

血小板製剤の細菌検査としての細菌 16S rDNA リアルタイム PCR 法の評価

吉政 隆 松本 真実 池田 洋平 蕎麦田理英子 小島 牧子
松林 圭二 佐竹 正博

本邦において、血液製剤中の細菌汚染による副作用は未だに発生しており、血液事業上、新たな細菌汚染対策は必須である。今回、細菌接種後に振盪保管した血小板製剤(PC)試料を用いて、血液培養自動分析装置 BacT/ALERT VIRTUO (VIRTUO) による培養法と細菌 16S rDNA リアルタイム PCR による遺伝子検査法 (PCR 法) の細菌検出能を比較した。4 菌種 8 株の細菌を用いた比較試験の結果、細菌接種後 40 時間振盪保管した PC 試料において、寒天塗抹培養法によって検出限界以下 (<10CFU/ml) となった試験検体以外は、二法ともすべて陽性と判定され、PCR 法でも VIRTUO と同等程度に混入した細菌を検出できることが示された。しかし、極低濃度の細菌が PC 中に存在し続ける場合、PCR 法は VIRTUO に比べて検出能が低い可能性が示唆された。一方で PCR 法は VIRTUO に比べて検査時間が約 3 時間と短く、内部標準 DNA による PCR 反応阻害のモニタリングも可能である。今後細菌 DNA のコンタミネーションに対応した核酸増幅検査試薬や自動化機器が開発されれば、細菌スクリーニング検査法の一つとして期待できる。

キーワード：細菌スクリーニング検査, 16S rRNA, Real-time PCR, BacT/ALERT VIRTUO

緒 言

本邦において、血液製剤中の細菌汚染のリスクは、年間数例程度発生しており、日本赤十字社では、初流血除去導入¹⁾や血小板製剤 (PC) の有効期限を短く設定し、細菌汚染による副作用発生リスクの低減化に努めてきた。しかし、これらの対策を講じた現在でも、副作用事例は依然として発生していることから、血液事業上、新たな細菌汚染対策は必須と考えられる。血液製剤の追加の細菌汚染対策としては、病原体不活化、低温保管、スクリーニング検査が考えられるが、中でもスクリーニング検査は血液製剤中の細菌の存在を確認できる唯一の方法である。現在、各国で導入されている細菌スクリーニング検査の中でも血液培養自動分析装置による PC の細菌スクリーニングが効果を示している^{2)~4)}。日本赤十字社では、PC による細菌感染のリスクを低減するために、BacT/ALERT VIRTUO (VIRTUO) を用いて、イングランド方式に準じた細菌スクリーニングの導入を検討している⁵⁾。VIRTUO は細菌の増殖により培養中に発生する二酸化炭素の量を検出して検体中の細菌の有無を判定する血液培養自動分析装置である。一方で、核酸増幅検査を用いた細菌スクリーニング検査の検討も各国で実施されており、ドイツの一部地域では、核酸増幅検査によるスクリーニングが

2012 年から実施されている⁶⁾⁷⁾。これらの核酸増幅検査では、主に細菌のリボソームの構成成分である 16S rRNA を標的としており、この中には全ての細菌に普遍的に存在する共通領域 (塩基配列) が存在する。つまり、この領域を標的とすることで血液製剤に混入した細菌を網羅的に検出することが可能である⁸⁾。

今回、血小板製剤の細菌スクリーニング法としての核酸増幅検査を評価するため、16S rDNA リアルタイム PCR 法 (PCR 法) を構築し、細菌接種後振盪保管した PC 試料を用いて培養法である VIRTUO と検出能を比較したので報告する。

材料および方法

1. 菌株

本研究で使用した菌株は、標準菌株 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) : NBRC13276, *Streptococcus dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*) : ATCC12394, *Escherichia coli* (*E. coli*) : NBRC15034, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) : PEI-B-P-08 と過去の輸血感染事例より検出された同菌種の臨床分離株を追加し 4 菌種 8 株で実施した。

2. 血液製剤

細菌接種には、採血 2 日目の照射 10 単位製剤 40 パッ

グ(4菌種×2株×5試験)を使用した。PCの無菌性確認のため、各製剤から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。

