

抗酸菌培養検体の前処理方法の検討

紙谷 宜行, 松本 英伸, 中田 隆三

北海道社会保険病院 検査部

Key Words :

抗酸菌 MGIT 前処理 雑菌汚染

要 旨

抗酸菌培養検査を目的として提出される臨床検体の大半は抗酸菌以外の一般細菌に汚染され、検体を消化及び汚染除去の前処理をする必要がある。当院では一般細菌による雑菌汚染率が高く、前処理方法の検討で喀痰溶解酵素を用いて検体を十分均質化させる操作とNALC-NaOH溶液を用いて検体を消化及び汚染除去する操作に重点を置き検討した。その結果、喀痰溶解酵素で検体を十分に均質化させ、かつNALC-NaOH溶液を加えてから激しく頻りに攪拌することなく、検体の消化及び汚染除去することで雑菌汚染率を低下させることは可能であった。

はじめに

抗酸菌感染を疑い、抗酸菌培養検査を目的として検査室へ提出される喀痰、気管支洗浄液などの臨床検体の大半は抗酸菌以外の一般細菌に汚染されている。抗酸菌の検出を最大限にし、選択的に培養するためには汚染されている検体を消化及び汚染除去の前処理をする必要がある。検体の消化及び汚染除去のための前処理をおこなっても抗酸菌以外の雑菌汚染を完全になくすことは難しく、雑菌汚染率を3～5%にすることが望ましいと言われている。しかし、当院では一般細菌による雑菌汚染率が平均約8%と高かったため、雑菌汚染率を低下させる改善策を考え検討をおこなった。

方 法

対 象

2006年6月～12月の間に当院を受診した入院及び外来患者で抗酸菌培養検査の依頼があった喀痰、気管支洗浄液、尿、便、組織などの1,386検体を用いた。

試 薬

喀痰溶解酵素 スプタザイム

(株)極東製薬工業

BBL™MycoPrep™Reagent

(株)日本ベクトン・ディッキンソン

MGIT分離培養剤

(株)日本ベクトン・ディッキンソン

BBL CRYSTAL™MGP

(株)日本ベクトン・ディッキンソン

BBL CRYSTAL™ME/NF

(株)日本ベクトン・ディッキンソン

測定機器

MicroScan WalkAway 40

DADE BEHRING

BACTEC MGIT⁹⁶⁰

(株)日本ベクトン・ディッキンソン

検討内容

- (1) MGIT陽性検体が雑菌汚染されているかを確認し、1ヶ月ごとの雑菌分離結果を調べた。
- (2) 日常業務でおこなっている前処理方法の中で、喀痰溶解酵素で検体を均質化させる操作に重点を置き雑菌汚染率の変化を調べた。ここでは、検体量に対し喀痰溶解酵素をしっかりと3倍量加えること、15分放置の間、5分おきにおこなうボルテックスミキサーでの攪拌をしっかりとこなうこと、そして15分間放置後もまだ均質化されていない検体に関してはさらに攪拌を続け、検体が十分均質

