

標準作業手順書

ウイルス核酸増幅検査作業の基本
《汚染を防止するP2検査室内作業手順》

株式会社ビー・エム・エル

業務名	ウイルス核酸増幅検査作業の基本《汚染を防止するP2検査室内作業手順》
目的	安全キャビネットでの検体分注をはじめとしたP2検査室内作業において、高ウイルス量検体からのコンタミネーションを防止するための重要ポイントを注記する。
対象範囲	新型コロナウイルスPCR検査
関係部署	BMLグループで当該検査を実施している全事業所
手順概要	<p>以下の7項目について、検体中のウイルスもしくは抽出したウイルスRNAの混入によるPCR検査の偽陽性を防止するための注意点や、汚染の監視方法について記載する。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. P2検査室内の作業レイアウト 2. 防護着・防護具・手袋着用のルール 3. 安全キャビネット作業の基本 4. ピペットチップの選択 5. 検体の取り扱い 6. 廃棄物の処理 7. 作業台・床の定期清掃作業 8. 室内のワイプ試験の実施

1. P2検査室内の作業レイアウト

- 検査用防護服への着替え、防護具の装着、サンダルの履き替えを行う前室は、何も手に持たずに人だけが行き来するようにし、物品はパスBOXを介して出し入れできることが望ましい。
 注) 前室、パスボックスにUV灯が備わっている場合は必ず10分以上、1時間程度まで、点灯を励行する。
- 搬送箱開梱、受付・仕分け作業を行うエリアと検体分注を行う安全キャビネットエリアはなるべく距離を空けて配置し、床に線引きするかスノコを置き、サンダルを履き替えて行き来する。
- 廃棄物は、清潔に保つ場所（スノコ等）に置くことのないよう注意する。
- 試薬調製（不活化液の分注やPCR反応液の混和調製など）の作業場所はP2検査室の外に設け、クリーンなエリアであれば、クリーンベンチを使用する必要はない。
- MagNA Pure 96（RNA抽出機）、およびライトサイクラー480Ⅱ、Z480（PCR増幅機）はP2検査室の外に出す。
 注1) 抽出済みRNAは強力なコンタミネーションの発生源となるので要注意。
 注2) PCR後のプレートはシールやチューブキャップで密封された状態で廃棄されるのでPCR産物の汚染は起きないが、基本的にPCR産物が存在する部屋で検体分注作業を行うべきではない。

2. 防護着・防護具・手袋着用のルール

- P2検査室への入室手順（BML総合研究所の例）
 - ・通常の検査室で着用の白衣（水色）は、入室前に脱ぎ、前室手前の白衣掛けに掛ける。
 - ・セキュリティカードキーを用いて前室に入室。



- ・履物を手前の下駄箱に入れる。
- ・P2検査室専用の白衣を着る（ディスプレイザブルまたは白布の白衣）。



- ・奥の下駄箱にあるP2検査室専用サンダル(茶色)を履く。



- ・左手にあるボタンを押してドアを開け、P2検査室に入る。
*奥のドアは、手前の入り口ドアが閉まっていないと開かない。



- ・コロナ検査担当者は、さらに奥にある前室で目的に応じた防護服に着替える。
*茶サンダルから黒サンダルに履き替える。茶サンダルは右下の棚にしまう。
*白のP2検査室専用白衣を脱いでハンガーに掛け、青い防護服(S. M. L)に着替える。
*帽子、使い捨てのマスクを着用。



・入室してすぐ右手にあるゴーグルを付ける。



・中に着ている服の袖を覆うように手袋を着用する。

* 検体の蓋を開けない場合は1重



* 検体の蓋を開ける場合(分注者)は2重



- ・検体分注作業者は、防護服の上にさらにブルーのプラスチックエプロンを着用する。



- P2検査室からの退室手順

- ・汚染されているものをP2検査室内で外す。
 - *ゴーグルはアルコールを吹きかけてペーパーで拭く。
 - *防護服は汚染されている可能性のある外側が内側になるように丸めて、オートクレープ用の緑の袋に入れる。
 - *マスク、帽子、手袋はオートクレープにかけて処分するため、緑の袋に入れる。
 - *手袋は最後に外す。なお、外すときは裏返しにし、外側の面が露出しないように丸めて捨てること。



