

血小板製剤の細菌検査における BacT/ALERT VIRTUO の評価

松本 真実 池田 洋平 蕎麦田理英子 古田 里佳 松林 圭二
佐竹 正博

現在国内では導入されていない濃厚血小板製剤 (PC) の細菌スクリーニング検査を評価するために、血液培養自動分析装置 BacT/ALERT 3D (3D) と、その後継機 BacT/ALERT VIRTUO (VIRTUO) を用いて2つの試験を実施した。まず3DとVIRTUOにおける細菌検出時間の比較を行い、次に細菌を接種したPCをVIRTUOで検査し細菌スクリーニング検査方法の妥当性を評価した。比較試験では4菌種について好気、嫌気各培地に2つの異なった濃度の菌液を接種し、3DとVIRTUOで各濃度5セットずつ測定したところ、VIRTUOの方が3Dより有意に早く陽性判定となりVIRTUOの優位性が示された。PCへの細菌接種試験では、4菌種8株について接種直後、および保管40時間後にVIRTUOで検査したところ、保管後の菌数が10CFU/ml以上であれば24時間以内に全菌種を検出できた。

VIRTUOによる細菌検査は、PCの有効期間延長が必要となり増殖が遅い菌を検出できない可能性が残るが、重篤症状の原因となり得る増殖が速い細菌は除外できるため、輸血細菌感染の軽減に役立つことが期待された。

キーワード：細菌スクリーニング検査, BacT/ALERT VIRTUO, 輸血後細菌感染

はじめに

輸血感染症は輸血における重大な副作用であり、日本赤十字社 (JRC) では安全対策への取り組みを継続して行っている。HBV, HCV, HIV のウイルスに対しては2014年から個別の核酸増幅検査 (NAT) を導入し、2020年8月からはHEVウイルスについても個別NATを追加し、ウイルス感染対策の安全性は飛躍的に向上している¹⁾。

細菌感染対策については、細菌スクリーニング検査は行っていないが、採血前の問診、皮膚消毒、初流血除去、保存前白血球除去、血液製剤の外観検査、有効期間の短縮等、複数の対策を講じている。これらの対策により2007年以降、赤血球製剤による輸血細菌感染は発生していないが、20~24℃で振とう保管する濃厚血小板製剤 (PC) での輸血細菌感染は年間数例発生している。2007年~2019年の13年間にPCから細菌が検出された輸血細菌感染事例は19例あり、検出された菌種の内訳は、*Streptococcus* 属7例、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 5例、*Escherichia coli* (*E. coli*) 3例、*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)、*Serratia marcescens*、*Lactococcus garvieae*、*Citrobacter koseri* が各1例であった。このうち2017年に発生した*E. coli* 感染事例は輸血による死亡症例となっており²⁾、より安全な血液を供給するための細菌汚染防止対策が

強く望まれている。

海外では、血液培養自動分析装置による血小板製剤の細菌スクリーニングを実施し、細菌汚染対策に効果を出している国が複数ある^{3)~6)}。そこで、血液培養自動分析装置のうち代表的な2機種、BacT/ALERT 3D (3D) およびその後継機であるBacT/ALERT VIRTUO (VIRTUO) (ともにbioMérieux) を用いてPCの細菌スクリーニング検査を評価するために2つの試験を実施した。まず、3DとVIRTUOで細菌検出時間の比較を行い検査機器としての性能を比較評価した。次に、VIRTUOを用いたPCの細菌スクリーニング検査を想定し、PCへ接種した細菌を検出するスクリーニングプロトコルの妥当性を評価した。

材料と方法

評価細菌

過去の輸血感染事例より検出された臨床分離株から、グラム陽性菌2菌種、*S. aureus*、*Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*)、グラム陰性菌2菌種、*E. coli*、*K. pneumoniae* を使用した。PCへの細菌接種試験では、臨床分離株に下記標準菌株を追加し4菌種8株で実施した。*S. aureus* : NBRC13276, *S. dysgalactiae* : ATCC 12394, *E. coli* : NBRC15034, *K. pneumoniae* : PEI-B-P-08。

表1 3D と VIRTUO の平均陽性判定時間

菌種	10 CFU 接種群				100 CFU 接種群			
	3D		VIRTUO		3D		VIRTUO	
	BPA 培地 (h : min)	BPN 培地 (h : min)	BPA 培地 (h : min)	BPN 培地 (h : min)	BPA 培地 (h : min)	BPN 培地 (h : min)	BPA 培地 (h : min)	BPN 培地 (h : min)
<i>S. aureus</i>	16 : 56	15 : 13	14 : 04	11 : 37	15 : 16	13 : 55	12 : 17	11 : 10
<i>S. dysgalactiae</i>	14 : 47	19 : 38	13 : 31	17 : 08	13 : 46	17 : 37	11 : 41	15 : 16
<i>E. coli</i>	13 : 23	11 : 05	10 : 39	8 : 43	12 : 20	10 : 10	9 : 32	8 : 04
<i>K. pneumoniae</i>	12 : 31	11 : 19	9 : 41	9 : 00	11 : 08	10 : 19	8 : 33	7 : 56
ボトル別平均	14 : 24	14 : 18	11 : 58	11 : 37	13 : 07	13 : 00	10 : 30	10 : 36
全ボトル平均	14 : 21		11 : 47		13 : 03		10 : 33	