3. プライマー・プローブの設定

リアルタイムPCR用のプライマー・プローブは、Yangら⁹⁾の方法に従って16S rRNA領域の普遍領域を標的として設定した。プライマーは、Forward primer: P891F (5'-TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA-3')とReverse primer: P1033R (5'-TGCGGGACTTAACCAACA-3')を用いた。プローブはUniProbe (5'-CACGAGCTGACGACARCCATGCA-3')を用いた。

4. 増幅試薬中の混入細菌核酸の処理

事前検討により、試験に使用した増幅試薬のリコンビナントDNAポリメラーゼに細菌由来DNAの混入が確認されたため、増幅試薬中の混入細菌DNAの分解処理を行った。DNA増幅試薬(2×FastStart Universal Probe Master, Roche Biochemicals)にDNase I (Roche Biochemicals)を終濃度0.03U/μl混合後、増幅試薬を8連チューブに各17μl分注し、サーマルサイクラーにセット後、37℃、60minインキュベートして混入細菌DNAを分解した。その後、80℃、30minインキュベートしてDNase Iを失活させたあと、-30℃で凍結保管した。一方、プライマー・プローブ(Sigma-Aldrich)中にも製造工程中に混入したと思われる細菌DNAが確認されたため、プライマーを終濃度4μM、プローブを終濃度2μMになるよう調製し、限外ろ過フィルター(Amicon Ultra 0.5ml centrifugal filters 50K, Millipore)に400μl添加し、14,000rpm、10min(室温)遠心操作を行った。次に処理後の増幅試薬の評価を行うため、ターゲット領域を含んだプラスミドDNAを各2~5log copies/reactionに調製した標準DNA(N=3)と超純水(ナカライテスク, N=9)を各10μl使用して、前述のプライマー・プローブ3μl、増幅試薬17μlを添加し、計30μlの反応液を調製した。その後、Quant Studio 5(Thermo Fisher Scientific)を用いて、95℃/10secの後、95℃/15sec、60℃/1min、50cyclesのリアルタイムPCRを実施した。得られたThreshold cycle (Ct)値から混入細菌核酸の除去効果と検量線の結果から増幅試薬への影響を評価した。

5. PCR法のカットオフ値の設定

PC検体4本と超純水を各1ml(N=8) Pathogen Lysis Tube L (QIAGEN)に加え、14,000rpm、3min(室温)遠心後、上澄みを除去し、沈渣にATL buffer(QIAamp UCP Pathogen Mini Kit, QIAGEN)を200μl添加した後、10min破碎処理(Tissue lyser LT, QIAGEN)を行った。次に核酸抽出キット(QIAamp UCP Pathogen

Mini Kit, QIAGEN)を用いてDNAを25μl抽出した。その後、抽出産物10μlと前述で処理した増幅試薬とPCR条件でリアルタイムPCRを実施し、各PC検体と超純水のCt値を比較した。また、得られたPC検体のリアルタイムPCRの平均Ct値-3SDを算出し、本検査法のカットオフ値とした。

6. PCR法と培養法の検出能比較

各菌種の標準株及び臨床分離株を約100CFU/bag(0.3~1.0CFU/ml)となるようにPC10単位製剤5バッグに接種し、20~24℃で40時間振盪保管後、各バッグから試料を採取した。接種菌数と保管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℃で24~48時間培養後、コロニー数をカウントした。また試料各8mlを好気培養ボトル(BPAボトル, ビオメリユー・ジャパン)および嫌気培養ボトル(BPNボトル, ビオメリユー・ジャパン)9セット、バッグ容量のほぼ全量を接種し、BacT/ALERT VIRTUO(ビオメリユー・ジャパン)にて36℃で最長10日間培養した。一方、採取後-30℃で凍結保管したPC試料1mlから前述の抽出方法を用いて溶出液25μlで細菌DNAを抽出(N=1)し、そのうち10μl(PC試料0.4ml相当量)を用いて前述のリアルタイムPCRを実施して、VIRTUOと検出能を比較した。

7. 統計処理

データ解析は統計ソフトEZR(EZR version 1.37)¹⁰⁾を用いて実施した。混入細菌核酸の処理における試薬への影響の評価には共分散分析(ANCOVA)を、各血小板検体と超純水のCt値の比較には、Dunnett's testを用いた。危険率(P)5%未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. 増幅試薬中の混入細菌核酸の処理

