

Bakteriekontroll av trombocytter - fallgruver

Mirjana Grujic Arsenovic

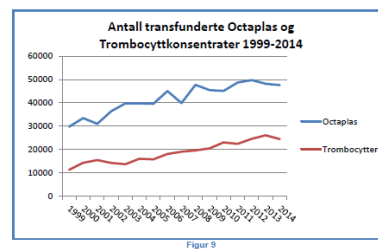
Jeg vil prate om:

- Septiske transfusjonsreaksjoner
- Forbyggende tiltak
- Status i Norge
- Hvordan gjør man det ved UNN (og hvorfor)

Kliniske aspekter av problemet

- Bakteriekontaminering av platekonsentrater er økende problem i vestlig verden
- Økende bruk av platekonsentrater ved bruk av mer intensiv behandling (kreft, transplantasjoner, kompliserte kirurgiske inngrep, traume)
- Forekomst av kontaminering er fallende
- Forekomst av septiske transfusjonsreaksjoner er vanskelig å følge opp: mange pasienter får antibiotikabehandling på grunn av infeksjoner på transfusjonstidspunkt (*OBS antibiotika resistens vil gjøre vanskelig å behandle septiske reaksjoner!*)
- Dødsfall ved septiske transfusjonsreaksjoner er fortsatt nest hyppigst av alle transfusjonsrelaterte dødsfall i de fleste hemovigilans systemer

Økende platekonsentrat-forbruk



Kan nyere tillagingsmetoder hjelpe? PAS vs plasma

- Avhengig av bakterietype
- Fleste er ikke påvirket
- I plasma vil noen lage biofilm (plasmaproteiner) som holder dem i posen «limet» til plast når vi tar prøve

I forhold til andre reaksjoner - er dette et stort problem?

- Andre infeksjoner:
 - I USA:
 - HIV 1/1 000 000
 - HBV 1/205 000
 - HCV 1/2 000 000
 - I Norge betydelig lavere (a-HBc)
 - Mange EU-land har innført NAT (HBV!)
- TRALI
- Feil transfusjoner!

Forekomst kontaminering

- Store forskjeller i definisjoner: 1/1000 til 1/20000
- I Norge i 2010 ble kontaminering påvist i 0,12 % for BC-konsentrater og 0,06 % i aferesekonsentrater (vet ikke hvordan definert), men i 2011 var det samme 0,18 for begge typer
- Ikke alle er av klinisk betydning!

Forekomst transfusjonsreaksjoner

- 1/50 000 – 1/100 000
- SHOT (UK): 1/75 000 fra 2000- 2009 (40 reaksjoner). Ingen rapporterte reaksjoner på 5 år etter innført testing av alle konsentrater, men i 2015 rapport om en bekreftet og en mulig septisk reaksjon.
- Frankrike: 1/59 000
- ARC blood centres (USA): 1/59 000 etter innføring av screening (2004) og 1/83 000 etter at prøvevolum for dyrkning ble økt til 8 mL

W.G. Murphy, P. Coakley/Transfusion and Apheresis Science 45 (2011) 69–74

Forekomst av dødsfall

- SHOT (UK): 1/273 000
- USA: ca 1/500 000

Bakterier involverte i septiske reaksjoner

Table 1
An overview of bacterial species commonly implicated in bacteraemia and/or contaminated blood products and references for further reading.

	References
Gram positive	
Coagulase-negative staphylococci	[2,4,5,11–18]
<i>S. aureus</i>	[4,11,12,16–19]
<i>Streptococcus</i> spp.	[11,13,19–21]
<i>Viridans streptococci</i>	[11,13,20,21]
Gram negative	
<i>Serratia</i> spp.	[2,4,11–13,17]
<i>Pseudomonas</i> spp.	[2,13,18]
<i>Acinetobacter</i> spp.	[13,22,23]
<i>Yersinia</i> spp.	[2,4,12,13,24]
<i>Enterobacter</i> spp.	[13]
<i>Pseudomonas</i> spp.	[11,12,21,22,25]
<i>E. coli</i>	[2,13,18]

