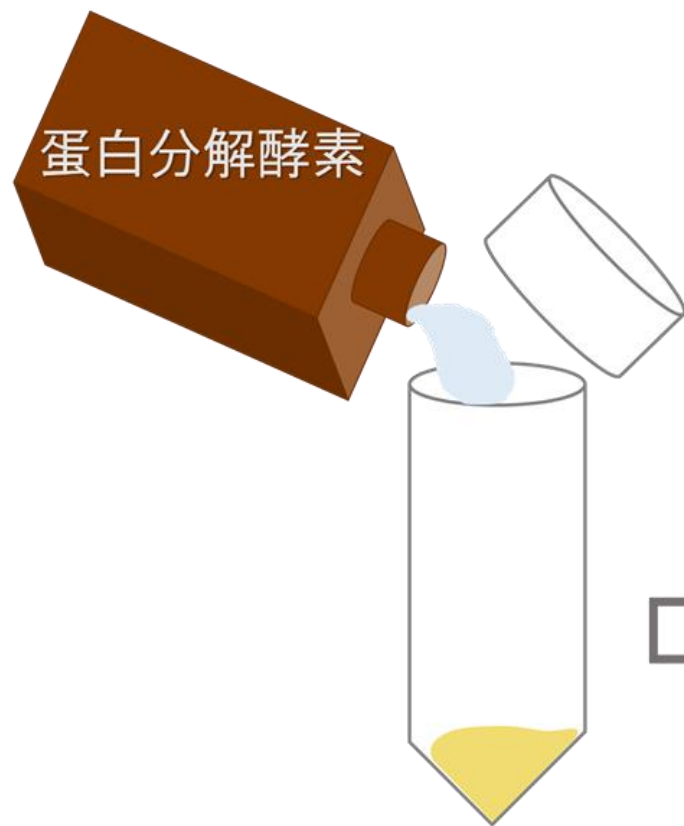
→ 一般細菌の染色法では染まらない。



結核菌検査の流れ

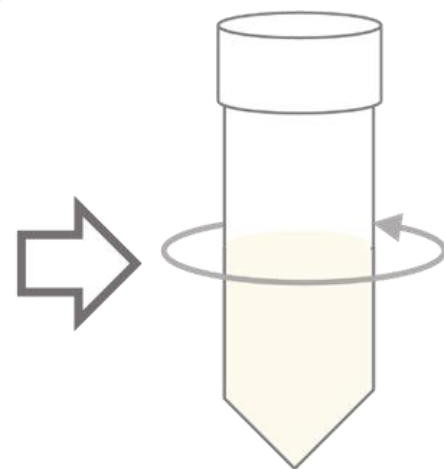


検体前処理(喀痰の均質化処理)