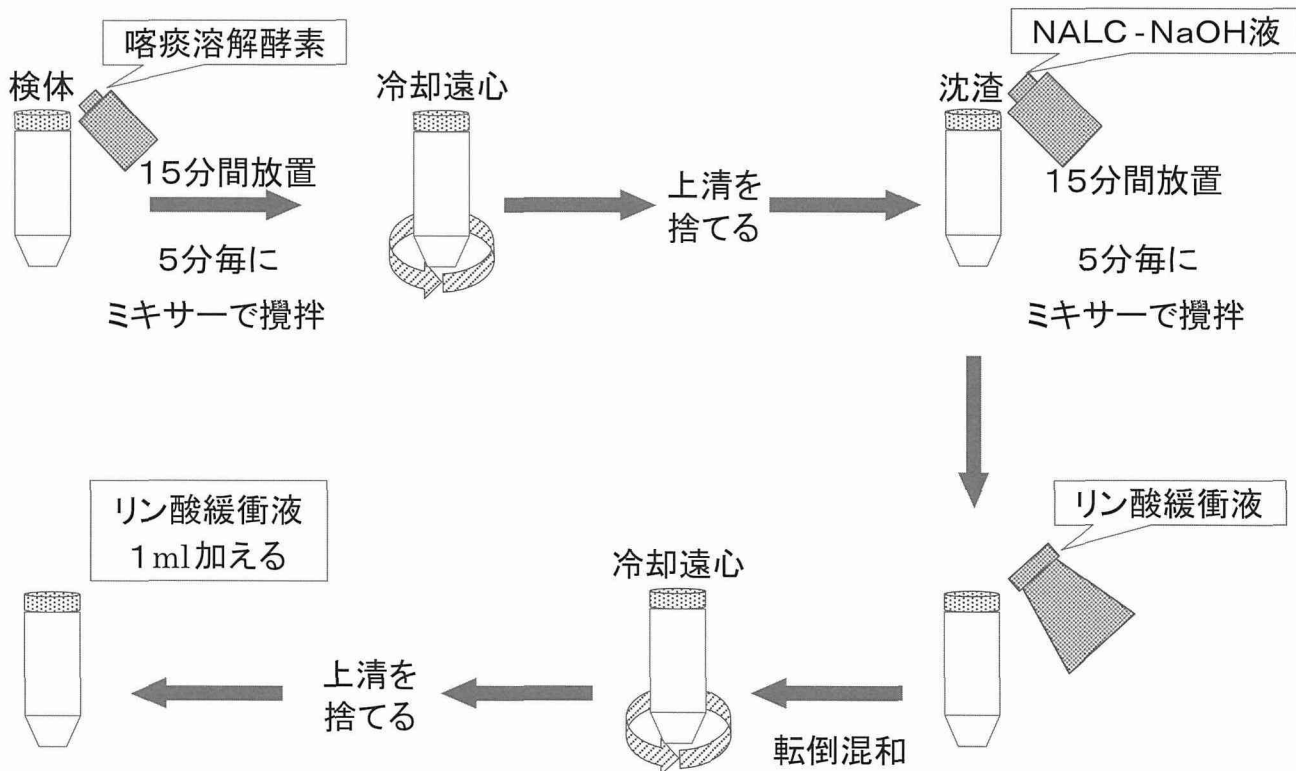


図1 日常業務でおこなっている前処理方法

化されたことを確認するまで操作を意識しておこなった。(検討1)

- (3) 日常業務でおこなっている前処理方法の中で、NALC-NaOH溶液で検体を消化、汚染除去する操作に重点を置き、雑菌汚染率の変化を調べた。ここでは、喀痰溶解酵素で十分均質化させた検体に加え、NALC-NaOH溶液を加えてからおこなう攪拌間隔を5分から3分に変更した。(検討2)
- (4) (3)でのNALC-NaOH溶液を加えてからおこなう攪拌間隔を3分から1分に変更した。(検討3)
- (5) (4)での攪拌方法を手による転倒混和に変更して検討をおこなった。(検討4)

結 果

- (1) 月別MGIT陽性検体中の雑菌分離結果
- 図2に示す通り6～12月において、MGITが陽性となった検体の雑菌汚染を確認した。雑菌汚染していた全84検体のうち、最も多く分離された *Bacillus* spp.が32検体、次いでmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (以下MRSA)が21検体、そしてmethicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (以下MRSE)が13検体とどの月もこの3菌種が大半を占めていた。分離された雑菌の傾向からグ