増幅試薬中の混入細菌核酸の処理を行い、標準DNAと超純水のPCRを行った結果を表1、図1に示す。DNase I処理無しでは、超純水9本全てにおいて細菌DNAが検出された(平均Ct値36.0)。一方、DNase I処理有りでは、超純水の細菌DNAは確認されなかった。また、ANCOVAによる検量線の傾きの比較を行った結果、p値は0.825となり、有意差は確認されなかった。

2. 血小板検体の測定結果

各PC検体(No.1~4)と超純水から核酸を抽出後、前述で処理したPCR試薬を用いて測定した結果を表2および図2に示す。Dunnett's testの結果、超純水と各PC検体No.1~3のCt値に有意差が確認された。また、各PC検体間、同一検体内でもCt値にばらつきが確認

表1 DNase I 処理前後の試薬を用いた各標準 DNA の Ct 値

標準 DNA 濃度 (log copies/reaction)	処理前		DNase I 処理	
	Ct 値 (Mean)	検出数 /試験数	Ct 値 (Mean)	検出数 /試験数
5	22.3	3/3	22.2	3/3
4	25.8	3/3	25.7	3/3
3	29.5	3/3	29.6	3/3
2	32.9	3/3	32.8	3/3
超純水	36.0	9/9	検出せず	0/9

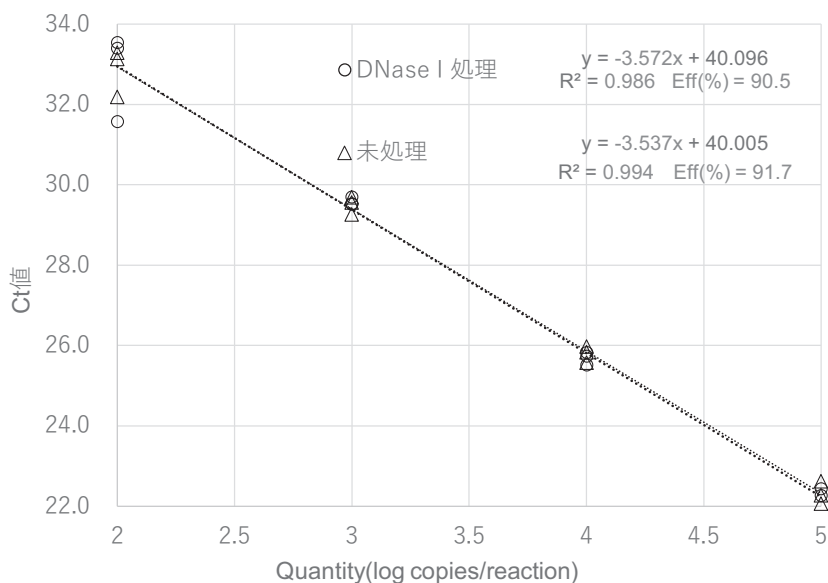


図1 DNase I 処理有無による検量線の比較結果

表2 細菌未添加血小板と超純水の Ct 値

検体	Ct 値		陽性数 /試験数	p-value
	Mean	SD		
PC No.1	35.9	1.8	8/8	0.005
PC No.2	36.6	2.4	8/8	0.022
PC No.3	35.9	2.0	8/8	0.005
PC No.4	38.0	2.1	7/8	0.330
超純水	39.8	2.2	6/8	—

され、No.3 の PC においては四分位範囲の 1.5 倍を超えた外れ値も確認された。カットオフ値は、PC 検体全体の平均 Ct 値 - 3SD に相当する 30.0 を設定（陽性：Ct ≤ 30.0）し、本検査法における陽性判定基準とした。

3. PCR 法と VIRTUO の検出能比較結果

細菌接種前の PC の細菌検査は全て陰性判定であった。これらの PC に各種細菌を接種し、40 時間経過した時点における PCR 法と VIRTUO との検出能の比較結果を表 3 に示す。S. aureus と S. dysgalactiae 標準株および臨床分離株と E. coli 標準株は VIRTUO と PCR 法のいずれも陽性となった。一方、E. coli 臨床株において菌濃度が 10CFU/ml 以下となった 2 バッグにおいては、

VIRTUO では 1 バッグ陽性、PCR 法ではいずれも陰性となった。K. pneumoniae では、菌濃度が 10CFU/ml 以下となった臨床株を接種した 1 バッグにおいて、VIRTUO では BPN で 9 本中 1 本のみ陽性、PCR 法では陰性となった。また、菌濃度が 1.7E+7CFU/ml 以上の高濃度検体において、標準菌株、臨床株ともに PCR 法で陰性となったが、抽出産物を溶出バッファーで段階希釈して再測定すると、8 倍希釈で全て陽性となった。