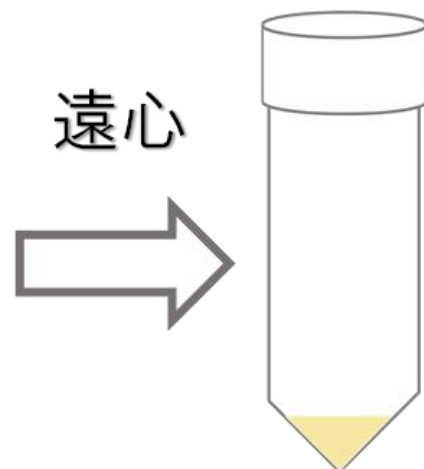


蛋白分解酵素

蛋白分解酵素で
粘稠性除去



サラサラになるまで
攪拌



遠心

上清を
捨てる



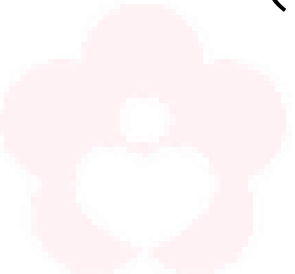

塗抹標本
→ 染色・鏡検

培養検査

核酸増幅検査

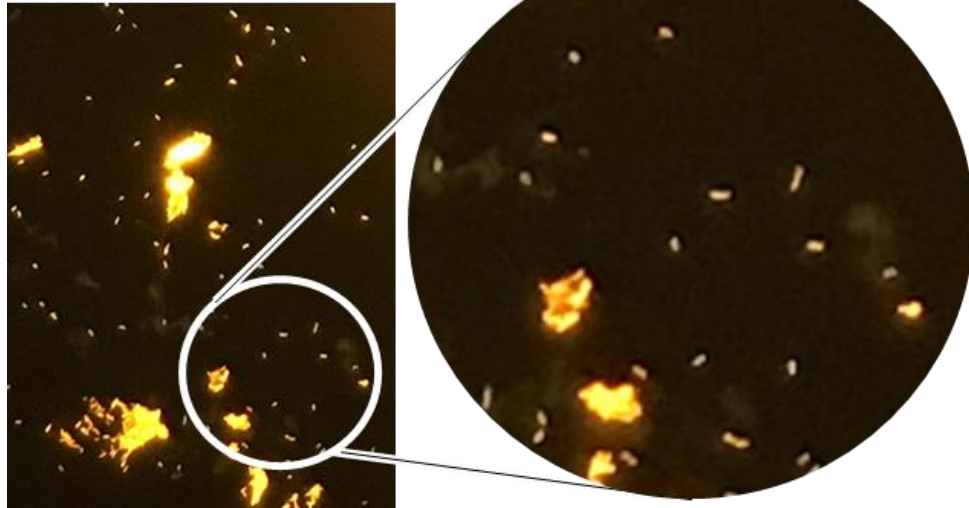


塗抹検査

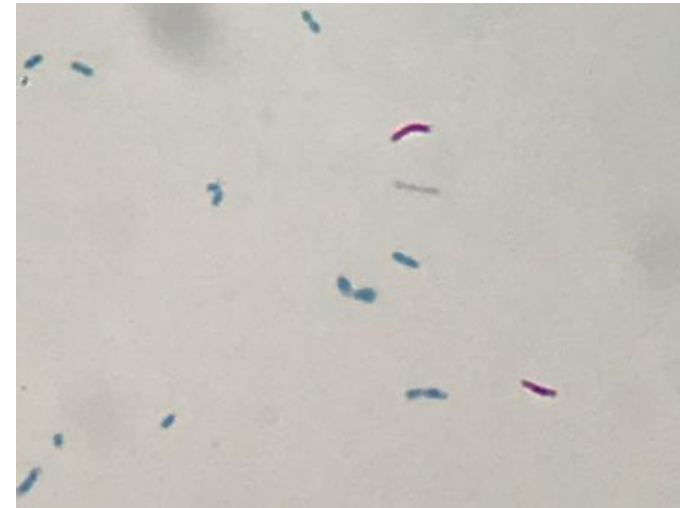
- 抗酸菌の有無、菌量が分かる。
(入院の必要性の判断、接触者への感染リスク、治療経過、
退院時期の判断など)
- 
- 

抗酸菌染色

蛍光染色(×200)



チールネルゼン染色(×1000)



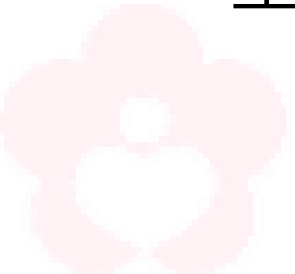

記載法	蛍光法 (200倍)	チールネルゼン法 (1000倍)	相当する ガフキ-号数	菌量 (CFU/mL)
—	0 / 30 視野	0 / 300 視野	G0	≤ 3,000
±	1~2 / 30 視野	1~2 / 300 視野	G1	3,000 - 10,000
1+	1 ~ 19 / 10 視野	1 ~ 9 / 10 視野	G2	10,000 - 200,000
2+	> 20 / 10 視野	> 10 / 100 視野	G5	1,000,000
3+	> 100 / 1 視野	> 10 / 1 視野	G9	10,000,000

塗抹検査の特徴

- 迅速結果報告ができる。(約1時間)
 - 排菌量が多い患者の鑑別が可能。
 - コストが安い。
-
- 他の検査方法に比べ、感度が劣る。
 - 塗抹陽性であっても、結核菌とは限らない。