- ・手指のアルコール消毒を行う。



- ・中の前室に入り、黒サンダルから茶サンダルに履き替える。
- ・P2検査室専用白衣を着てBSL2管理区域を出る。
- ・外の前室でP2検査室専用白衣と茶サンダルを脱ぎ、洗面台で手を洗う。



- ・自身の靴に履き替え、前室から外に出る。

3. 安全キャビネット作業の基本

- 前面扉の開口は、作業時は20cm程度にとどめ、物の出し入れ時にも不用意に開け過ぎないように注意する。
- 作業開始前に、テーブル面をアルコール清掃する。
- ベンチ内に入れるピペッター、チップBOXなどもアルコール綿で拭う。
- ピペッターラック、ピペッター、検体ラック、分注先チューブラック、チップBOX、チップ廃棄袋などを適切にテーブル配置する。
 註) 右利きであれば、チップの廃棄袋は必ず右の一番奥に置く。
- チップの廃棄は、処理検体数に応じて適切なポリ袋（小型のレジ袋～大型のデイスバッグ）を用意して、袋の口を大きく開けて廃棄し易くし、また、チップからの液滴の跳ね返りを防ぐために十分な深さ（20～30cm）の袋を、ラックに装着して右奥に配置する。



- ・総研では左写真の比較的大型のデイスバッグを使用。新品を都度用いているため、アルコール拭きしたテーブル面に直に置いているが、ラックを使用して開口部を固定した方がよい。
- ・廃棄チップがある程度溜まったら、時々アルコールスプレーを掛けるか、洗気瓶に入れたアルコールを注入する。
- ・安全キャビネットから外に出す際には、必ず中で袋の口を結わえる。



チップ廃棄袋の使用例。テーブル面に直置きしているが、倒れてチップが溢れ出る恐れがあるため、薦められない（左写真）。

下の写真のような、ポリ袋を固定するラックを使用することを推奨する。



【参考】扱い数に応じて、チップ廃棄袋の大きさ、受け皿の形や大きさを適宜調節する。小型のプラスチック缶のような容器にポリ袋を入れてもよい。中にアルコールを染み込ませたペーパータオルを敷き、廃棄したチップが中で跳ね返らないように配慮する。

- ピペッターは「検体分注専用」と表示し、使用前後はアルコールで十分に拭いて清掃し、ホルダーに掛けるか、ピペッターを入れる収納BOXなどを用意して保管管理する。その他の目的には絶対に使用しない。



- 安全キャビネット内には、使用する一本のピペッターだけをアルコールで拭き掃除した上で中に入れ、テーブル面に直に置かず、次頁の写真のような簡易なピペトラックに置くようにする。ラックはアルコール清掃ができるシンプルなものであればどのようなものでもよい。



- ピペッターは、先端部がなるべく細く、長いタイプのもを選ぶ。推奨はエッペンドルフやFINNPIPETTEのような形状のもの。ギルソンのピペットマンは、金属のイジェクターが鞘の側面に付いており、検体チューブ内壁に接触し易いことやアルコール清掃しにくいことから、検体分注用には適さない。



エッペンドルフ



FINNPIPETTE



ピペットマン (ギルソン)

【注意】 日々使用するピペッターの拭き掃除はアルコール（消毒用）を用いる。核酸（DNA/RNA）を分解するには次亜塩素酸ナトリウム（ハイター、ピューラックス）が有効であるが、作業前にピペッターや手袋を次亜塩素酸ナトリウムで拭ってはいけない。残存する溶液が万一手袋やピペッターを介して検体や処理液に混入すると核酸が分解されてPCR反応が偽陰性となるため要注意。次亜塩素酸ナトリウム清掃は、作業が完全に終了した後や、作業しない日に行う。

4. ピペットチップの選択

- チップは、検体採取用にはなるべく長いタイプ（9～10cm）のものを採用する。50mLの唾液検体チューブは、チューブ径が大きいのでチップやピペッターの鞘の部分が検体チューブ内壁に触れるリスクは少なく検体採取が可能であるが、15mLチューブに入っている鼻咽頭拭い液（輸送メディウム）を採取する際にはチューブ内壁への接触には細心の注意を払うこと。