考 察

血液製剤、特に PC の細菌汚染による副作用は海外でも大きな問題となっており、各国で様々な対策が講じられている。その中でも多くの国で導入されているのが培養法による細菌スクリーニングである⁴⁾。イングランドでは、採血後 36~48 時間置いてからサンプリングし、培養を行う方式を導入後、2011 年から 2020 年までに PC による細菌感染事例は 1 例のみで死亡例は報告されておらず、大きな効果を示している¹¹⁾。細菌スクリーニング検査法には培養法以外にも測定原理の異なる検査法があり¹²⁾¹³⁾、本研究では、16S rDNA を標的としたリアルタイム PCR 法を構築し、細菌接種後振盪保管し

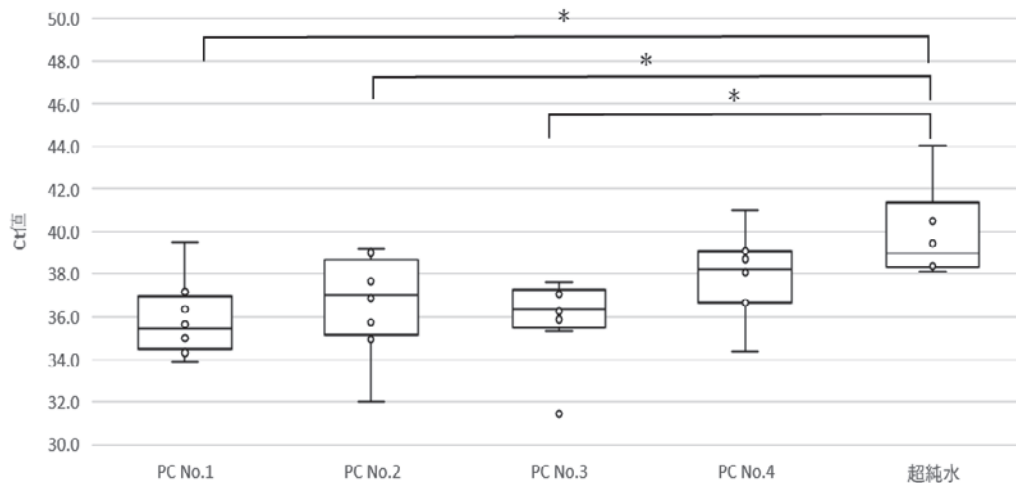


図2 細菌未接種血小板検体と超純水の Ct 値の比較結果
No. 1 ~ 4: 細菌未添加血小板検体
* $p < 0.05$

た PC 試料を用いて培養法である VIRTUO との検出能の比較評価を行った。

16S rDNA を標的としたリアルタイム PCR 法を構築する上で大きな問題となるのが試薬への細菌核酸のコンタミネーションである。一般的に市販されている PCR 用耐熱性 DNA ポリメラーゼは、*E. coli* でリコンビナント発現タンパク質として合成されており、宿主由来のゲノム DNA/RNA が少なからず混入しており問題視されている。これまでに増幅試薬中に存在している細菌由来の混入核酸の除去には、核酸分解酵素、制限酵素、UV 照射、Ethidium monoazido (EMA) 処理等により除去・不活化できることが報告されており^{14)~16)}、本検討では、核酸分解酵素処理で混入した細菌 DNA を除去できることを確認した。また、近年では、酵母で発現することにより原核生物の 16S rDNA を含まない PCR 用酵素等も販売されている¹⁷⁾。一方で、混入細菌 DNA を除去した増幅試薬を用いて PC 検体の抽出核酸の PCR を行うと、超純水に比べて有意に低い Ct 値を示すものがあつた。最近のヒトマイクロバイオームの研究では、健康な個人の血液にも極めて微量ではあるが、細菌 DNA/RNA が存在することが明らかとなっている¹⁸⁾。さらに、次世代シーケンサーを用いた献血者血液中の RNA/DNA の網羅的解析では、ALT 高値群において細菌ゲノム配列のリード数が多い傾向が確認されている¹⁹⁾。また、今回、細菌未接種の同一 PC 検体を用いた多重測定において外れ値が確認されており、核酸抽出を行う試験環境の影響も考えられる。実際に細菌の全ゲノム増幅においては、空气中に浮遊している微粒子に付着している環境細菌のコンタミネーションが問題となっている²⁰⁾。以上のことから、16S rRNA 領域を標的とするユニバーサルな PCR による細菌検出系を構築する場