S.S. Klausen et al./Transfusion and Apheresis Science ■■■ (2014) ■■■–■■■

Status i Norge

(veldig fin oversikt av forebyggende tiltak, men ikke noe om testing)

Review

Bacterial contamination of blood components: Norwegian strategies in identifying donors with higher risk of inducing septic transfusion reactions in recipients

Sofie Strand Klausen^{a,b}, Tor Hervig^{a,b,c}, Jerard Seghatchian^a, Håkon Reikvam^{b,d}

^a Department of Transfusion Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway
^b Institute of Clinical Science, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Bergen, Bergen, Norway
^c International consultancy in Blood Components Quality/Quality and DCF Strategy, London, UK
^d Department of Medicine, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway

S.S. Klausen et al./Transfusion and Apheresis Science ■■■ (2014) ■■■–■■■

Status i Norge

- Fra 2004-2010 en sikker septisk reaksjon og 7 mulige reaksjoner
- Dette betyr 1/25 000 eller 1/150 000

Tiltak som forebygger kontaminering

- Tapping (utvelgelse av blodgivere, desinfeksjon av stikksted, første volum går i egen prøvetakingspose)
- Komponentframstilling og lagring (lukkede system, alle hygiene regler, temperaturovervåking)
- Lagring:
 - Temperatur
 - 4-7 dager
- Patogen inaktivering (problem med sporer *Bacillus cereus*)

Tester for bakteriekontaminering

1. **Dyrkning:**
 1. **Bact/ALERT (pH)**
 2. **BACTEC (BD Diagnostic systems) pH**
 3. **e-BDS (Pall) CO2 produksjon**
2. «Point og release» tester:
 1. Pan Genera Detection PGD (Verax)
 2. BacTx (Immunetix)
3. PCR Bakteriell DNA eller andre sensitivitet >10 CFU/mL
4. Flowcytometri

Pan Genera Detection (PGD)

- Immunopresipitering
- Påviser noen felles antigener (Lipoteisk syrer på Gram-positive bakterier og lipopolysakarider on Gram-negative bakterier)
- Tid < 3 min
- 500 µL
- Visuell avlesning etter ca 20 min
- Fordeler:
 - Fort
 - Point of release
 - enkelt
- Ulemper:
 - sensitivitet for noen G neg bakt er >10⁶5 CFU/mL
 - Manuell prosedyre (obs hasteutleveringer!)



BacTx

- Kolorimetrisk test
- Peptidoglycaner finnes både på G+ og G- bakterier
- 0,5-1 mL
- Fordeler:
 - Fort
 - Point of release
 - Enkelt
 - Delvis automatisert
 - 6.3×10^2 to 7.6×10^4 (CFUs)/mL
- Ulemper:
 - Begrenset erfaring
 - Ikke integrert i vanlige datasystemer



PCR

- Real-time PCR
- Bakteriell 16S ribosomal DNA
- Relativt lav sensitivitet
- Egnert for testing først etter minst 24 timer etter produksjon
- Kan automatiseres

Optimal sampling time of PCs for bacterial screening with real-time PCR T. Mohammadi et al.
Vir Sauguis (2005) 89, 208-214

PCR

- Brukes også 23s rDNA
- Problem med alle PCR-tester er kontaminering av reagenser med bakteriell DNA (polymeraser produseres av bakterier)

Flowcytometri

- Testprinsipp:
 - Bactiflow sensitivitet 300-500 CFU/mL
 - Bakterielle DNA farges med thiazol-lav sensitivitet (ca 10e4 CFU/mL)
- Fort
- Brukes for å forlenge holdbarhet
- Sensitivitet 300 CFU/mL

Nye tester utvikles hele tiden

A novel approach for rapid detection of bacterially contaminated platelet concentrates via sensitive measurement of microbial DNA polymerase activity

Daniel B. Zentgraf/ Michel M. Riccardella/ John M. Pinner/ Roberto Innocenzi/ Sara J. Kopytsky/ and S. Mark O'Brien

TRANSFUSION 2016;56:1612-1621.

