グラム染色塗抹標本の見方~呼吸器検体~

千葉市立海浜病院 静野健一

「呼吸器検体の塗抹検査」

- ⇒下気道由来検体が主な対象
 - 〇喀痰
 - 〇気管支鏡採取検体 など
 - ※上気道由来検体は常在菌混入の ため評価不能

「鏡検前の確認事項」

- ①検体の品質 (鏡検像でも評価)
 - ・膿性成分はあるか
 - 適切に採取されているか
 - 採取後すぐの検体か
- ②患者情報
 - ・基礎疾患の有無
 - •年齡

③抗菌薬前投与の有無

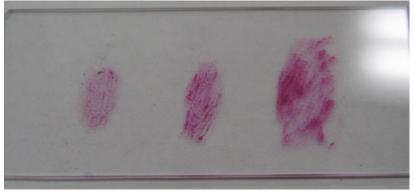
喘息などは? ステロイド内服は? 気管支拡張症などは?

塗抹標本の作製

検体	塗抹方法	
喀痰	膿性部分を採取し、滅菌生食で洗浄後、塗抹標本を作製. 鏡検時に細胞が一層程度の厚さ.	







標本の固定

1. 火炎固定

- 1)室温で自然乾燥
- 2) 塗抹面を上にしてガスバーナーの炎の中をゆっくり2~3回通過させる

2. アルコール固定

推奨!

- 1)室温で自然乾燥
- 2)標本にメタノールを数滴、滴下し1分間放置(染色バットでも可). 余分なメタノールを捨てる(水洗はしない). 自然乾燥.

特徴 ばらつきが少ない. 白血球などの生体細胞がきれいに染まる

グラム塗抹標本の観察

1. 染色状態の観察(低倍率 :100倍)

- ・背景がグラム陰性に染まっている。白血球が存在する標本では明らかなグラム陰性に染まっている。
- ・標本の厚さが適当であるかの確認. 細胞が一層程度.

2. 炎症の有無を観察(低倍率 :100倍)

- ・多核白血球、単核白血球などを相対的に観察
- 扁平上皮細胞、食物残渣、常在細菌叢などを観察

3. 微生物の存在の有無、形態の観察(油侵下 :1000倍)

- ・微生物が認められた場合は、菌量、形態を報告する.
- ・可能なら菌種を推定して報告

グラム染色標本は最終結果報告までは保存し、塗抹結果と培養結果が相関しない場合はもう一度見直すことが重要.

塗抹結果の報告内容

- ※検体の品質評価(Geckler分類など)
- ※白血球分類・・・多核白血球主体・・・急性炎症像 単核白血球主体・・・慢性炎症像 好酸球主体・・・アレルギーの関与
- ☆繊毛上皮細胞、剥離した繊毛の有無
 - ・・・ウイルス感染、喘息、マイコプラズマ等の関与
- ※推定(決定)菌種と菌量
- ☆貪食像の有無

喀痰の品質評価(Geckler分類)

Geckler分類(100倍鏡検)			
群別	白血球数	扁平上皮数	
1	<10	>25	
2	10~25	>25	
3	>25	>25	
4	>25	10~25	
5	>25	<10	
6	<25	<25	

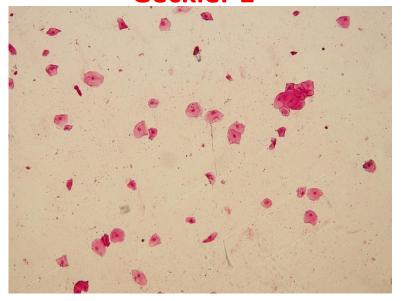
- 1~3群は上気道の濃厚な汚染を受けた検体.再提出を依頼することが望ましい
- 4~5群は良質な検体, 培養を実施する。
- 6群は白血球減少症であれば適 応.
- 喀痰を洗浄するとグレードは上 昇する.
- ・ 洗浄喀痰での評価方法ではない