《選定基準》

- ・ DNase/RNaseフリーであること。：核酸検査用には必須条件
- ・ フィルターおよびチップ素材が疎水性であること。
 - 注1) 万一、吸引時にフィルターに検体サンプルが付着したとき、疎水性でないとフィルター内に染み込み、シリンダー内に浸入してコンタミネーションの原因になる。
 - 注2) チップ素材も疎水性の強いタイプでないと、サンプル排出時に液切れよく全量を出し切ることができない。チップに液滴や気泡が残るとチップ廃棄のときに汚染を拡げる危険性がある。
- ・ 可能であれば先端開口部の径の大きい「ワイドポア」タイプを選ぶ。：粘性の強い唾液の吸引には有効

- 10～50 μ L程度の少量の検体を採取することが必要な場合には、1000 μ Lチップ用ピペッターでは容量調節ができない場合があるため、200 μ Lチップとそれに適合するピペッターを使用するが、検体採取用には同様にチップ長が9cm程度の長いタイプを採用する。但し、粘性の強い唾液を吸引する場合には「ワイドポア」タイプを使用する必要がある。

5. 検体の取り扱い

- 検体チューブからの採取操作は、分注先のIDの取り違え防止や検体の飛沫汚染防止のため、両チューブを下記の写真のように左手に持ち、分取したピペットチップは最短経路で分注チューブに静かに移すようにする。



【注意】

・検体チューブは、開栓の前に必ず遠心して、蓋の内側や内壁に濡れて付着してる検体を下に落として取り除くこと。

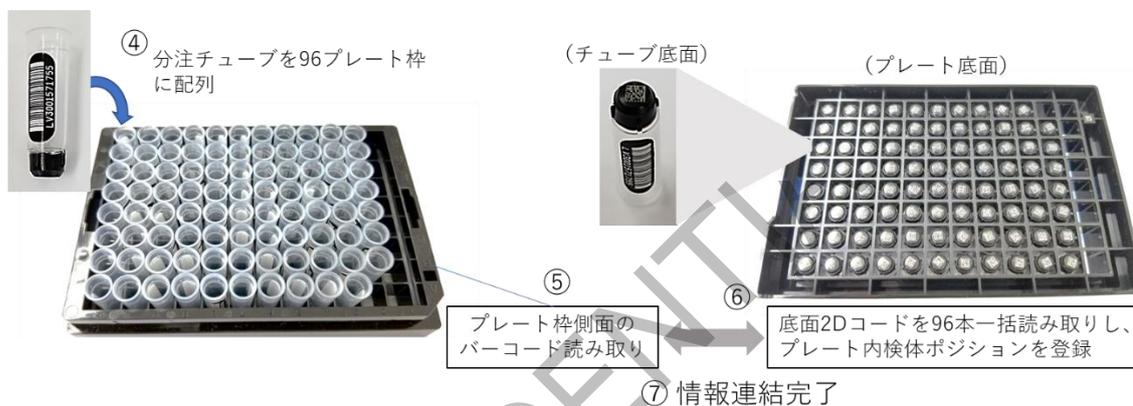
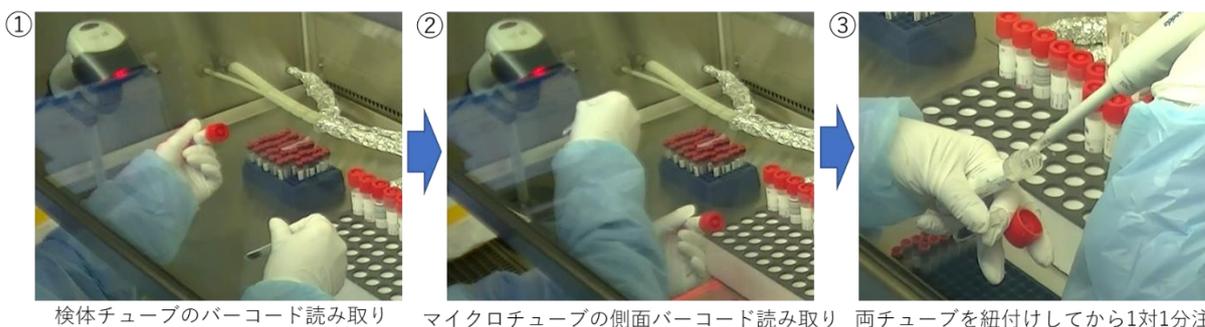
・但し、元々蓋の閉まりが緩い場合には、ネジ部分に毛細管現象で検体が浸入していることがある。その状態で遠心すると、検体がチューブの外側を伝って表面を汚染する危険性がある。