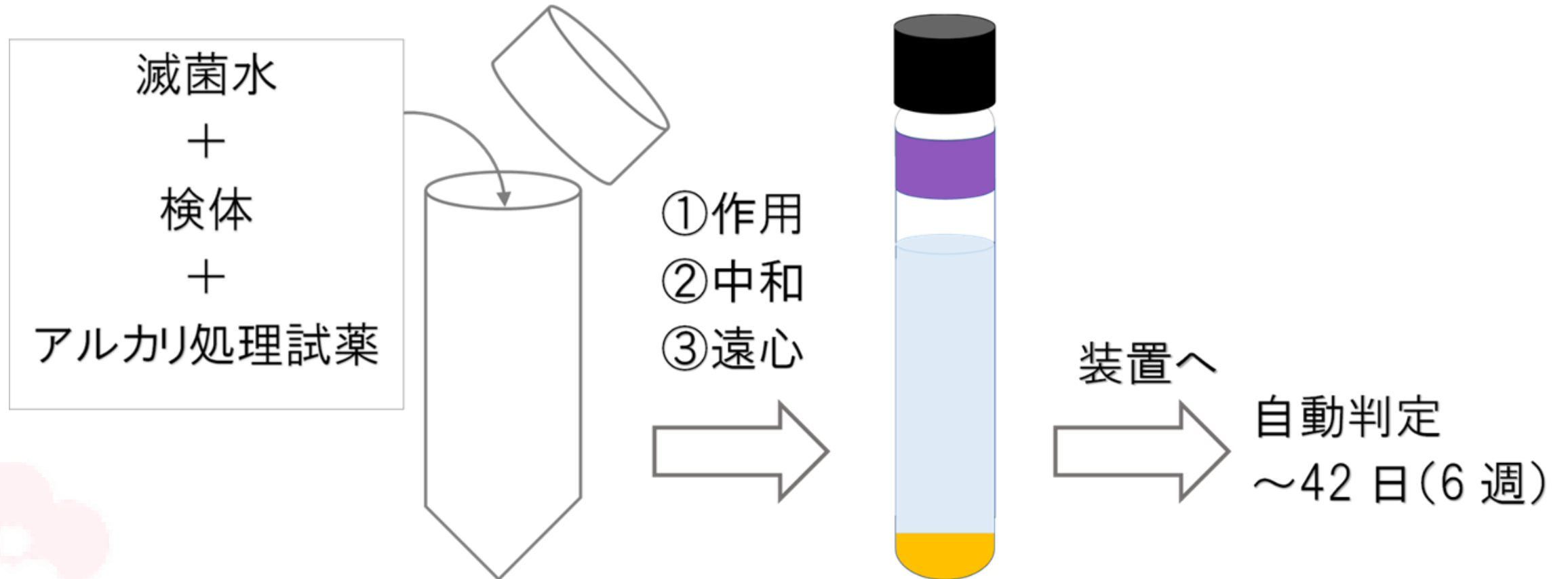


培養検査

- 培地に接種し、菌を育てる。
 - 生きて菌がいることを証明できる唯一の方法。
- 
- 

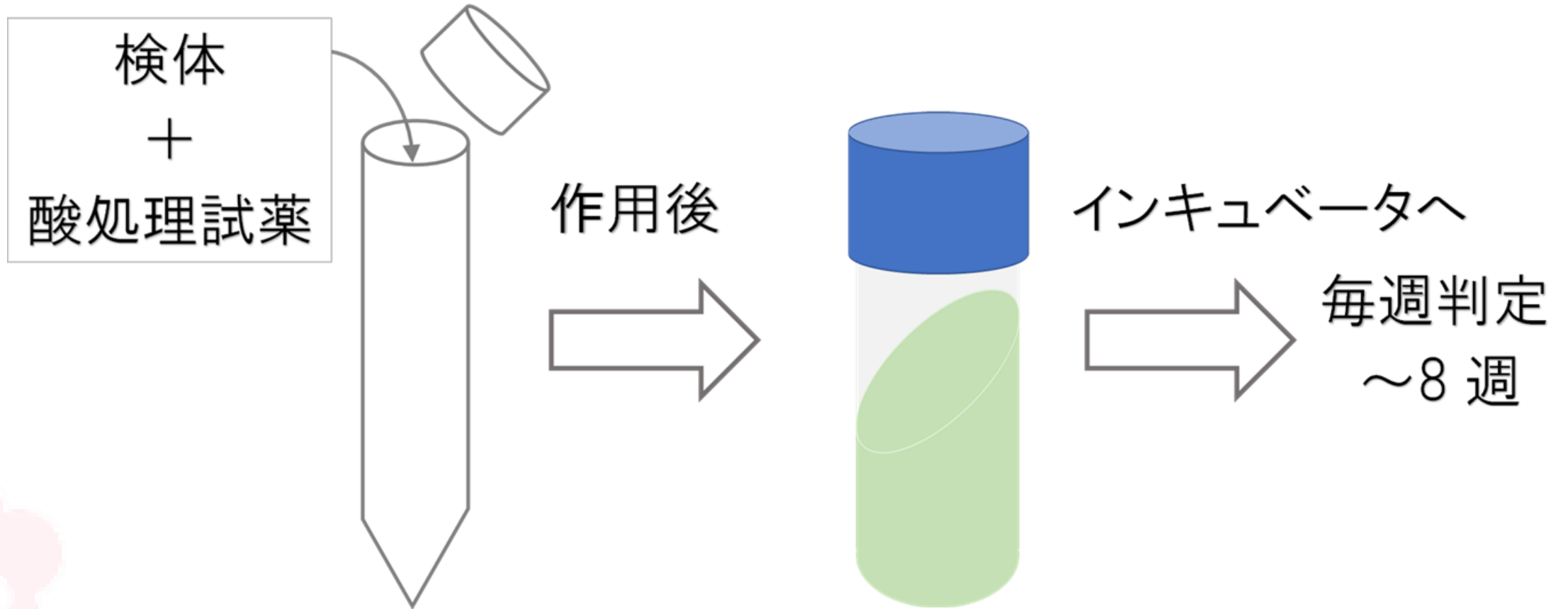
液体培養(MGIT)

- アルカリ性試薬による前処理



固形培養(小川培養)

- 酸性試薬による前処理

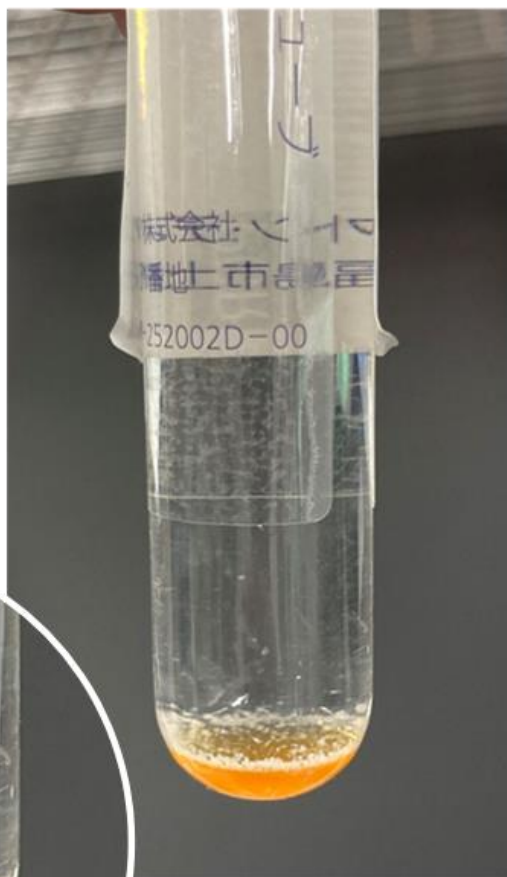
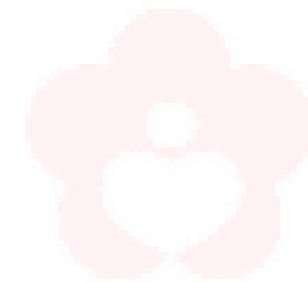


培養検査の特徴

- 感度が良い。
- 同定、薬剤感受性検査が実施できる。

液体培地	長所	<ul style="list-style-type: none">・ 感度、迅速性に優れる。・ 発育後はそのまま薬剤感受性検査に用いることができる。
	短所	<ul style="list-style-type: none">・ 複数菌の混在に気づくことが難しい。・ コストが高い。
小川培地	長所	<ul style="list-style-type: none">・ コロニーを目視できるため、複数菌の混在が確認できる。・ コストが安い。
	短所	<ul style="list-style-type: none">・ 感度、迅速性は液体培地に比べ、劣る。