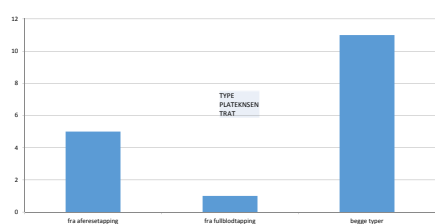
Status i Norge

- Undersøkelse gjennomført på vegne av Transfusjonstjenstens kvalitetsråd i 2015
- Spørreundersøkelse besvart av 23 instanser (i første omgang – data er uansett ikke oppdatert)
- Dessverre har jeg ikke oversikt over det hvor mange blodbanken dette gjelder – antar at det var ca 30 (kanskje over 50 % av blodbankene)

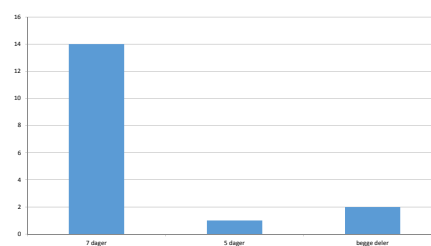
Av de som har svart:

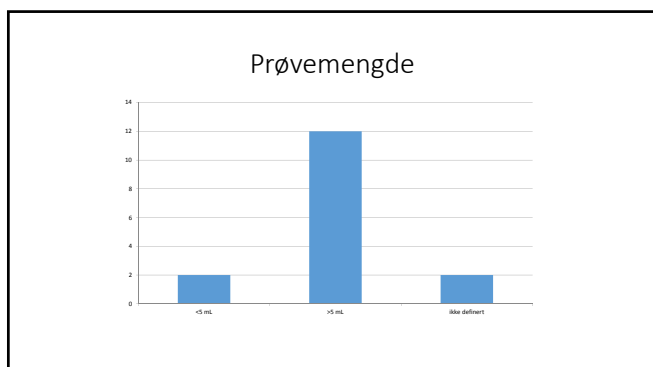
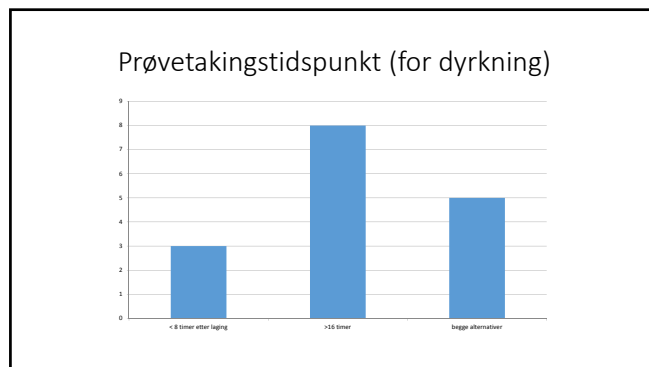
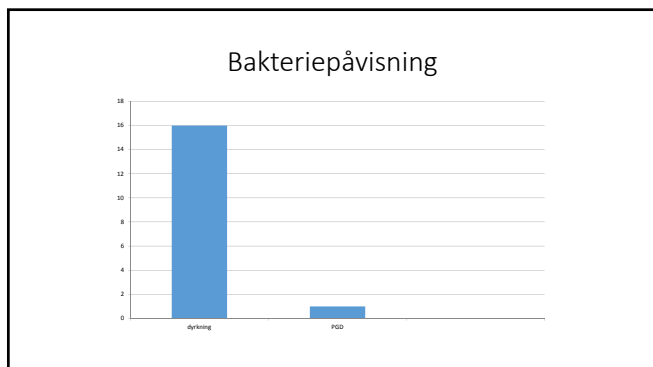
- 6 lager ikke platekonsentrater
- Videre viser jeg svar fra de 17 som lager platekonsentrater

Type platekonsentrat



Holdbarhet





I tillegg...