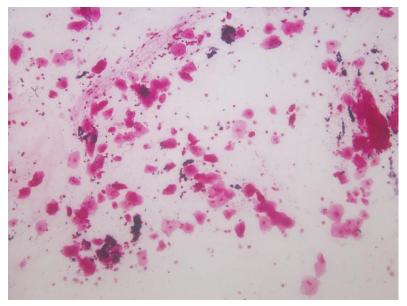
Microscopic and Bacteriological Comparison of Paired Sputa and Transtracheal Aspirates. Journal of Clinical Microbiology. Vol.6, No.4.;396-399. 1977

検体の品質評価(Geckler分類)

Geckler 1







Geckler 5

Geckler 1

・扁平上皮細胞多数. WBC認めず 検体として不適

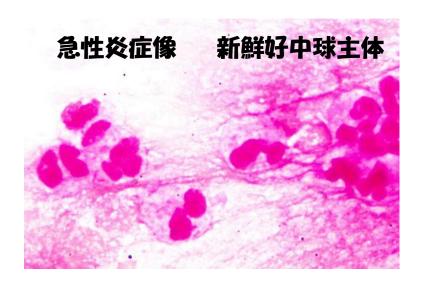
Geckler 3

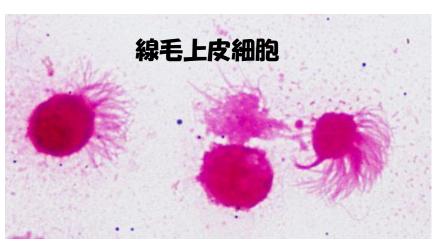
・誤嚥性肺炎では多数の細菌と共に 扁平上皮細胞とWBCが混在して観察

Geckler 5

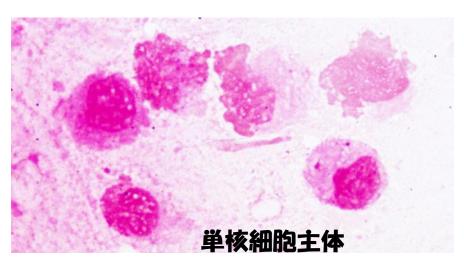
・有意菌が観察される所見

白血球分類, 繊毛上皮細胞の有無など









〔喀痰の塗抹検査から得られる情報〕

- ◎喀痰の品質評価
 - ·採取された喀痰が微生物検査に適するかどうか
- ◎推定可能な菌種
 - ·H. influenzae S. pneumoniae M. catarrhalis

P.aeruginosa K.pneumoniae

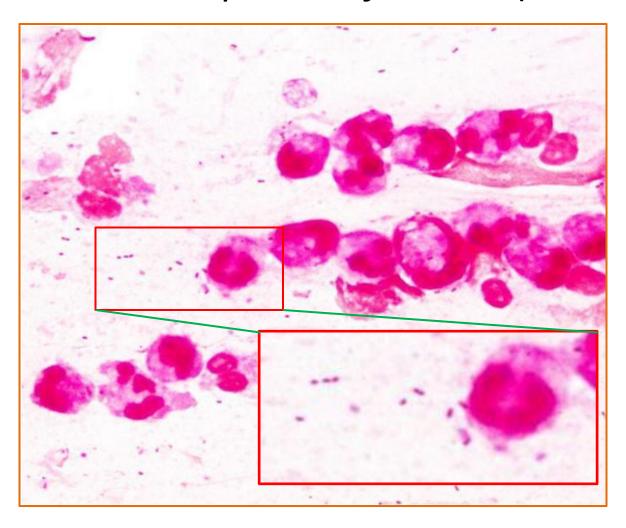
Staphylococcus spp. Streptococcus spp.

B.pertussis Legionella spp. Mycobacterium spp.