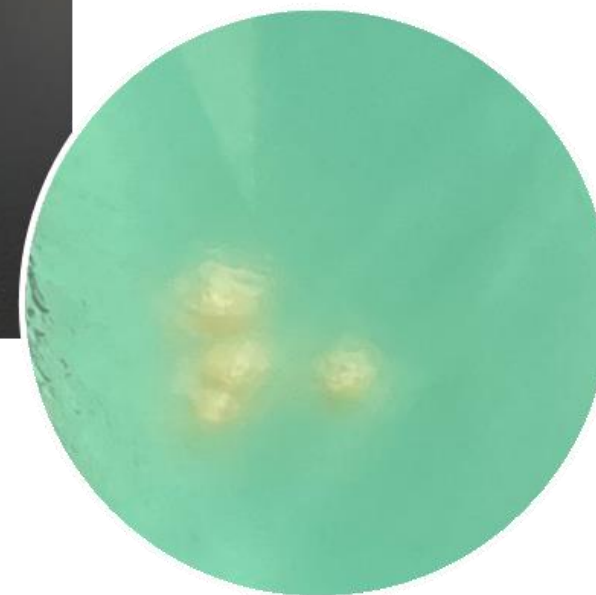
陽性菌株



液体培養



固形培養



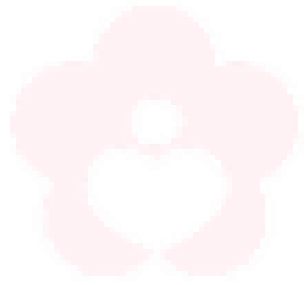


核酸増幅検査

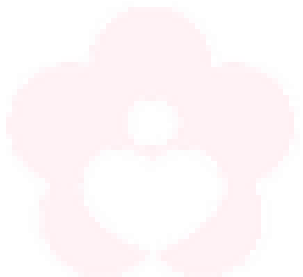
同定・薬剤感受性検査



核酸増幅検査

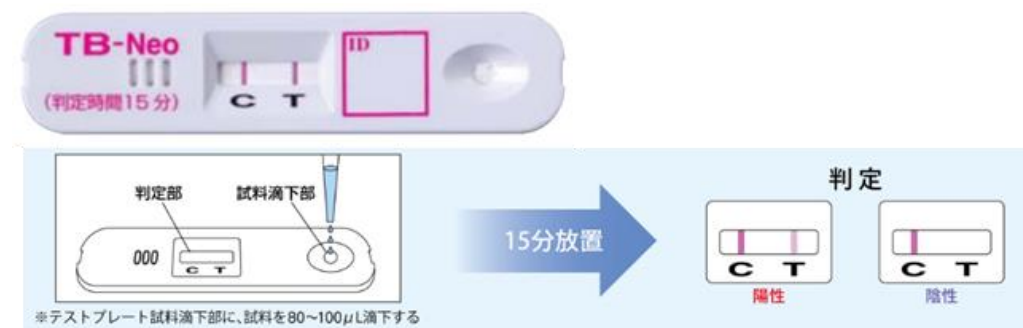


- 検体から、DNA・RNAを抽出～増幅～検出することで、結核菌の有無を確認する方法。
- 薬剤耐性遺伝子の変異を検出できるものもある。



同定検査

- 結核菌群抗原定性：免疫クロマト法(MPB64蛋白検出)
 - 結核菌群が特異的に産生するMPB64蛋白を検出する。

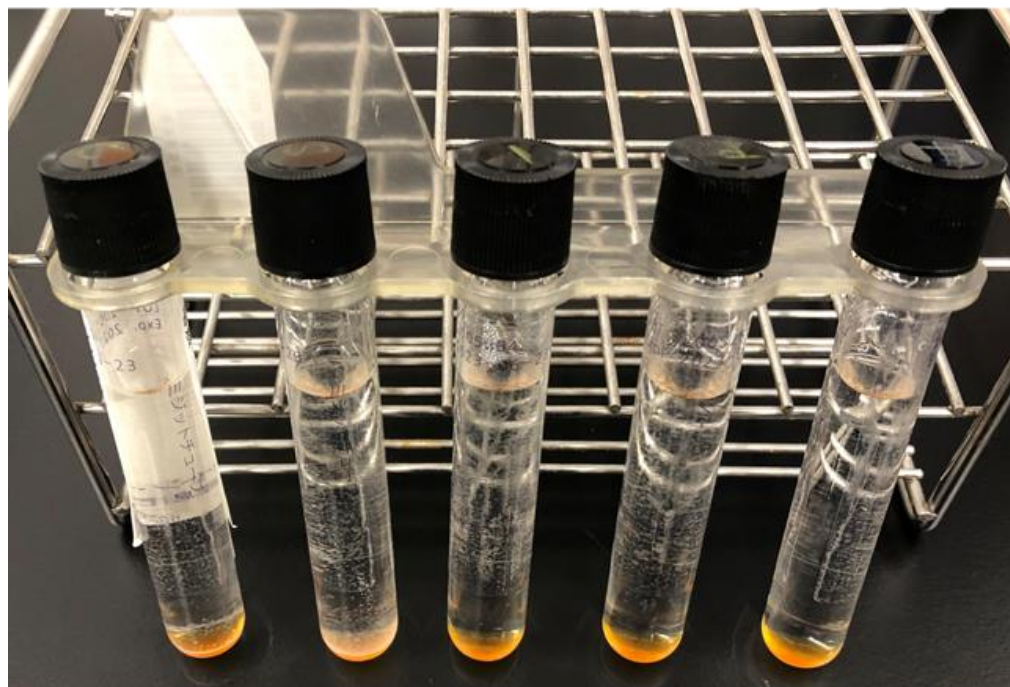


- 核酸増幅検査