ラム陽性菌が多いことが判明した。

- (2) 喀痰溶解酵素に重点を置いた検討結果
- 前処理方法の中で、喀痰溶解酵素で検体を均質化させる操作に重点を置き、雑菌汚染率の変化を調べた。6、7月の従来方法でおこなった前処理後のMGIT雑菌汚染率が8.4%、7.5%であったのに対し、喀痰溶解酵素で十分に検体を均質化させた8月の検討1の雑菌汚染率は4.7%であり、従来方法と比べ低下が認められた。
- (3) NALC-NaOH溶液に重点をおいた検討結果
- 前処理方法の中で、NALC-NaOH溶液で検体を消化、汚染除去する操作に重点を置き、雑菌汚染率の変化を調べた。6、7月の従来方法でおこなった前処理後のMGIT雑菌汚染率が8.4%、7.5%であったのに対し、喀痰溶解酵素で十分に検体を均質化し、かつNALC-NaOH溶液を加えてからおこなう攪拌間隔を3分とした9、10月の検討2の雑菌汚染率は5.0%、5.6%であり、従来方法と比べ低下が認められた。しかし、NALC-NaOH溶液を加えてからおこなう攪拌間隔を3分とすることで検体とNALC-NaOH溶液との接触率を上げてみたが、検討1と比べ雑菌汚染率に大きな変化はなかった。