凍結保存していた各菌株を寒天培地に塗抹し 35°C で 18~24 時間好気培養後, コロニーをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁し, 濁度計 (Densicheck plus, bioMérieux) を使用したマクファーランド比濁法にて $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml に調製後, PBS による 10 倍希釈系列を作製した。

接種した細菌数測定と, PC 接種試験での保管 40 時間点の細菌数測定には, トリプトソイ寒天培地 (栄研化学), *S. dysgalactiae* のみトリプチケースソイ 5% ヒツジ血液寒天培地 (日本ベクトンデッキンソン) に段階希釈した菌液を塗抹し, 35°C で 24~48 時間培養後, コロニー数をカウントした。

細菌接種

BacT/ALERT 専用培地 BPA (好気性), BPN (嫌気性) 各ボトル 1 本ずつを 1 セットとし, 比較試験では 2 濃度, 10CFU 接種群 (5~20CFU/ml) および 100CFU 接種群 (50~200CFU/ml) の菌液 1ml を各濃度 10 セットずつ (各装置あたり 5 セット測定) 接種した。

PC への細菌接種試験では, PC バッグ (170~203ml) に菌液 1ml [菌量 100 (50~200) CFU] 接種した。バッグを十分に攪拌後, シリンジで 16ml 抜き取りボトル 1 セットに 8ml ずつ接種した。PC は 20~24°C で振とう保管 40 時間後, バッグ容量のほぼ全量となるボトル 9 セットに SampLock (ITL BioMedical) で 8ml ずつ接種した。

両試験で, 陰性コントロールとして菌液調製に使用した PBS 1ml をボトル 1 セットに接種した。

血液製剤

PC は採血 2 日目の照射 10 単位製剤を使用した。PC の無菌性確認のため, 細菌接種前にシリンジで 16ml 抜き取り, ボトル 1 セットに 8ml ずつ接種し VIRTUO で測定を行った。

細菌検出

検体を接種したボトルは, 比較試験では 36°C 培養の 3D と VIRTUO で, PC への細菌接種試験では VIRTUO で検査した。ボトルはいずれも陽性判定となるまで最長 10 日間培養した。

統計解析

比較試験において, VIRTUO および 3D の培養ボトルごとの陽性判定時間について統計解析 (t-検定) を行った。統計解析には Microsoft Excel 2016 の分析ツールを使用し, 両側検定で p 値が 0.01 未満のときに「有意差あり」とした。

結 果

1) 3D と VIRTUO の比較試験

4 菌種全ての試験において, 3D と VIRTUO で全ボトル陽性判定となった。4 菌種の平均陽性判定時間は 10 CFU 接種群で, 3D/VIRTUO : 14 時間 21 分/11 時間 47 分, 100CFU 接種群で 3D/VIRTUO : 13 時間 03 分/10 時間 33 分であった (表 1)。4 菌種全てにおいて VIRTUO の方が 3D より有意に早く陽性判定となり (図 1), 平均 2 時間 30 分早く検出された (表 2)。陰性コントロールの PBS は全て陰性判定であった。

2) VIRTUO による PC 中の細菌検出

PC へ細菌接種した直後 (0 時間) の抜き取り検体での培養検査は全て陽性となり, 陽性判定時間は最短 9 時間 25 分, 最長 17 時間 11 分, 平均 11 時間 20 分であった。

S. aureus の臨床株については, 保管 40 時間点で 10^7 CFU/ml 以上に増殖し, 培養 3 時間以内に全ボトル陽性と判定された。標準株については, 保管 40 時間点で 10^6 CFU/ml 以上に増殖し, 培養 12 時間以内に全てのボトルで陽性と判定されたが, 陽性判定時間にバラつきがあり, 9 本のボトル間で陽性判定時間の最短と最長に 2 時間以上差があったものが 2 バッグあった (表 3)。

S. dysgalactiae の臨床株と標準株については, 保管 40 時間点で 10^5 CFU/ml 以上に増殖し, 培養 6 時間以内に全ボトル陽性と判定された (表 4)。

グラム陰性菌である *E. coli* と *K. pneumoniae* については, 標準株ではいずれも保管 40 時間点で 10^5 CFU/ml 以上に増殖し, 培養 4 時間以内に全ボトル陽性と判定された。しかし臨床株については, 保管 40 時間点での菌数が寒天塗抹培養法による検出限界以下 (<10CFU/