 - 一部の結核菌において、MPB64非産生株が存在するため培養菌液の染色でコード形成(右写真)が見られた場合は核酸増幅検査を実施する。



薬剤感受性検査

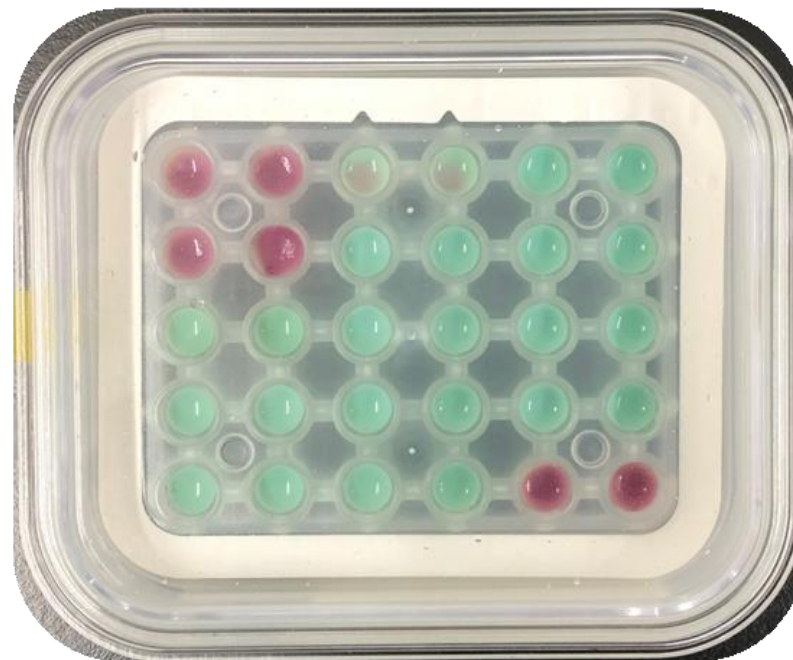
液体培地を用いた方法



対照 SM INH REF EB

PZA も測定可能

固形培地による比率法



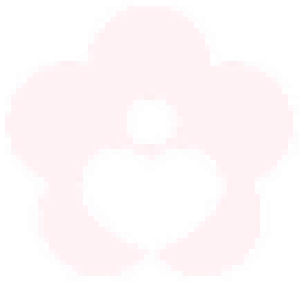
C+	C+	C 1/100	C 1/100	C-	C-
SM 10	SM 10	INH 0.2	INH 0.2	INH 1.0	INH 1.0
RFP 40	RFP 40	EB 2.5	EB 2.5	KM 20	KM 20
EVM 20	EVM 20	TH 20	TH 20	CS 30	CS 30
PAS 0.5	PAS 0.5	LVFX 1.0	LVFX 1.0	C+	C+