・遠心はバイオハザードのシールドカバー付きバケットの使用が必須であるが、遠心ラックに検体チューブを並べるときには蓋の閉まりに注意して緩く感じるものは増し締めする（必要に応じてパラフィルムを巻く）。

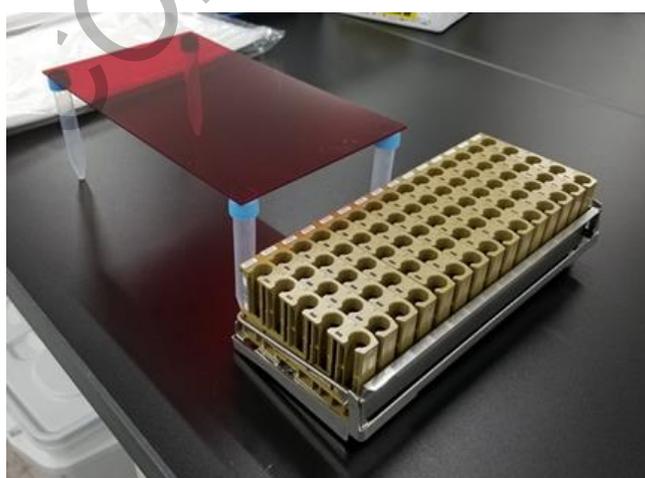
- ラックに立てた分注先のチューブは、分注するチューブのみ、都度、直前に蓋を開けるようにし、一度に複数本の蓋を開けないように厳重注意する。
- 96ウェルのプレートに手で分注する場合には、少なくとも縦の1列のみを露出して他の列のウェルを覆い隠すことができるようなカバー（アクリル板）を作製し、飛沫コンタミネーションのリスクを下げる必要がある（下写真）。



注) 前頁のようなカバーを利用した96ウェルプレートへのサンプルの手分注は、ウェルの間隔が近接しているためコンタミネーションのリスクを排除できない。対策として、96プレートフォーマットに配置できるマイクロチューブに、バーコード照合しながら1対1で手分注し、元検体ID-マイクロチューブID-プレートID-ウェルポジションの情報を連結させた上で、自動分注機を用いて次工程の96ウェルプレートに分注させることも有効である。



- コバス8800/6800システムでの測定では、下写真のような5本ラックが並ぶトレイを安全キャビネット内に入れ、5mLの専用チューブに検体を分注してラックに並べていく。その際、測定装置に投入するまでチューブはキャップをせずに、1トレイ分の分注作業が終了するまで開放状態で置かれるため、分注済みラックの列に位置合わせしながら被いを掛ける器具（下写真の赤いアクリル板）を準備することもコンタミネーション防止の一例である。



6. 廃棄物の処理

- 検体を採取したチップの廃棄は嚴重に注意する。安全キャビネット内でディスバッグの口を堅く結わえてから外に出し、オートクレーブ処理するバッグ（緑色の袋）に納める。

【注意】

- オートクレーブ処理するバッグの口は結束バンドできつく縛ること。
- チップの他、検体が付着したものはディスバッグに封じてから緑色バッグに納める。密封が不十分であると、オートクレーブ処理後の蒸気が室内に逃げたとき、検体中のウイルス核酸がエアロゾルとなって漂うリスクがある。加熱処理でウイルスの感染性はなくなるが、DNA/RNAは分解されず、PCR増幅の鋳型となってコンタミネーションを招く恐れがある。

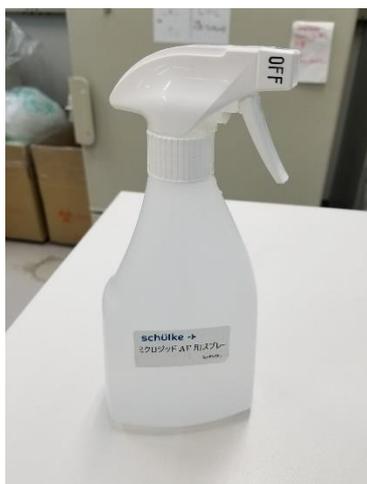


- オートクレーブ処理して感染性をなくした廃棄物は、鋭利なものが入っていないことを確かめた上で、医療産業廃棄物（厚手ビニール内張り段ボール）としてP2検査室外に搬出し、所内の炉で焼却する。