合は、試薬由来、ヒト検体由来、環境由来の細菌 DNA のコンタミネーションが測定系にどの程度影響するかを事前に検討し、適切なカットオフ値を設定する必要がある。

PCR 法と VIRTUO の比較試験において、10CFU/ml 未満となった極低濃度のグラム陰性菌を含む PC の判定結果が二法ともに陰性もしくは VIRTUO のみ陽性となった。グラム陰性菌は、血漿成分の影響を受けやすく²¹⁾、保管中に増殖が抑制された可能性がある。また、二法で検出結果が異なった理由として、各検査法の検出感度の差が考えられる。VIRTUO はサンプル量が好気性ボトル、嫌気性ボトルのセットで各 8ml (計 16ml) と今回の PCR 法の 40 倍であることに加え、その検出感度は 1CFU/8ml と高感度である。一方、16S rRNA 領域を標的とした PCR の検出感度は、使用検体量、抽出量、さらには菌種や標的分子の種類 (16S rDNA もしくは 16S rRNA) によって大きく異なるが、5~750 CFU/ml²²⁾²³⁾ と培養法に比べて低感度であり、これらの差が検出結果に影響したものと考えられる。また、*K. pneumoniae* の高濃度検体の本 PCR 法による検出において、抽出核酸原液では PCR 増幅が確認されず、これを希釈することで PCR 増幅が確認された事例が計 7 例あつた。PCR 阻害物質には、ヘパリン、ヘモグロビン、多糖等が知られている。グラム陰性桿菌である *K. pneumoniae* は多糖体からなる厚い莢膜で覆われており、核酸抽出の際に、高濃度の多糖成分が抽出産物中に残存し、PCR 反応が阻害された可能性がある。現在、本法には内部標準 DNA を加えており、PCR 反応阻害のモニタリングができる系となっている (データ未掲載)。

以上を踏まえると、40 時間振盪保管した PC 試料の細菌検出において、PCR 法は VIRTUO と同等に細菌を

表3 VIRTUO と PCR 法の試験結果

菌株	試験 No.	接種菌量 (CFU)	40h 点での菌濃度 (CFU/ml)	BPA 培地		BPN 培地		PCR 法	
				陽性数/試験数	陽性判定時間 (h: mm) 最短~最長	陽性数/試験数	陽性判定時間 (h: mm) 最短~最長	陽性数 (Ct≤30.0) /試験数	Ct 値
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	130	1.7E+04	9/9	5:55~6:33	9/9	6:02~6:52	1/1	25.1
	2	130	1.4E+05	9/9	5:22~6:14	9/9	5:20~6:23	1/1	25.1
	3	130	8.2E+04	9/9	5:39~6:57	9/9	5:26~7:37	1/1	19.0
	4	120	1.7E+04	9/9	6:25~9:05*	9/9	7:03~11:16	1/1	20.6
	5	120	2.7E+05	9/9	5:13~5:43	9/9	5:14~5:46	1/1	21.0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	110	1.6E+07	9/9	2:47~2:52	9/9	2:46~2:53	1/1	16.4
	2	110	1.2E+07	9/9	2:44~2:58	9/9	2:44~2:48	1/1	18.1
	3	110	2.1E+07	9/9	2:44~2:57	9/9	2:44~2:48	1/1	12.4
	4	110	2.5E+07	9/9	2:47~2:51	9/9	2:47~2:51	1/1	11.0
	5	110	2.1E+07	9/9	2:47~2:51	9/9	2:47~2:50	1/1	16.9
<i>Escherichia coli</i>	1	110	9.1E+06	9/9	2:43~2:52	9/9	2:48~2:51	1/1	17.5
	2	110	2.6E+07	9/9	2:47~2:50	9/9	2:38~2:51	1/1	15.3
	3	140	3.3E+07	9/9	2:46~2:50	9/9	2:45~2:48	1/1	11.1
	4	140	9.8E+06	9/9	2:43~2:51	9/9	2:43~2:52	1/1	12.4
	5	140	1.7E+08	9/9	2:42~2:51	9/9	2:31~2:51	1/1	15.9
標準株 NBRC13276	1	110	3.2E+06***	9/9	2:48~3:01	9/9	2:49~3:02	1/1	18.4
	2	110	>1.0E+04***	9/9	4:07~4:36	9/9	3:57~4:18	1/1	20.0
	3	110	1.2E+05***	9/9	4:40~5:01	9/9	4:19~4:49	1/1	19.0
	4	110	8.0E+05***	9/9	3:06~3:18	9/9	2:46~3:06	1/1	17.5
	5	190	2.7E+05	9/9	4:34~4:46	9/9	4:14~4:35	1/1	21.3
標準株 NBRC15034	1	88	8.0E+05	9/9	2:42~2:52	9/9	2:42~2:51	1/1	13.5
	2	51	3.0E+05	9/9	2:42~2:51	9/9	2:43~2:52	1/1	13.4
	3	51	2.4E+05	9/9	2:43~2:50	9/9	2:43~3:04	1/1	12.0
	4	51	3.1E+05	9/9	2:43~2:51	9/9	2:45~2:52	1/1	12.2
	5	51	8.9E+05	9/9	2:43~2:52	9/9	2:43~2:52	1/1	13.1
臨床株	1	170	<10*	9/9	8:09~8:52	9/9	7:31~7:51	0/1	30.4
	2	170	2.3E+02	9/9	5:45~5:59	9/9	5:08~5:28	1/1	22.4
	3	170	<10*	0/9	—	0/9	—	0/1	38.1
	4	120	8.8E+05	9/9	2:44~2:53	9/9	2:43~2:46	1/1	12.0
	5	120	7.0E+01	9/9	7:12~7:44	9/9	6:30~6:52	1/1	28.3