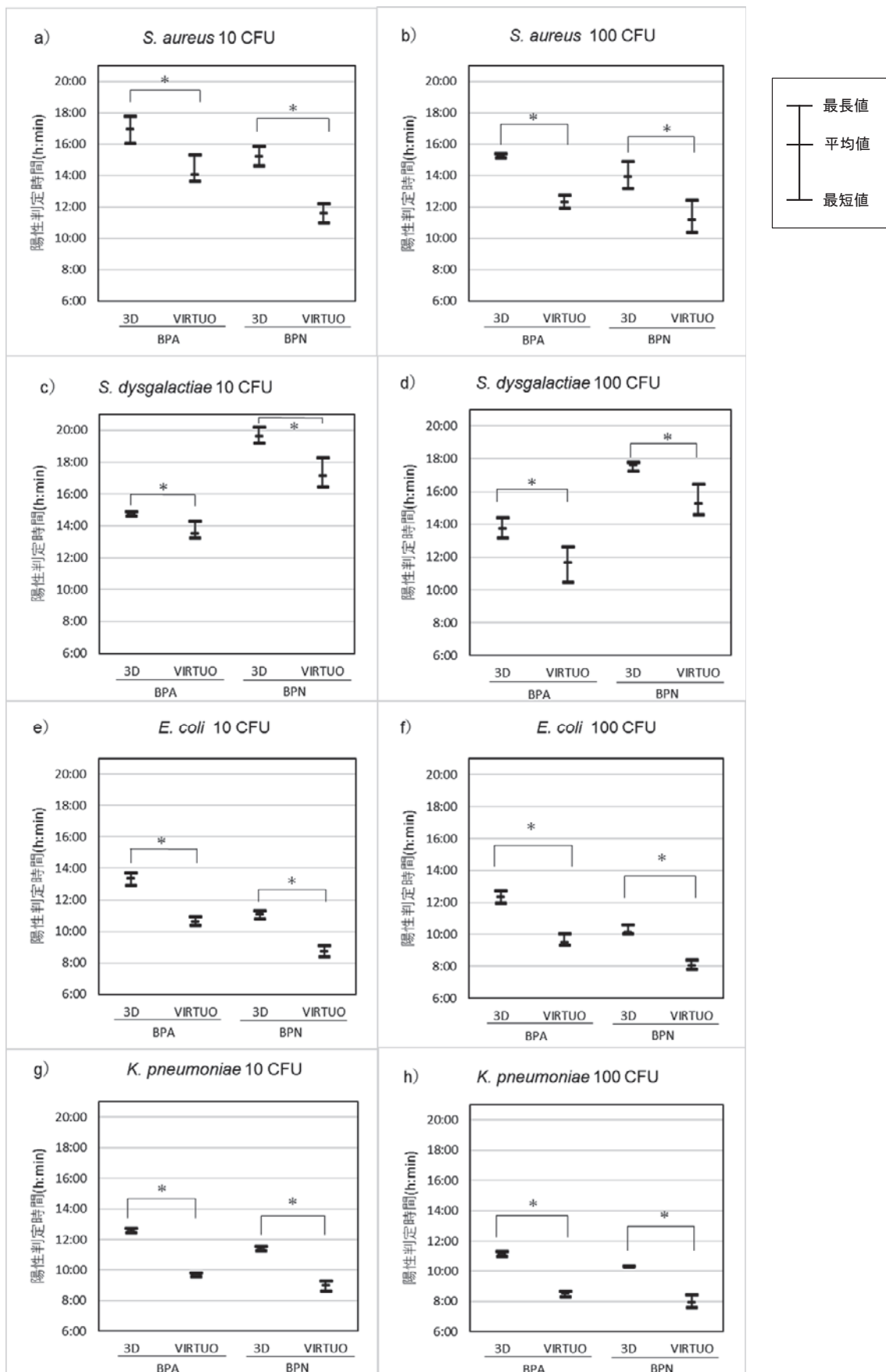


図1 3DとVIRTUOでのボトルごとの陽性判定時間
 * : 有意差あり p<0.01

ml)から 10^8 CFU/ml と PC のロットによる差が非常に大きかった (表 5, 6). 40 時間保管後の菌数が検出限界以下であったのは, *E. coli* 2 バッグ, *K. pneumoniae* 1 バッグで, *E. coli* の 1 バッグは培養 9 時間以内に全ボトル陽性判定されたが, もう 1 バッグは全ボトル陰性判定であった (表 5). *K. pneumoniae* では, BPN ボトル 1 本のみ 8 時間 24 分後に陽性判定となった (表 6). これら陰性判定となったボトルの PC 以外は, 40 時間の振とう保管後に検査をすることで細菌が増殖し, 0 時間点より陽性判定時間が最短 4 時間 09 分 (*E. coli* 臨床分離株) から最長 10 時間 31 分 (*S. aureus* 臨床分離株) 短縮された. 陰性コントロールの PBS と細菌接種前の PC の細菌検査は全て陰性判定であった.

表 2 3D と比較した VIRTUO での陽性判定平均短縮時間

菌種	接種菌数 (CFU)	BPA 培地 (h : min)	BPN 培地 (h : min)
<i>S. aureus</i>	6	2 : 52	3 : 35
	61	2 : 58	2 : 44
<i>S. dysgalactiae</i>	12	1 : 15	2 : 29
	120	2 : 04	2 : 20
<i>E. coli</i>	12	2 : 44	2 : 21
	120	2 : 48	2 : 06
<i>K. pneumoniae</i>	12	2 : 50	2 : 19
	120	2 : 34	2 : 23
平均		2 : 30	2 : 32

考 察

JRC では, 一定数の割合で製品を抜き取り確認する製品規格試験の無菌試験に, 平成 27 年より 3D を使用している. 3D の後継機である VIRTUO では, ボトルを装置正面のベルトコンベアに置くと, ボトルの投入から登録, 判定終了ボトルの排出までの作業がフルオートメーション化されている. 血液センターでは一度に数十本単位でボトルを処理することから, 作業者がボトル 1 本ずつマニュアルで登録し装置に投入する 3D と比較し作業効率が高いこと, 陽性判定アルゴリズムが改良されていることなどから, 今回 VIRTUO を主な評価対象装置として血小板製剤の細菌スクリーニング試験の妥当性を評価した.