Nocardia spp. 真菌 糸状菌 寄生虫

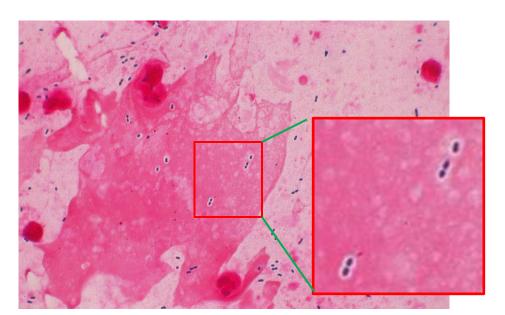
- ◎材料中の生態情報
 - ・急性炎症、慢性炎症、アレルキー性、ウイルス性、誤嚥性肺炎
- ◎治療効果の判定

Haemophilus influenzae(インフルエンザ菌)

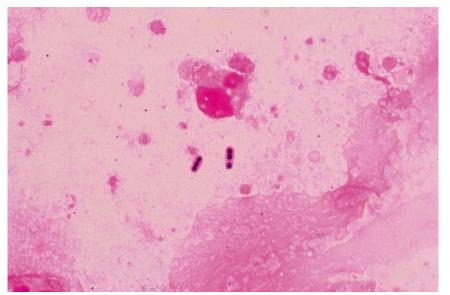


- ・グラム陰性短桿菌、 時に球状. 見逃すことが 多く注意深い観察が必要.
- 呼吸器感染症の主要な病原菌.
- ・喀痰では貪食像を認めることは少ない
- 肺炎、髄膜炎、関節炎 中耳炎などの原因菌

Streptococcus pneumoniae(肺炎球菌)

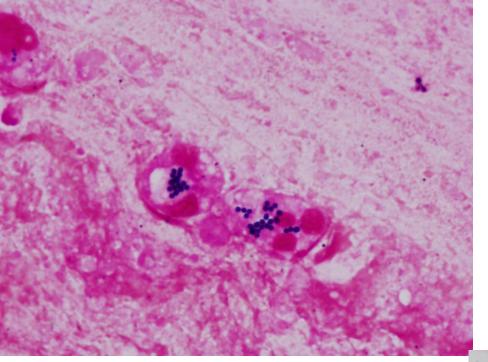


- ・グラム陽性ランセット状球菌 菌体周囲に白く抜けた莢膜が 観察される. レンサは2連.
- ・市中肺炎の原因菌として重要
- ・口腔内常在菌との鑑別が必要



肺炎球菌(ムコイドタイプ)

- ・グラム陽性球菌で短いレンサを作る.
- ・ 莢膜がピンクに染色される。
- ·多くがPSSP(ペニシリン感性).

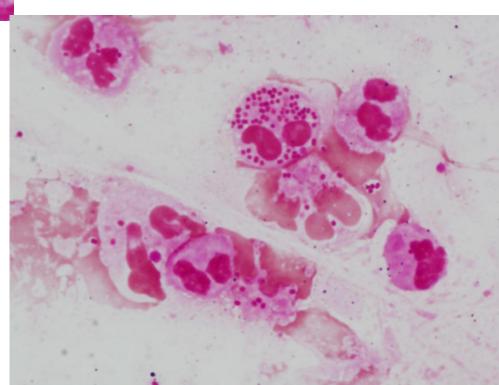


Staphylococcus spp.

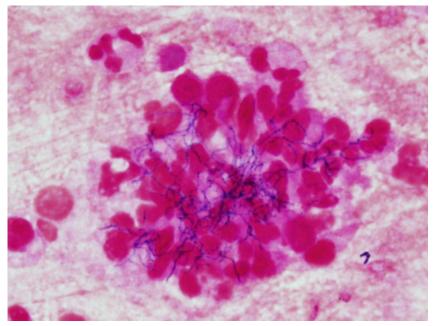
- ・グラム陽性球菌、ブドウ状の配列
- ・検鏡で黄色ブ菌とCNSの鑑別 はできない
- 貪食像がある場合は病原的意義 が高い

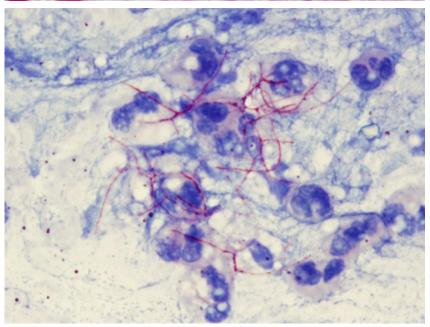
Moraxella catarrhalis

- ・グラム球菌、腎臓型の双球菌.
- 貪食像がある場合は病原的意 義が高い
- ・喀痰からは稀に髄膜炎菌が同様に観察される場合がある
- ・貪食の有無を報告



Nocardia spp.