高感度に検出することが可能であるが, 10CFU/ml 未満の極低濃度の細菌検出においては VIRTUO よりも

検出能が低い可能性が示唆された. 長期間 PC 中に極低濃度で存在し続ける細菌種の中には, 病原性は低い

表3 VIRTUO と PCR 法の試験結果 (続き)

菌株	試験 No.	接種菌量 (CFU)	40h 点での菌濃度 (CFU/ml)	BPA 培地		BPN 培地		PCR 法	
				陽性判定時間 (h: mm) 最短~最長		陽性判定時間 (h: mm) 最短~最長		陽性数 (Ct≤30.0) / 試験数	
				陽性数 / 試験数	陽性数 / 試験数	陽性数 / 試験数	陽性数 / 試験数		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	180	1.9E+08	1:17~1:38	1:11~1:22	9/9	9/9	1/1**	12.9
	2	180	2.4E+08	1:11~1:33	1:12~1:29	9/9	9/9	1/1**	13.6
	3	150	1.4E+08	1:10~1:19	1:15~1:18	9/9	9/9	1/1**	13.0
	4	150	2.7E+08	1:17~1:28	1:11~1:19	9/9	9/9	1/1**	13.7
	5	150	2.9E+08	1:22~1:44	1:10~1:21	9/9	9/9	1/1**	15.0
臨床株	1	100	1.3E+05	2:51~3:15	2:44~3:05	9/9	9/9	1/1	13.6
	2	100	1.1E+08	1:10~1:24	1:10~1:19	9/9	9/9	1/1**	14.0
	3	100	2.7E+03	5:07~5:35	5:07~5:27	9/9	9/9	1/1	20.7
	4	100	<10*	—	8:24	0/9	1/9	0/1	35.8
	5	110	1.7E+07	1:46~2:08	1:25~1:39	9/9	9/9	1/1**	13.6

* : 寒天塗抹培養法による検出限界以下。
 ** : 抽出産物を 8 倍希釈して PCR を実施した。
 *** : 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℃凍結保存したため、翌日融解して再測定した。

40 時間以降から増殖が起こる可能性が報告されている²⁴⁾²⁵⁾。そのため、PC 中に存在する細菌が極めて低濃

度であっても、可能な限り高い検出能で細菌を検出できるスクリーニング検査が求められる。この点に関して VIRTUO は、高感度かつ使用検体量も多いことから、現状最も適した細菌スクリーニング検査法であると考えられる。また、ボトルの充填から取り出しまでがフルオートメーション化されており、煩雑な操作が必要ないことから操作性も優れている。