3D と VIRTUO で陽性判定時間を比較した結果, 4 菌種全てにおいて VIRTUO の方が 3D より有意に早く陽性判定が得られた. この理由として, 3D と VIRTUO では, 細菌が産生する二酸化炭素により変化する培地底部インジケータの色調をモニタリングして細菌を検出するという測定原理は同じであるが, ①VIRTUO は培地の投入, 取り出しに扉の開閉がないため庫内の温度変化がほとんどないこと (ボトル投入時の庫内温度変化は $36 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 程度であった), ②VIRTUO では前述の通り陽性判定のアルゴリズムが改良されていることがあげられる. また, この結果は, 医療機関が血液培養により 3D と VIRTUO の陽性判定時間を比較した報告とも一致している^{7)~9)}.

表 3 細菌接種 0 時間点と 40 時間点での VIRTUO による検出 - *Staphylococcus aureus*

菌株	試験 No.	接種菌量 (CFU)	時間点	菌濃度 (CFU/ml)	陽性数/試験数	BPA 培地				BPN 培地			
						陽性判定時間 (h : min)				陽性判定時間 (h : min)			
						平均	SD	最短~最長		平均	SD	最短~最長	
標準株	1	130	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	17 : 11		1/1	N/A	N/A	15 : 52
			40h	$1.7\text{E}+04$	9/9	6 : 17	0 : 10	5 : 55 ~ 6 : 33		9/9	6 : 22	0 : 18	6 : 02 ~ 6 : 52
	2	130	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	16 : 32		1/1	N/A	N/A	14 : 02
			40h	$1.4\text{E}+05$	9/9	5 : 42	0 : 15	5 : 22 ~ 6 : 14		9/9	5 : 57	0 : 19	5 : 20 ~ 6 : 23
	3	130	0h	0.8	1/1	N/A	N/A	14 : 41		1/1	N/A	N/A	15 : 01
			40h	$8.2\text{E}+04$	9/9	6 : 19	0 : 31	5 : 39 ~ 6 : 57		9/9	6 : 21	0 : 38	5 : 26 ~ 7 : 37*
	4	120	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	14 : 34		1/1	N/A	N/A	17 : 04
			40h	$1.7\text{E}+04$	9/9	7 : 39	0 : 55	6 : 25 ~ 9 : 05*		9/9	7 : 55	1 : 18	7 : 03 ~ 11 : 16*
	5	120	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	14 : 44		1/1	N/A	N/A	14 : 44
			40h	$2.7\text{E}+05$	9/9	5 : 24	0 : 12	5 : 13 ~ 5 : 43		9/9	5 : 27	0 : 11	5 : 14 ~ 5 : 46
臨床株	1	120	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	12 : 00		1/1	N/A	N/A	13 : 30
			40h	$1.6\text{E}+07$	9/9	2 : 49	0 : 11	2 : 47 ~ 2 : 52		9/9	2 : 49	0 : 02	2 : 46 ~ 2 : 53
	2	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	12 : 03		1/1	N/A	N/A	13 : 33
			40h	$1.2\text{E}+07$	9/9	2 : 48	0 : 05	2 : 44 ~ 2 : 58		9/9	2 : 45	0 : 01	2 : 44 ~ 2 : 48
	3	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	12 : 49		1/1	N/A	N/A	13 : 10
			40h	$2.1\text{E}+07$	9/9	2 : 47	0 : 03	2 : 44 ~ 2 : 57		9/9	2 : 45	0 : 01	2 : 44 ~ 2 : 48
	4	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	12 : 33		1/1	N/A	N/A	12 : 42
			40h	$2.5\text{E}+07$	9/9	2 : 49	0 : 01	2 : 47 ~ 2 : 51		9/9	2 : 48	0 : 01	2 : 47 ~ 2 : 51
	5	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	12 : 12		1/1	N/A	N/A	13 : 42
			40h	$2.1\text{E}+07$	9/9	2 : 48	0 : 01	2 : 47 ~ 2 : 51		9/9	2 : 48	0 : 01	2 : 47 ~ 2 : 50

* : 9 本のボトル間で陽性判定時間の最短と最長に 2 時間以上差があった.

