別紙１

緊急用血小板の細菌培養検査　フローチャート

I.　方法

①　サンプリングバッグの接続

1. 担当者は、無菌接合するため、TSCDⅡ付近に製剤、サンプリング用バッグ、クレンメ及びTSCD ウエハーを準備する。
2. 製剤のチューブにクレンメを取り付ける。
3. TSCDⅡに TSCDⅡウエハーを取り付ける。
4. TSCDⅡの操作説明書に従い製剤とサンプリング用バッグを同機器に取り付けて接続する。
5. TSCDⅡから製剤とサンプリング用バッグを取り外し、接続部を開通して血液漏れがないか状態を確認する。

②　サンプリングバッグの作製

1. 血小板製剤から一部を採取し、サンプリング用バッグとする。
2. 製剤バッグを 5 回混和する。
3. 製剤バッグをサンプリング用バッグより高くし、クレンメを外して自然落下によりチューブ内に血液を満たす。満たされたら、クレンメを取り付ける。チューブ内に血液を満たすときは加圧しないこと。
4. チューブ内の血液を製剤バッグに戻す。
5. 1～3 の操作を 3 回繰り返す。3 回目にチューブ内を血液で満たし、サンプリング用バッグ内に 20mL 以上になるよう天秤で秤量してクレンメを取り付ける。
6. チューブシーラーでシールし（シール位置は決める必要あり）、サンプリング用バッグに製造番号を記入する（ダブルチェック）。
7. 製剤バッグとサンプリング用バッグを切り離す。
8. サンプリングバッグの作製が終了した製剤バッグは、細菌検査が終了するまで、適切な状態で保管する。

③　細菌検査準備

1. サンプリング用バッグ、培養ボトル（好気用ボトル及び嫌気用ボトル）、ポピドンヨードエタノール及び滅菌綿棒を準備する。
2. 培養ボトルにサンプリング用バッグに記入した製造番号を記入する。
3. サンプリング用バッグの製造番号と培養ボトルに記入した製造番号の一致をダブルチェックする。
4. 資材を安全キャビネット内に搬入する。
5. 使用する分の器具を開封し、取りやすいように置いておく。
6. 滅菌済みパウダーフリーグローブを装着する。
7. 滅菌済みパウダーフリーグローブが入っていた袋を広げ、使用する器具を中に入れる。

④　器具装着準備

1. 操作アダプターをサンプリングバッグのピールタブ部位に装着する。
2. シリンジは注射針の接続に緩みがないことを視認し、シリンジ内部のエアーを抜くこと。
3. 注射針、操作アダプターは、開封後は汚染の可能性のあるものと接触させないこと。接触した場合は交換すること。

⑤　検体採取

以下 1.～5. の処理は、１本ずつ一連の作業として実施する。

1. 培養ボトル（好気用ボトル及び嫌気用ボトル）の接種部表面をエレファコットンエコ E で消毒し、表面が乾燥するまで放置する。
2. サンプリングバッグと培養ボトル（好気用ボトル及び嫌気用ボトル）に記入した製造番号が一致していることを確認後、サンプリングバッグをよく撹拌し、操作アダプターのキャップをはずす。
3. 操作アダプターにシリンジの注射針を差し込み、検体 20mL を採取する。
4. シリンジから針を外してブラッドトランスファーデバイスに装着し、採取した検体を血液培養ボトルの好気および嫌気ボトルに 8mL ずつ分注する。
5. 血液培養ボトルを、BACTECTM FX に投入し、6 日間培養する。
6. 滅菌スピッツに 4mL を分注し、テーブルトップ遠心機にて 3,000G、10 分で遠心する。
7. 遠心後、滅菌スポイトにて上清を除去し、同スポイトにて沈査を混和する。
8. 混和した沈査を同スポイトで吸い、ChocolateⅡAgar に 1 滴滴下する。その後、同スポイトを HK 半流動生培地の奥までに突き刺し、残った沈査を排出しながら抜く。
9. ChocolateⅡAgar に滴下した沈査を、エーゼを用いて４分画に塗り広げ、5%CO2 環境にて 48 時間培養を行う。また、HK 半流動生培地は、通常大気環境にて６日間培養を行う。