一方、測定時間を比較すると、VIRTUO では、菌種、株によって細菌が陽性と判定されるまでに時間差があるため(表 3)、実際のスクリーニングでは 24 時間の培養を想定している。しかし、核酸増幅検査は、核酸抽出から PCR 増幅・検出まで、菌種によらず約 3 時間で完了するため、培養法よりも結果判定までの時間が短くなり、医療機関へ迅速な PC の供給が可能と考えられる。また、臨床上大きな問題とならない皮膚常在菌である *Cutibacterium acnes* に関して、培養法では BPN ボトルによって培養後期で検出される可能性が考えられるが²⁶⁾、本法では使用したフォワードプライマーに 3 塩基のミスマッチ²⁷⁾があることに加えて、当該菌自体が通性嫌気性菌で血液製剤中では増殖しにくい²⁵⁾²⁸⁾ため、検出される可能性は低いと考えられる。一方で、今回評価した測定系は、In-house PCR であり、現在スクリーニング検査として利用できる市販のユニバーサル細菌検出用の核酸増幅検査試薬やハイスルーブット処理できる自動化機器は存在しない。そのため、実際の細菌スクリーニング検査法として評価するためには、これらの開発が前提として必要だろう。

以上のことから、今後細菌 DNA の混入に対応した核酸増幅検査試薬や自動化機器が開発されれば、細菌 16 S rDNA リアルタイム PCR 法は実用的な細菌スクリーニング検査法の一つとして期待できる。

著者の COI 開示：著者全員が血小板製剤を販売している日本赤十字社の職員である。

文 献

- 1) 名雲英人, 篠崎久美子, 木村 泰, 他: 初流血除去による細菌汚染低減効果の検証. 日本輸血細胞治療学会誌, 53 (6) : 598—601, 2007.
- 2) Benjamin RJ, Braschler T, Weingand T, et al: Hemovigilance monitoring of platelet septic reactions with effective bacterial protection systems. *Transfusion*, 57 (12): 2946—2957, 2017.
- 3) McDonald C, Allen J, Brailsford S, et al: Bacterial screening of platelet components by National Health Service Blood and Transplant, an effective risk reduction measure. *Transfusion*, 57 (5): 1122—1131, 2017.