表4 細菌接種0時間点と40時間点でのVIRTUOによる検出 - *Streptococcus dysgalactiae*

菌株	試験 No.	接種菌量 (CFU)	時間点	菌濃度 (CFU/ml)	陽性数/ 試験数	BPA 培地			陽性数/ 試験数	BPN 培地			
						陽性判定時間 (h : min)				陽性判定時間 (h : min)			
						平均	SD	最短~最長		平均	SD	最短~最長	
標準株	1	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	11 : 45	1/1	N/A	N/A	10 : 35	
			40h	9.1E+06	9/9	2 : 49	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 52	9/9	2 : 50	0 : 01	2 : 48 ~ 2 : 51	
	2	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	11 : 26	1/1	N/A	N/A	10 : 26	
			40h	2.6E+07	9/9	2 : 48	0 : 01	2 : 47 ~ 2 : 50	9/9	2 : 44	0 : 05	2 : 38 ~ 2 : 51	
	ATCC 12394	3	140	0h	0.8	1/1	N/A	N/A	11 : 18	1/1	N/A	N/A	10 : 18
				40h	3.3E+07	9/9	2 : 48	0 : 01	2 : 46 ~ 2 : 50	9/9	2 : 46	0 : 01	2 : 45 ~ 2 : 48
4		140	0h	0.8	1/1	N/A	N/A	11 : 25	1/1	N/A	N/A	10 : 26	
	40h		9.8E+06	9/9	2 : 44	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 51	9/9	2 : 45	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 52		
5	140	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	12 : 33	1/1	N/A	N/A	10 : 43		
		40h	1.7E+08	9/9	2 : 44	0 : 02	2 : 42 ~ 2 : 51	9/9	2 : 35	0 : 06	2 : 31 ~ 2 : 51		
臨床株	1	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	11 : 39	1/1	N/A	N/A	10 : 09	
			40h	3.2E+06*	9/9	2 : 55	0 : 05	2 : 48 ~ 3 : 01	9/9	2 : 53	0 : 04	2 : 49 ~ 3 : 02	
	2	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	12 : 18	1/1	N/A	N/A	9 : 59	
			40h	>1.0E+04*	9/9	4 : 25	0 : 10	4 : 07 ~ 4 : 36	9/9	4 : 09	0 : 07	3 : 57 ~ 4 : 18	
	3	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	12 : 39	1/1	N/A	N/A	10 : 18	
			40h	1.2E+05*	9/9	4 : 47	0 : 08	4 : 40 ~ 5 : 01	9/9	4 : 29	0 : 08	4 : 19 ~ 4 : 49	
	4	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	11 : 28	1/1	N/A	N/A	10 : 18	
			40h	8.0E+05*	9/9	3 : 10	0 : 05	3 : 06 ~ 3 : 18	9/9	2 : 59	0 : 06	2 : 46 ~ 3 : 06	
	5	190	0h	0.9	1/1	N/A	N/A	12 : 54	1/1	N/A	N/A	10 : 24	
			40h	2.7E+05	9/9	4 : 43	0 : 03	4 : 34 ~ 4 : 46	9/9	4 : 22	0 : 07	4 : 14 ~ 4 : 35	

* : 40時間菌数測定の際に実施した希釈系列が菌数測定上限を超え測定できなかったため、-30°C凍結保存したチューブを翌日融解して再測定した。

表5 細菌接種0時間点と40時間点でのVIRTUOによる検出 - *Escherichia coli*

菌株	試験 No.	接種菌量 (CFU)	時間点	菌濃度 (CFU/ml)	陽性数/ 試験数	BPA 培地			陽性数/ 試験数	BPN 培地		
						陽性判定時間 (h : min)				陽性判定時間 (h : min)		
						平均	SD	最短~最長		平均	SD	最短~最長
標準株	1	88	0h	0.5	1/1	N/A	N/A	10 : 21	1/1	N/A	N/A	9 : 42
			40h	8.0E+05	9/9	2 : 45	0 : 03	2 : 42 ~ 2 : 52	9/9	2 : 45	0 : 03	2 : 42 ~ 2 : 51
	2	51	0h	0.3	1/1	N/A	N/A	10 : 49	1/1	N/A	N/A	9 : 47
			40h	3.0E+05	9/9	2 : 46	0 : 03	2 : 42 ~ 2 : 51	9/9	2 : 47	0 : 03	2 : 43 ~ 2 : 52
	3	51	0h	0.3	1/1	N/A	N/A	10 : 58	1/1	N/A	N/A	9 : 49
			40h	2.4E+05	9/9	2 : 46	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 50	9/9	2 : 48	0 : 06	2 : 43 ~ 3 : 04
4	51	0h	0.3	1/1	N/A	N/A	10 : 22	1/1	N/A	N/A	10 : 01	
		40h	3.1E+05	9/9	2 : 47	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 51	9/9	2 : 48	0 : 02	2 : 45 ~ 2 : 52	
5	51	0h	0.3	1/1	N/A	N/A	10 : 26	1/1	N/A	N/A	9 : 38	
		40h	8.9E+05	9/9	2 : 47	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 52	9/9	2 : 48	0 : 02	2 : 43 ~ 2 : 52	
臨床株	1	170	0h	0.9	1/1	N/A	N/A	10 : 39	1/1	N/A	N/A	9 : 59
			40h	<10*	9/9	8 : 33	0 : 14	8 : 09 ~ 8 : 52	9/9	7 : 41	0 : 06	7 : 31 ~ 7 : 51
	2	170	0h	0.9	1/1	N/A	N/A	10 : 47	1/1	N/A	N/A	9 : 57
			40h	2.3E+02	9/9	5 : 50	0 : 05	5 : 45 ~ 5 : 59	9/9	5 : 17	0 : 06	5 : 08 ~ 5 : 28
	3	170	0h	0.9	1/1	N/A	N/A	10 : 26	1/1	N/A	N/A	9 : 25
			40h	<10*	0/9	N/A	N/A	N/A	0/9	N/A	N/A	N/A
	4	120	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	10 : 41	1/1	N/A	N/A	9 : 50
			40h	8.8E+05	9/9	2 : 46	0 : 02	2 : 44 ~ 2 : 53	9/9	2 : 44	0 : 01	2 : 43 ~ 2 : 46
	5	120	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	10 : 21	1/1	N/A	N/A	9 : 31
			40h	7.0E+01	9/9	7 : 28	0 : 10	7 : 12 ~ 7 : 44	9/9	6 : 38	0 : 07	6 : 30 ~ 6 : 52