7. 作業台・床の定期清掃作業

- 検査作業開始前に、作業台、安全キャビネット内をアルコール拭き清掃する。



特徴

- 希釈不要でそのまま使用できるアルコール除菌剤です。
- 短時間で細菌・ウイルスなどへの除菌効果を発揮します。
- 速乾性で残留物が残りません。
- 二度拭きは不要です。
- ※手指衛生製品ではありません。

仕様

- 品名：マイクロジット AFリキッド
- 容量 (L)：1
- 成分：エタノール (25%)、1-プロパノール (35%)、香料
- VAH (ドイツ応用消毒衛生協会) 認証製品、IHO (ドイツ衛生及び表面保護商業協会) リスト掲載製品
- 付属品：500mLスプレーボトル
- 使用範囲：ベッド柵やテーブル表面など患者周辺、施術ユニット、診察台、手術台、作業台等
- ボトルサイズ：80×110×210mm
- 重量：1000g
- 容器材質：PP

- 安全キャビネット内で使用するピペッターや備品類も、出し入れの都度、アルコールで拭く。
- 検体分取するピペッターは、作業中、検体チューブに少しでも接触したと感じた場合には直ちにアルコールで拭き掃除する。
- ウイルスの不活化液にはグアニジン塩酸塩が使用されているため、安全キャビネット内では次亜塩素酸ナトリウム (ハイター、ピューラックス) は使用しない。
注) グアニジン塩酸塩と次亜塩素酸ナトリウムが混ざると有毒な塩素ガスが発生するので要注意。
- すべての作業が終了したのち、再びアルコール清掃を行い、安全キャビネットについてはUVランプを点灯してウイルスの不活化を徹底する。
注) UVランプは照射範囲のみ有効。陰になるところや物の底面には無効であることに注意する。
- DNA/RNAは、加熱、アルコール、UVでは変化しない。PCR増幅への汚染源にならないよう化学的に分解するためには、次亜塩素酸ナトリウムによる清掃が有効。但し、上述のように塩素ガス発生危険性があるため、作業終了後に週に一度程度、0.1%のピューラックスで作業台や床面の清掃を行うことが望ましい。
- 手指のアルコール消毒用には、別にスプレータイプ、あるいはジェルタイプのものを常備し、作業中は検体付着の危険性があるため、プラスチック手袋の上からでも頻回に消毒することに努める。



8. 室内のワイプ試験の実施

P2検査室内には、検体に由来するウイルス粒子が安全キャビネット外（作業台、遠心機、床など）に付着している可能性があるため、定期的な拭き掃除を実施するが、その効果を確認するためにワイプ試験も定期的の実施することが望ましい。

- P2検査室外で調製した1mLの生理食塩水を分注した15mL遠心管と綿棒（真綿ではなく、ポリエステル、レーヨン、ダクロンなど）を10～20セット準備する。
注）部屋の広さに応じて綿棒で拭う箇所は適宜増減させる。
- 綿棒で以下の箇所を中心に広く満遍なく十分に拭い、軸を折って生食入り遠心管に回収する。
 - ・すべての検体分注用ピペッターの握り部分、および先端の鞘の部分
 - ・安全キャビネットのテーブル面と把手部分
 - ・遠心機のバケット内、チューブラック内、チャンバー内
 - ・冷蔵庫・冷凍庫の把手
 - ・作業台
 - ・オートクレーブの蒸気排出口近辺および把手
 - ・複数の検体ラック、スタンド
 - ・その他の箇所
- サンプルングした遠心管を、通常の鼻咽頭スワブ検体に見立てて、常法に従ってPCR検査する。
- 結果を確認し、常に「陰性」となることが求められるが、万一「陽性」箇所があった場合には、該当スミア箇所を確認して重点的に次亜塩素酸ナトリウムとアルコールで拭き掃除する。