- 4) Pietersz RNI, Reesink HW, Panzer S, et al: Bacterial contamination in platelet concentrates. *Vox Sang*, 106 (3): 256—283, 2014.
- 5) 松本真実, 池田洋平, 蕎麦田理英子, 他: 血小板製剤の細菌検査における BacT/ALERT VIRTUO の評価. *日本輸血細胞治療学会誌*, 67 (3) : 432—439, 2021.
- 6) Schmidt M, Seifried E: Current status of bacterial detection in blood components — successes and challenges. *ISBT Science Series*, 7 (1): 207—213, 2012.
- 7) Schmidt M, Arcos SR, Stiller L, et al: Current status of rapid bacterial detection methods for platelet components: A 20-year review by the ISBT Transfusion-Transmitted Infectious Diseases Working Party Subgroup on Bacteria. *Vox Sang*, 117 (8): 983—988, 2022.
- 8) 草場耕二: 16S rRNA を指標とした微生物の検出. *臨床検査*, 57 (4) : 398—405, 2013.
- 9) Yang S, Lin S, Kelen GD, et al: Quantitative Multiprobe PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification to Species Level of Bacterial Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (9): 3449—3454, 2002.
- 10) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation*, 48 (3): 452—458, 2013.
- 11) Bellamy M, Narayan S, Davies J, et al: The Serious Hazards of Transfusion (SHOT) Steering Group. The 2020 Annual SHOT Report, 2021.
- 12) Dreier J, Vollmer T, Kleesiek K, et al: Novel flow cytometry-based screening for bacterial contamination of donor platelet preparations compared with other rapid screening methods. *Clinical chemistry*, 55 (8): 1492—1502, 2009.
- 13) Sireis W, Rüster B, Daiss C, et al: Extension of platelet shelf life from 4 to 5 days by implementation of a new screening strategy in Germany. *Vox Sanguinis*, 101 (3): 191—199, 2011.
- 14) Heininger A, Binder M, Ellinger A, et al: DNase pretreatment of master mix reagents improves the validity of universal 16S rRNA gene PCR results. *Journal of clinical microbiology*, 41 (4): 1763—1765, 2003.
- 15) Corless CE, GUIVER M, BORROW R, et al: Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *Journal of clinical microbiology*, 38 (5): 1747—1752, 2000.
- 16) Alexandrino F, Malgarin JS, Krieger MA, et al: Optimized broad-range real-time PCR-based method for bacterial screening of platelet concentrates. *Brazilian Journal of Biology*, 81 (3): 692—700, 2020.
- 17) Niimi H, Mori M, Tabata H, et al: A novel eukaryote-made thermostable DNA polymerase, which is free from bacterial DNA contamination. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (9): 3316—3320, 2011.
- 18) Castillo DJ, Rifkin RF, Cowan DA, et al: The healthy human blood microbiome: fact or fiction? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 148 (9): 1—12, 2019.
- 19) Furuta RA, Sakamoto H, Kuroishi A, et al: Metagenomic profiling of the viromes of plasma collected from blood donors with elevated serum alanine aminotransferase levels. *Transfusion*, 55 (8): 1889—1899, 2015.
- 20) Takahashi H, Satoh T, Kanahara H, et al: Development of a bench-top extra-cleanroom for DNA amplification. *Biotechniques*, 61 (1): 42—46, 2016.
- 21) 平山順一, 東 寛, 藤原満博, 他: M-sol で調製した洗浄血小板および多血小板血漿 (PRP) 中での細菌増殖. *日本輸血細胞治療学会誌*, 57 (5) : 398—402, 2011.
- 22) Rood IGH, Pettersson RA, Savelkoul PHM, et al: Development of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for eubacterial RNA detection in platelet concentrates. *Transfusion*, 50 (6): 1352—1358, 2010.
- 23) Rood IGH, Pettersson RA, Savelkoul PHM, et al: Performance and suitability of polymerase chain reaction for early detection of bacteria in platelet concentrates. *Transfusion*, 51 (9): 2006—2011, 2011.
- 24) Murphy WG, Foley M, Doherty C, et al: Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety. *Vox sanguinis*, 95 (1): 13—19, 2008.
- 25) 杉浦さよ子, 高橋 勲, 井上千加子, 他: 細菌を接種した血小板製剤における 3 種類の細菌検出システムの評価. *日本輸血細胞治療学会誌*, 53 (1) : 35—42, 2007.
- 26) Amano M, Matsumoto M, Sano S, et al: Characteristics of False-Positive Alarms in the BacT/Alert 3D System. *Microbiology Spectrum*, e00055—22, 2022.
- 27) Rood IGH, Koppelman MHGM, Pettersson A, et al: Development of an internally controlled PCR assay for broad range detection of bacteria in platelet concentrates. *Journal of microbiological methods*, 75 (1): 64—69, 2008.
- 28) 名雲英人, 佐竹正博: 輸血用血液製剤の細菌汚染の現状と対策. *日本輸血細胞治療学会誌*, 60 (1) : 3—11, 2014.
- 29) Yuan JS, Reed A, Chen F, et al: Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 7 (1): 1—12, 2006.

EVALUATION OF 16S rDNA REAL-TIME PCR AS A BACTERIAL SCREENING METHOD FOR PLATELET CONCENTRATES

Takashi Yoshimasa, Mami Matsumoto, Yohei Ikeda, Rieko Sobata, Makiko Kojima, Keiji Matsubayashi and Masahiro Satake

Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, Japanese Red Cross Society

Abstract:

In Japan, transfusion-transmitted bacterial infection remains an ongoing problem, and further preventive measures are necessary to ensure blood safety. Here, we developed a bacterial 16S rDNA real-time PCR assay (PCR assay) and compared its detectability with that of a fully automated blood culture system, BacT/ALERT VIRTUO (VIRTUO) by testing bacteria-spiked platelet concentrate (PC). All PC samples stored for 40 hours after inoculation with 4 bacterial species with a total of 8 strains tested positive by both methods, except for three samples with low bacterial concentrations under the detection limit (10 CFU/ml) by the agar plate culture method. However, PCR assay may have lower detectability than VIRTUO when testing slow-growing bacteria in PC. This PCR assay has a shorter running time than VIRTUO of about 3 hours, and incorporation of internal control allows the monitoring of false-negative results by PCR inhibitors.

Further development of bacterial DNA-free PCR reagents together with an automatic assay system will likely make this PCR assay a practical bacterial screening method.

Keywords:

bacterial screening test, 16S rRNA, real-time PCR, BacT/ALERT VIRTUO