* : 寒天塗抹培養法による検出限界以下

BacT/ALERTによる細菌スクリーニングの検出感度を上げるためには、サンプル量を8~10mlと多くし、BPAとBPNのセットで使用する、増殖の遅い細菌

を検出するためにサンプリングまでの待機時間を遅くすることが重要である¹⁰⁾¹¹⁾。

英国では年間、成分採血由来血小板製剤を約15万本、

表6 細菌接種0時間点と40時間点でのVIRTUOによる検出-Klebsiella pneumoniae

菌株	試験 No.	接種菌量 (CFU)	時間点	菌濃度 (CFU/ml)	陽性数/試験数	BPA 培地			BPN 培地			
						陽性判定時間 (h:min)			陽性数/試験数	陽性判定時間 (h:min)		
						平均	SD	最短~最長		平均	SD	最短~最長
標準株	1	180	0h	1.0	1/1	N/A	N/A	9:57	1/1	N/A	N/A	10:17
			40h	1.9E+08	9/9	1:24	0:07	1:17~1:38	9/9	1:17	0:03	1:11~1:22
	2	180	0h	1.0	1/1	N/A	N/A	9:47	1/1	N/A	N/A	9:47
			40h	2.4E+08	9/9	1:23	0:07	1:11~1:33	9/9	1:18	0:05	1:12~1:29
	3	150	0h	0.8	1/1	N/A	N/A	9:51	1/1	N/A	N/A	10:03
			40h	1.4E+08	9/9	1:17	0:02	1:10~1:19	9/9	1:16	0:01	1:15~1:18
4	150	0h	0.8	1/1	N/A	N/A	10:02	1/1	N/A	N/A	10:12	
		40h	2.7E+08	9/9	1:22	0:04	1:17~1:28	9/9	1:15	0:03	1:11~1:19	
5	150	0h	0.7	1/1	N/A	N/A	10:02	1/1	N/A	N/A	10:11	
		40h	2.9E+08	9/9	1:34	0:07	1:22~1:44	9/9	1:16	0:04	1:10~1:21	
臨床株	1	100	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	9:59	1/1	N/A	N/A	9:41
			40h	1.3E+05	9/9	2:58	0:08	2:51~3:15	9/9	2:54	0:08	2:44~3:05
	2	100	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	10:00	1/1	N/A	N/A	9:50
			40h	1.1E+08	9/9	1:15	0:05	1:10~1:24	9/9	1:13	0:02	1:10~1:19
	3	100	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	9:59	1/1	N/A	N/A	9:50
			40h	2.7E+03	9/9	5:22	0:08	5:07~5:35	9/9	5:16	0:06	5:07~5:27
	4	100	0h	0.5	1/1	N/A	N/A	9:29	1/1	N/A	N/A	9:50
			40h	<10*	0/9	N/A	N/A	N/A	1/9	N/A	N/A	8:24
	5	110	0h	0.6	1/1	N/A	N/A	9:38	1/1	N/A	N/A	9:37
			40h	1.7E+07	9/9	1:56	0:06	1:46~2:08	9/9	1:33	0:05	1:25~1:39

* : 寒天塗抹培養法による検出限界以下

血小板保存液置換血小板製剤を約14万本製造しており、2011年に血小板製剤の細菌スクリーニングの全国導入が完了した。英国の方法は、血小板製剤を採血から36時間以上保管後にBPAとBPNの両ボトルに8ml接種して3Dによる培養検査を開始し、培養6時間点で陰性の判定結果が得られた製剤のみを出荷する方式である。培養はその後有効期限8日目（採血当日を1日目として）まで継続し、陽性が判明した場合は、その時点で出荷先医療機関に情報提供を行っている。これにより英国では輸血細菌感染事例が大幅に減少した。導入前の1996年から2010年までの15年間では、輸血細菌感染事例の発生数40件（輸血された患者数43名）、死亡症例11例であったが、導入完了後の2011年から2019年までの9年間では、PCによる輸血細菌感染の発生は2015年の重篤症例1例のみで死亡症例は発生していない¹²⁾¹³⁾。