- Alle har krav om negativ svar ved utlevering
- Bare en blodbank dyrker anaerob
- Flere definerer prøvetaking i forhold til tapping og ikke komponentframstilling

«Alle» bruker BacT/ALERT – «Alle» velger å bruke testen på egen måte

- Vi er pålagt å bruke tester ved bruk utover 5 dager og i Norge gjør alle som produserer konsentrater dette
- Etter min mening må følgende defineres:
 - Skal det tas obligatorisk inntil 5 dager?
 - Hvilke tester kan brukes?
 - Tas av hver konsentrat etter splitting
 - Ved bruk av dyrkning:
 - Definert tidspunkt for prøvetaking
 - Prøvemengde
 - Hvor lenge tar det før resultat blir valid
 - Hva betyr neg to date? Timer?
 - Når skal andre varsles ved salg av konsentrater?

Hvordan gjøres det ved UNN

- Dyrkning av alle konsentrater
- Bact/ALERT
- Prøve tas etter > 18 timer etter produksjon (ikke tapping!)
- Prøvemengde 8 mL
- Frigivning av produkter etter ca 24 timer (mellom 12 og 24 timer bare etter vurdering av blodbanklege)
- Holdbarhet: 7 dager

Synes jeg at vi har eliminert risiko?

NEI!

Improving the performance of culture-based bacterial screening by increasing the sample volume from 4 mL to 8 mL in aerobic culture bottles

Stephanie Souza, Marjorie Brasso, Terri Poulin, Sandra Vanderpool, Hany Kamel, Peter Tomasulo, and Leon L. Si

TRANSFUSION 2011;52:1476-1482.

Studie-design

- Afersekonsentrater tappet på:
 - Trima, Spectra (Gambro)
 - Amicus (Fenwal)
 - MCS+ (Haemonetics)
- Bakterietesting: Bact/ALERT 3D (bioMerieux)
- Prøvetaking tidspunkt: 24-36 timer etter aferese
- Aerobkultur-flasker
- To «grupper»:
 - 4 mL prøvevolum (2003-2008)
 - 8 mL prøvevolum (2008-2011)

Studie-design

- Etter inkubering på 18-24 timer:
 - Negative: konsentrater satt i bruk, flaske fortsatt i inkubator
 - Positive sendt til mikrobiologisk undersøkelse (gram-farging, kultur med identifisering) – både flasker og konsentrater
- Resultater fordelt i flere grupper:
 - TP – samme bakterie i flaske og konsentrat/pasientprøve (blodkultur med septisk reaksjon)
 - DN – discordant negative eller falsk positive: vekst i flaske men ikke i konsentratet
 - Discordant positive: vekst av forskjellige organismer falsk positive
 - FP – falsk positive (instrumentfeil) Ingen vekst
 - IND – indeterminate: vekst fra flaske, men konsentrat ikke tilgjengelig

Resultater

BSI classification	September 1, 2003–November 23, 2006 4-mL aliquot (n = 283,114)		November 24, 2006–May 2, 2011 8-mL aliquot (n = 190,263)		8 mL vs. 4 mL OR (95% CI)
	Number	Rate per million	Number	Rate per million	
TP	30	106.0	25	130.7	1.31 (0.77-2.23)
DN	195	690.8	59	307.0	0.48 (0.35-0.64)
DP	2	7.1	0	0.0	NA
IND	36	127.2	8	44.4	0.36 (0.16-0.75)
FP	52	183.7	54	299.6	1.62 (1.11-2.39)

DP = discordant positive.