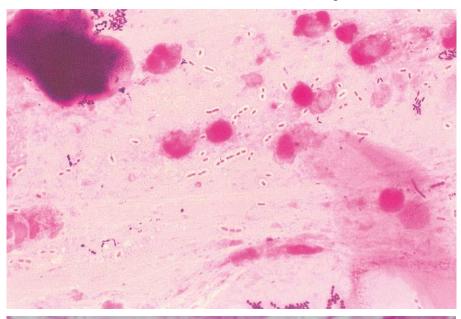


- ・分岐したグラム陽性桿菌. 時に陰性に染色. 菌体が一様に染色されないことも多い
- ・抗酸性あり (変法Kinyoun染色※; 非加温の抗酸染色により確認)
- ・土壌中に広く分布、菌の吸入により 肺に感染する. ステロイド使用など易 感染状態患者より検出されやすい
- ・培養で検出されることは少ない(見逃されやすい)ため、塗抹検査で検出することが重要

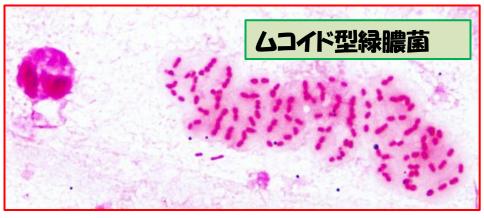
※変法Kinyoun染色

- ①石炭酸フクシン液を満載し加温せず3-5分染色
- ②水洗後、0.5-1%硫酸アルコールで脱色(過剰に注意)
- ③水洗後、レフレルアルカリメチレンブルーで後染色(数秒)

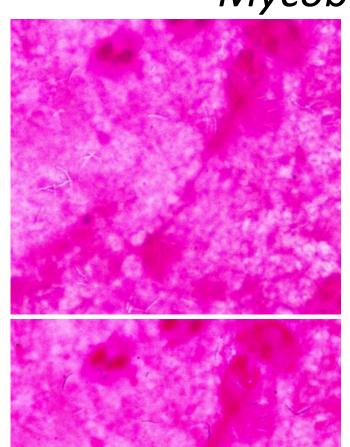
Klebsiella pneumoniae(肺炎桿菌)



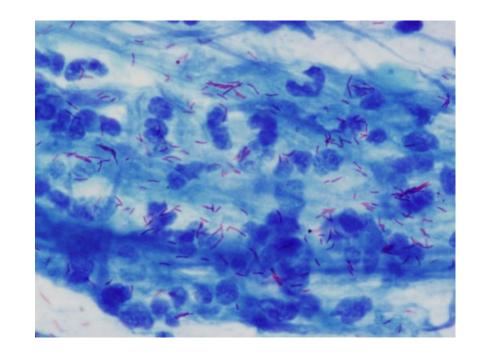
- ・グラム陰性の太い桿菌
- ・莢膜が薄いピンク色に染色される場合と、菌体周囲が白く抜けて観察される場合がある(ムコイド型緑膿菌との鑑別注意(下写真))
- ・本菌による肺炎は市中感染より病院 内感染として発生することが多い
- ・口腔内に保菌する患者も多く、培養結果のみでは臨床的意義は低い. 塗抹結果は重要な所見



Mycobacterium spp.



- ・グラム染色では染色性が悪く、観察は困難. ときに菌体の周囲が白く抜けて観察される. 顕微鏡の微動を動かしてよく観察すると、不鮮明な染まりのグラム陽性桿菌を認める
- ・こうした所見では抗酸染色を実施



抗菌薬等の影響