そこで今回の評価では、JRCでのPCの採血、製造、供給を考慮した上で英国方式に準じて、サンプル量8ml、BPAとBPNの両ボトル、サンプリングまでの保管時間40時間以上、培養時間24時間と想定して評価試験を実施した。

その結果、グラム陽性菌である *S. dysgalactiae* の臨床分離株と標準株、および *S. aureus* の臨床分離株については、保管40時間点で10⁶CFU/ml以上に増殖し、培養6時間以内に全ボトル陽性と判定された。*S. aureus* の標準株については、培養12時間以内に全てのボトル

で陽性と判定されたが、陽性判定時間にバラつきが見られた。この理由として、これらのバッグに凝集等の目視による外観異常は見られなかったが、*S. aureus* 混入PCでは菌体が産生するコアグラーゼにより微細なクラスターやバイオフィルムを形成し^{14)~16)}、サンプリング液中の菌数が均一ではなく菌濃度が見かけ上少なくなる場合があり、サンプリングエラーとなりやすいと考えられる。英国でスクリーニングをすり抜けて輸血細菌感染となった1症例の原因菌も *S. aureus* であった¹⁷⁾。臨床分離株のグラム陰性菌を接種したバッグの一部が陰性判定となった理由として、グラム陰性菌は株によって血漿中の補体により殺菌されることがよく知られており¹⁸⁾¹⁹⁾、0時間点（菌接種直後）に検体採取したボトルは全て陽性であったことから、PC中に評価菌は適正に接種されたが、殺菌効果の高いPCロットにおいては、保管中に細菌数が減少、死滅したと考えられる。今回、標準株では全てのPC中で増殖がみられたが、これは事前検討により補体に抵抗性のある菌株を選択したためと考えられる。

以上の結果から、4菌種8株についてはVIRTUOは3Dよりも短時間で細菌を検出でき、40時間振とう保管後のPC中の菌数が10CFU/ml以上であれば、VIRTUOにより24時間以内に陽性判定できることが明らかとなった。しかし、菌株とPCロットの組み合わせによっては、PC中で増殖できずに残存している場合や、増殖が遅く振とう保管後の菌数が10CFU/mlより少な

い場合は、VIRTUO で検査を行っても偽陰性となる可能性が残ることが示唆された。実際に、BacT/ALERT を導入し細菌感染症への対策を実施し効果を出している国々でも、すり抜け事例は報告されている⁶⁾²⁰⁾²¹⁾。

JRC は PC の輸血細菌感染防止対策として、有効期間を短くするという独自の安全対策を導入しており、この防止効果は細菌スクリーニングの実施と同程度であると考えられている²²⁾。しかし、これまでに国内で発生した輸血細菌感染事例の多くが採血後 4 日目の PC が原因となっており、さらなる安全対策を進めるには現行の対策のみでは難しくなっている。今後、BacT/ALERT による細菌スクリーニングを導入するとすれば、効果的に細菌を検出するために採血後一定期間経過後にサンプリングを開始し、さらに検査開始から結果が判明するまで一定期間培養することが必要となる。そのため現行の有効期間 4 日間での運用は難しく、6 日間以上に延長することが必要になると考えられる。

細菌種と PC ロットの組み合わせによって PC 中の細菌増殖動態が異なることから、混入したすべての細菌を一様に検出することは難しく、細菌スクリーニングは製品に細菌の混入がないことを保証するものではない。しかしながら、PC を VIRTUO により全数検査し、陽性と判定とされた PC を除外することで、輸血による細菌感染の軽減に役立つことが期待される。

著者の COI 開示：松本真実：日本赤十字社職員、池田洋平：日本赤十字社職員、蕎麦田理英子：日本赤十字社職員、古田里佳：日本赤十字社職員、松林圭二：日本赤十字社職員、佐竹正博：日本赤十字社職員