II. 結果判定

- **陰性**：24 時間時点で未発育を確認できた時、陰性と判定し報告する。ただし、継続培養し 6 日後に最終報告を行う。また、HK 半流動生培地および ChocolateⅡAgar にて、発育が確認されない時。

- **陽性**：以下、菌の発育が確認され次第、速やかに関係機関に連絡する。
  - 血液培養ボトル

  培養装置にて陽性判定された場合
  - HK 半流動生培地

  培地に混濁が見られた場合に塗抹を作成し、塗抹で菌が確認された場合。
  または、羊血液寒天培地（BD）にサブカルチャーを実施しコロニーの発育が認められた場合。
  - ChocolateⅡAgar

  24 時間、48 時間で培地を確認し、菌の発育が確認された場合。

III. 準備

①　使用機器

1. 無菌接合装置（TSCDⅡ）（テルモ）
2. チューブシーラー（川澄化学工業株式会社）
3. BACTECTMFX（BD）
4. 安全キャビネット（Thermo）
5. テーブルトップ遠心機（KUBOTA）

②　使用資材

1. サンプリング用バッグ（テルモ分離バック　BB-T008FJ 50 セット入８０ml エアフィルタ付）
2. クレンメ（テルモ）
3. TCSD ウエハー（テルモ）
4. 操作アダプター（テルモ）
5. 20mL 針付きシリンジ（テルモ）

6. ブラッドトランスファーデバイス（BD）
7. エタノール（エレファコットンエコE）
8. 滅菌済みパウダーフリーグローブ（メドライン・ジャパン）
9. 滅菌綿棒（ケンツメディコ）
10. BD バクテック TM 22F 好気用レズンボトルP（BD）
11. BD バクテック TM 22F 嫌気用レズンボトルP（BD）
12. HK 半流動生培地（極東）
13. ChocolateⅡAgar（BD）
14. 滅菌スピッツ（アジア器材）
15. 滅菌スポイト（ビーエム）

Ⅳ. 対象菌種（添付文書より）

➢好気用血液培養ボトル

好気および通性環境で発育することができる細菌を対象とする。
以下、品質管理に使用されている菌株。

・*Neisseria meningitidis* ATCC13090
・*Candida glabrata* ATCC66032
・*Haemophilus influenzae* ATCC19418
・*Staphylococcus aureus* ATCC25923
・*Streptococcus pneumoniae* ATCC6305
・*Esherichia coli* ATCC25922
・*Streptococcus pyogenes* ATCC19615
・*Alcaligenes faecalis* ATCC8750
・*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

※ATCC：American Type Culture Collectuion に登録されている標準菌株で、培地や試薬などの性能を査定・評価するために使用される。

➢嫌気用血液培養ボトル

嫌気および通性環境で発育することができる細菌を対象とする。
以下、品質管理に使用されている菌株。

・*Clostridium histolyticum* ATCC19401
・*Clostridium perfringens* ATCC13124
・*Streptococcus pneumoniae* ATCC6305
・*Bacteroides fragilis* ATCC25285
・*Esherichia coli* ATCC25922
・*Bacteroides vulgatus* ATCC8482
・*Staphylococcus aureus* ATCC25923

➢HK 半流動生培地

好気、通性および嫌気環境で発育する菌を対象とする。
ただし、*Haemophilus influenzae* は発育しない。

➢Chocolate Ⅱ Agar

Haemophilus 属菌、*Neisseria* 属菌などの栄養要求の厳しい細菌を対象とする

参考文献

- 血小板製剤の細菌検査における BacT/ALERT VIRTUO の評価
- 輸血用血液製剤の細菌汚染の現状と対策
- Clinical Microbiology Procedures Handbook Body Fluid Culutures (Excluding Blood, Cerebrospinal Fluid, and Urine)
- BD BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials 添付文書
- BD BACTEC Plus Anaerobic/F Culture Vials 添付文書
- 極東 HK 半流動生培地 添付文書
- チョコレート II 寒天培地 添付文書

【参考】

① ブラッドトランスファーデバイス





② BD バクテック ™ 22F 好気用レズンボトル P



⑥　無菌接合装置：TSCD Ⅱ