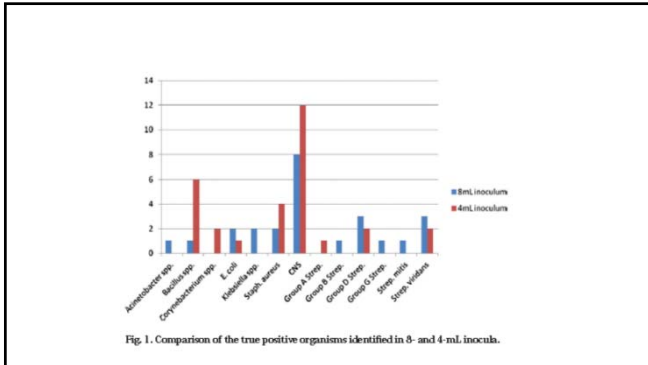


Fig. 1. Comparison of the true positive organisms identified in 8- and 4-ml inocula.

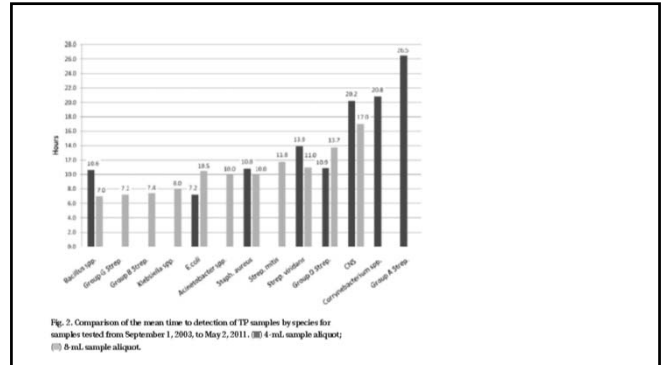


Fig. 2. Comparison of the mean time to detection of TP samples by species for samples tested from September 1, 2003, to May 2, 2011. (□) 4-ml sample aliquot; (■) 8-ml sample aliquot.

Bacterial contamination in platelets: incremental improvements drive down but do not eliminate risk

Craig Jenkins, Sandra Ramirez-Arcos, Mindy Goldman, and Dana V. Devine

TRANSFUSION 2011;51:2556-2565.

TABLE 6. Bacterial testing results for 35 months before and after implementation of sample volume increase from 4 to 6 mL to 8 to 10 mL (February 2007) for apheresis PLT concentrates

Criteria	Mar 2004-Jan 2007 (before implementation)		Feb 2007-Dec 2009 (after implementation)		p value
	Number	Rate per 10,000	Number	Rate per 10,000	
Total number screened	78,957		104,192		
Initial positives (% of total tested)	79 (0.10)	10.06	178 (0.17)	17.08	<0.001*
Confirmed positives (% of initial positives)	5 (6.33)	0.64	17 (9.55)	1.63	0.204
False positives due to contamination (% of total tested)	29 (0.04)	3.69	50 (0.05)	4.80	0.280
False positives due to instrument error (% of total tested)	50 (0.06)	6.36	128 (0.12)	12.29	<0.001*

* Values are considered significantly different at p < 0.05.
† p value was calculated based on rate per 10,000 components.

TABLE 3. Association between indeterminate cases and ATRs

ATC type	Indeterminate	Transfused	Not transfused	Information unavailable	Reported ATRs†
APC	55	19	13	25	N
BC-PC	16	7	5	4	N
PRP/PC*	29	16	1	7	N

* Labeled as "transfused" if at least one PLT from a PRP pool containing an indeterminate bacterial testing result was transfused.

Dyrkning

- Matematisk beregning
 - 0,15 CFU / mL
 - Prøve på 4 mL gir 60 % sjanse at vi har fått en bakterie inn
 - 8 mL øker sjanser til nær 90 %
- Alle bakterier som vokser sakte (sporer!) er vanskelig å påvise fort nok

Mulige strategier – veldig nyttig oversikt:

Diagnostic Methods for Platelet Bacteria Screening: Current Status and Developments

Melanie Störmer^a Tanja Vollmer^b

^aInstitut für Transfusionsmedizin, Blutspendezentrale, Universitätsklinikum Köln,
^bInstitut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Germany

Transfus Med Hemother 2014;41:19-27

Vei videre for oss?

- Innføre nye tester i tillegg?
- Forkorte holdbarhet?
- Patogenreduksjon?