謝辞：本研究で使用したサンプリングデバイス SampLock (ITL BioMedical) につきまして、フレゼニウスカービジャパン株式会社より供与いただきました。厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 輸血情報 1804-159.
http://www.jrc.or.jp/mr/news/pdf/yuketsuj_1804-159c.pdf (2020 年 12 月現在).
- 2) 輸血情報 1712-156.
http://www.jrc.or.jp/mr/relate/info/pdf/yuketsuj_1712-156.pdf (2020 年 12 月現在).
- 3) Benjamin RJ, Braschler T, Weingand T, et al: Hemovigilance monitoring of platelet septic reactions with effective bacterial protection systems. *Transfusion*, 57: 2946—2957, 2017.
- 4) McDonald C, Jennifer A, Susan B, et al: Bacterial screening of platelet components by National Health Service Blood and Transplant, an effective risk reduction measure. *Transfusion*, 57: 1122—1131, 2017.
- 5) Pietersz RN, Reesink HW, Panzer S, et al: Bacterial contamination in platelet concentrates. *Vox Sang*, 106: 256—283, 2014.
- 6) Thyer J, Perkowska-Guse Z, Ismay SL, et al: Bacterial testing of platelets has it prevented transfusion-transmitted bacterial infections in Australia? *Vox Sang*, 113: 13—20, 2018.
- 7) Congestri F, Pedna MF, Fantini M, et al: Comparison of 'time to detection' values between BacT/ALERT VIRTUO and BacT/ALERT 3D instruments for clinical blood culture samples. *Int J Inf Dis*, 62: 1—5, 2017.
- 8) Michael R. Jacobs, Tony Mazzulli, Kevin C, et al: Multi-center clinical evaluation of BacT/Alert Virtuo blood culture system. *J Clin Microbiol*, 55: 2413—2421, 2017.
- 9) Menchinelli G, Liotti FM, Fiori B, et al: In vitro evaluation of BACT/ALERT® VIRTUO®, BACT/ALERT 3D®, and BACTEC™ FX automated blood culture systems for detection of microbial pathogens using simulated human blood samples. *Front Microbiol*, 10: 221, 2019.
- 10) U.S. Food and Drug Administration. Bacterial risk control strategies for blood collection establishments and transfusion services to enhance the safety and availability of platelets for transfusion guidance for Industry, 2019.
<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bacterial-risk-control-strategies-blood-collection-establishments-and-transfusion-services-enhance> (2020/12 accessed).
- 11) Ramirez-Arcos S, Evans S, McIntyre T, et al: Extension of platelet shelf life with an improved bacterial testing algorithm. *Transfusion*, 60: 2918—2928, 2020.
- 12) 2016 Annual SHOT Report - Supplementary Information Chapter 17: Transfusion-Transmitted Infections (TTI).
<https://www.shotuk.org/wp-content/uploads/myimages/17.-Transfusion-Transmitted-Infections-TTI.pdf> (2020/12 accessed).
- 13) 2019 Annual SHOT Report - Supplementary Information Chapter 20: Transfusion-Transmitted Infections (TTI).
<https://www.shotuk.org/wp-content/uploads/myimages/Chapter-20-Transfusion-Transmitted-Infections-TI-2019.pdf> (2020/12 accessed).
- 14) Crosby HA, Kwiecinski J, Horswill AR: *Staphylococcus aureus* aggregation and coagulation mechanisms, and their function in host-pathogen interactions. *Adv Appl Microbiol*, 96: 1—41, 2016.

- 15) Nathan KA, Mark JM, J William C, et al: *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2: 445—459, 2011.
- 16) Loza-Correa M, Kou Y, Taha M, et al: Septic transfusion case caused by a platelet pool with visible clotting due to contamination with *Staphylococcus aureus*. *Transfusion*, 57: 1299—1303, 2017.
- 17) Brailsford SR, Tossell J, Morrison R, et al: Failure of bacterial screening to detect *Staphylococcus aureus*: The English experience of donor follow-up. *Vox Sang*, 113: 540—546, 2018.
- 18) Bloch EF, Knight EM, Carmon T, et al: C5b-7 and C5b-8 precursors of the membrane attack complex (C5b-9) are effective killers of *E. coli* J5 during serum incubation. *Immunol Invest*, 26: 409—419, 1997.
- 19) Allen RJ, Scott GK: Bacterial killing by complement requires membrane attack complex formation via surface-bound C5 convertases. *EMBO J*, 38: e99852, 2019.
- 20) Ramirez-Arcos S, DiFranco C, McIntyre T, et al: Residual risk of bacterial contamination of platelets: six years of experience with sterility testing. *Transfusion*, 57: 2174—2181, 2017.
- 21) Abela MA, Fenning S, Maguire KA, et al: Bacterial contamination of platelet components not detected by BacT/ALERT®. *Transfus Med*, 28: 65—70, 2018.
- 22) Satake M, Kozakai M, Matsumoto M, et al: Platelet safety strategies in Japan: impact of short life on the incidence of septic reactions. *Transfusion*, 60: 731—738, 2020.

EVALUATION OF BACT/ALERT VIRTUO FOR DETECTION OF BACTERIA IN PLATELET CONCENTRATE

Mami Matsumoto, Yohei Ikeda, Rieko Sobata, Rika A Furuta, Keiji Matsubayashi and Masahiro Satake
Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

Abstract:

Screening of platelet concentrate (PC) for bacterial contamination is not currently performed in Japan. We evaluated the validity of screening PCs using the automated blood culture systems BacT/ALERT 3D (3D) and BacT/ALERT VIRTUO (VIRTUO). We compared the time to detection (TTD) of bacteria between the two systems, and then validated the screening protocol by testing bacteria-spiked PC bags using VIRTUO. In the comparative test, four bacterial species at two different concentrations were inoculated into aerobic and anaerobic culture bottle sets and 5 sets each were tested using 3D and VIRTUO. The TTD was significantly shorter for all bacterial inoculum using VIRTUO than 3D, demonstrating the superiority of VIRTUO. In the validation test, PCs inoculated with bacteria were tested using VIRTUO at 40h post-spiking. All four bacterial species were detected within 24 hours if the spiked bacteria had grown to a concentration $>10\text{CFU}/\text{ml}$ after storage.

Our results indicate that, although there is a possibility of missing slow-growing bacteria, bacterial screening of PCs stored for a certain period of time using VIRTUO is expected to reduce the risk of transfusion-transmitted bacterial infection.

Keywords:

bacterial screening test, BacT/ALERT VIRTUO, transfusion-transmitted bacterial infection