結果の解釈

- 液体培養 > 固形培養 ≒ 核酸増幅検査 > 塗抹検査

	塗抹	培養	結核菌 同定	結核菌 核酸増幅	
結核菌	+	+	+	+	菌量少量
	—	+	+	+	
	—	+	+	—	
NTM*	+	+	—	—	菌量少量
	—	+	—	—	
死菌	+	—	/	+	死菌:結核菌
	—	—	/	+	死菌:結核菌(菌量少量)
	+	—	/	—	死菌:NTM

*NTM:結核菌以外の抗酸菌(非結核性抗酸菌)

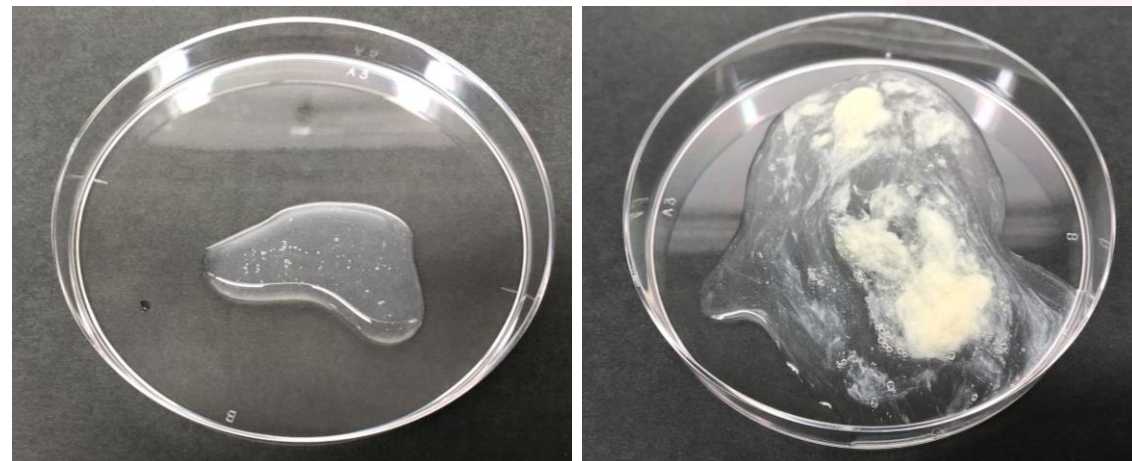


検体採取・保存



検体採取

- 結核菌は全身に感染巣を作るため、あらゆる部位の検体が検査対象になる。
- 呼吸器感染症が多いため、検査材料の多くは喀痰である。
- 喀痰の質や量は検査感度に大きく影響する。



喀出痰の肉眼的評価法(Miller & Jones法)

分類	喀痰の性状
M1	唾液、完全な粘液痰
M2	粘液痰の中に少量の膿性痰を含む
P1	膿性部分が全体の1/3以下の痰
P2	膿性部分が全体の1/3～2/3の痰
P3	膿性部分が全体の2/3以上の痰