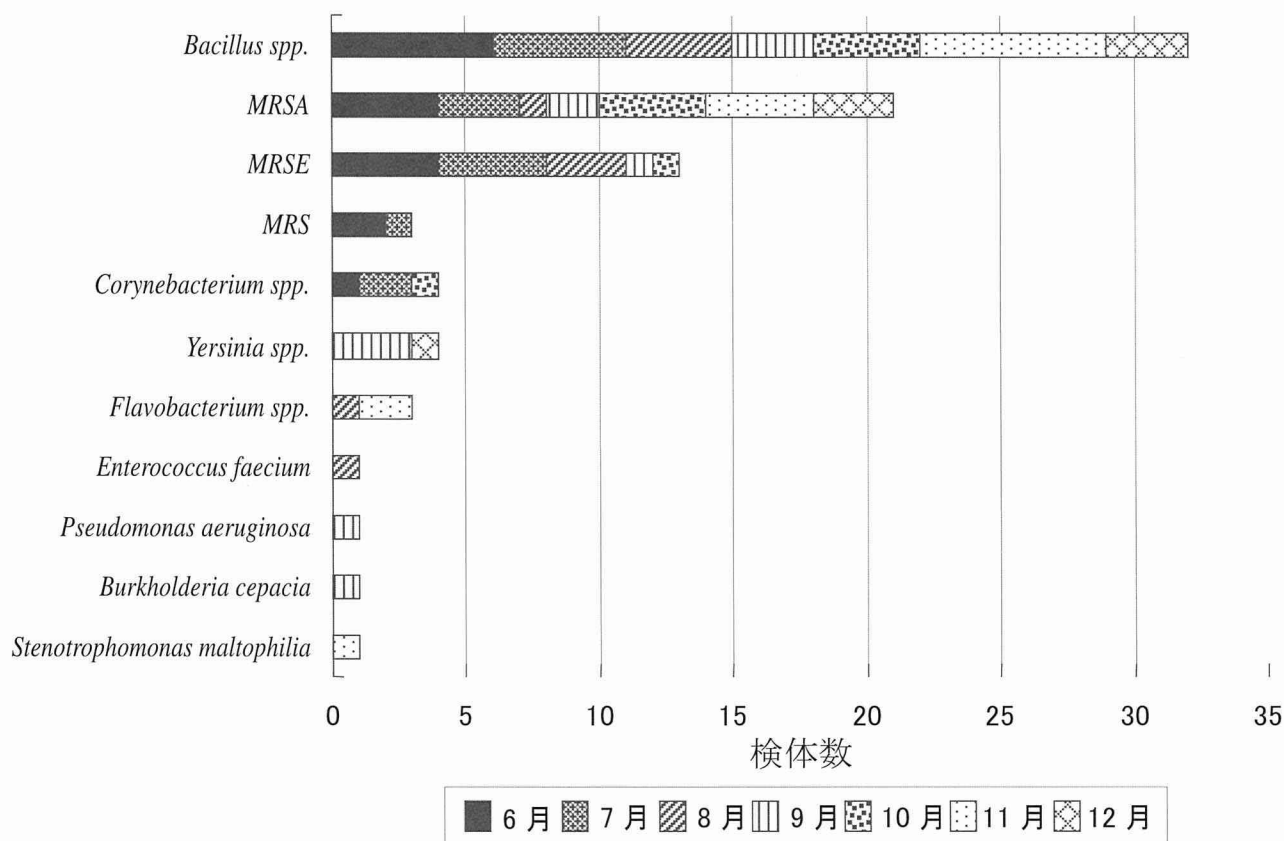


図2 月別MGIT陽性検体中の雑菌分離結果

喀痰溶解酵素で十分に検体を均質化し、かつNALC-NaOH溶液を加えてからおこなう攪拌間隔を1分とした検討3の雑菌汚染率は8.72%であり、従来方法と比べ雑菌汚染率の低下が認められなかった。

そこで検討4として、検討3の雑菌汚染率が低下しなかったことからNALC-NaOH溶液を加えてからおこなう攪拌方法をボルテックスミキサーから手

による転倒混和に変更してみた。検討4の雑菌汚染率は3.9%であり、検討3と比べ雑菌汚染率に低下が認められる結果となった。

考 察

抗酸菌培養検査に用いられる喀痰などの臨床検体は粘性及び膿性部分の量が異なり、かつ抗酸菌以外の一般細菌を含むことが多い。そこで検体を十分均

表1 従来方法及び検討後の雑菌汚染率

	従来方法		検討1		検討2		検討3		検討4	
	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	11月	12月	
検体数	203	199	211	219	179	195	180			
MGIT(+)	71	61	57	65	58	71	43			
MGIT(+) ^で の雑菌検体数	17	15	10	11	10	17	7			
雑菌汚染率(%)	8.4	7.5	4.7	5.0	5.6	8.7	3.9			

質化し、消化及び汚染除去をする前処理によって抗酸菌のみを選択的に培養することが重要となってくる。

今回、MGIT陽性検体の1ヶ月ごとの雑菌分離結果を調べたところ、*Bacillus* spp.、MRSA、MRSEとグラム陽性菌が大半を占める分離結果となった。この傾向から、MGIT中に含まれる薬剤にはポリミキシンB、アムホテリシンB、ナリジクス酸、トリメトプリム、アズロシリンがあるがグラム陰性菌に効く薬剤が中心であるため、NALC-NaOH溶液で汚染除去できなかったグラム陽性菌が多く分離されたと考えられる。

前処理方法の検討では喀痰溶解酵素で検体を十分均質化させる操作とNALC-NaOH溶液で検体を消化及び汚染除去をする操作に重点を置き検討した。喀痰溶解酵素で十分に検体を均質化させた場合、雑菌汚染率に低下が認められ、従来方法では検体の均質化が雑菌汚染の主な原因となっていたことが判明した。喀痰溶解酵素で十分に検体を均質化し、かつNALC-NaOH溶液を加えてからボルテックスミキサーでおこなう攪拌間隔を5分、3分、1分と変更

した場合、攪拌間隔が5分、3分では雑菌汚染率は良好な結果であったが、攪拌間隔が1分では検体を十分に均質化させている場合でも雑菌汚染率を低下させることはできなかった。しかし、攪拌方法をボルテックスミキサーから手による転倒混和に変更すると雑菌汚染率を低下させることが可能であった。このことからボルテックスミキサー等で激しくかつ頻繁におこなう攪拌方法では雑菌汚染率上昇につながる可能性があり、NALC-NaOH溶液を加えた際の攪拌方法やNALC-NaOH溶液の劣化などが原因ではないかと推測できるが次回の検討課題となった。

参考文献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編：結核菌検査指針2007，結核予防会，東京，2007
- 2) 斉藤 宏，山根 誠久：最近の抗酸菌培地とその使い方，臨床と微生物，Vol128 No 3：33-41 2001
- 3) 樋口 武史：結核専門病院における検査，Medical Technology，Vol131 No 7：731-737 2003