検体の保存方法

<冷蔵保存(4℃)>

- すぐに検査できないときは、この保存方法で！！

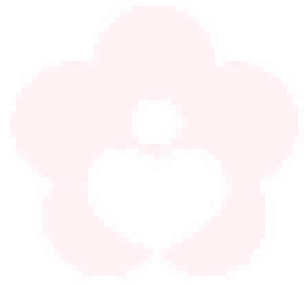
<室温保存>

- 雑菌が増殖し、培地汚染の原因になる。
- 時間経過とともに、抗酸菌の検出率を低下させる。

<凍結保存>

- 検出率を低下させる。

検体の採取時の注意点



＜良質な喀痰を採取するために＞

- 排痰指導
- ネブライザー

＜感染管理＞

- 採取場所：採痰ブースまたは陰圧個室、戸外換気のできる個室など。
- 喀痰吸引：N95マスク、フェイスシールドを含む、PPE装着が必要。



検体の採取頻度について

< 診断目的 >

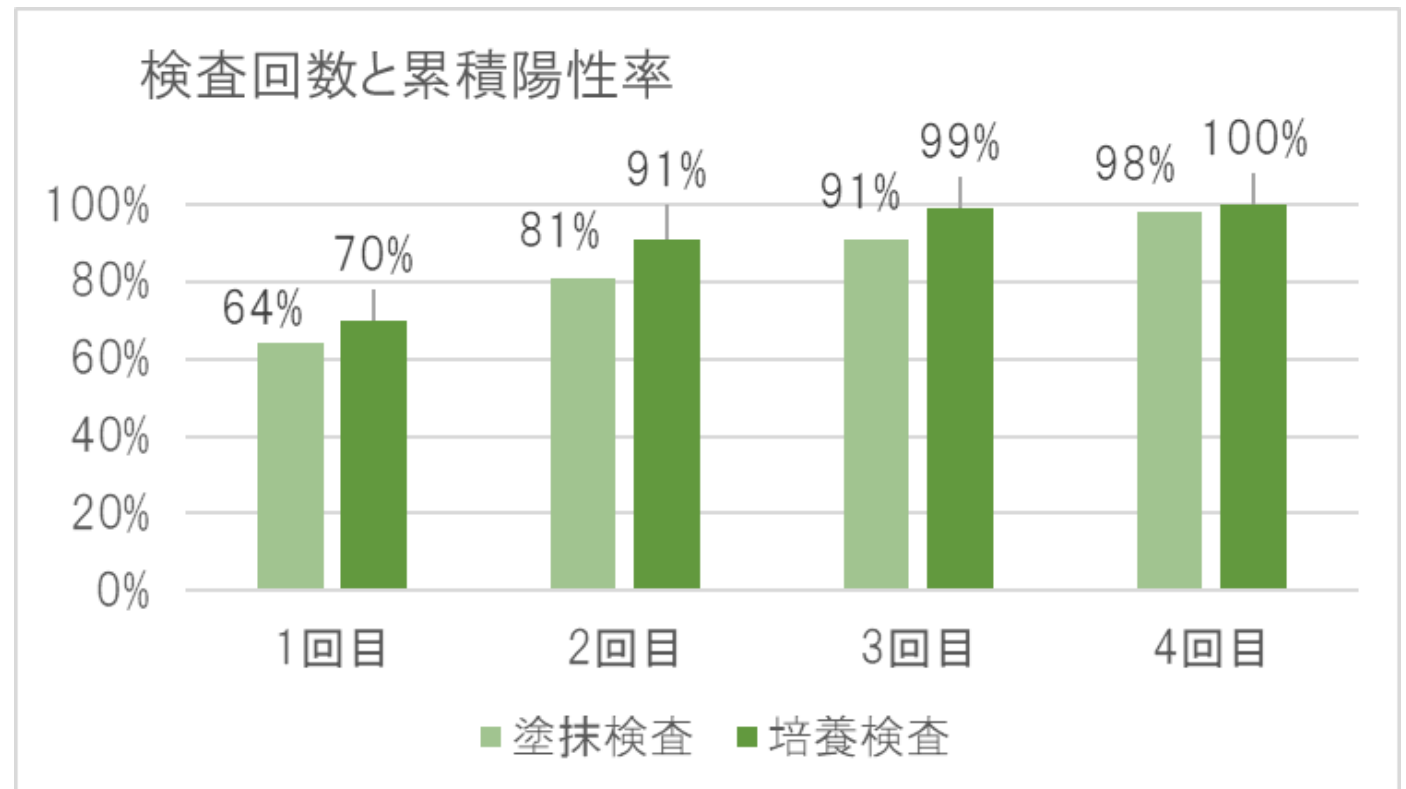
- 3日連続の喀痰検査(3連痰)

< 化学療法開始後 >

- ~4週間: 2週間に1回(経過観察)
- 4週間~: 少なくとも毎月1回

複数回の検体提出

- 結核の診断には、基本的に連続3回の喀痰検査が必要。
(質のよい喀痰であることが必須)



まとめ

- 各々の検査には特徴がある。
- 結果の解釈(塗抹検査、核酸増幅検査、培養検査、培養同定)ができることが大切。
- 採取された検体の質や保存方法によって、検査結果に影響がある。