

## 輸血血液製造業務における血小板製剤の細菌培養検査4年間の経験

ルド・ムレ

ベルギー（フランダース）赤十字血液サービス

ヘモビジランスが導入されているフランスや英国からのヘモビジランス初期の報告では、細菌汚染した血小板製剤による罹病や死亡は明らかに重大である。それゆえに細菌汚染血小板輸血とそれによる罹病を防ぐために、1998年11月から、血小板製剤全てについて、自動化装置による細菌スクリーニングを開始した。

統一した血小板製造、サンプリング、検査法を国内の血液センターに導入した。プール血小板は5～6人のバッフィコートに由来する。血小板の製造（すなわち、シングル血小板は採取直後に、バッフィコート由来血小板は採血約22時間後に調整）をして、15～20mlの血小板液を付属バッグか、無菌接続装置を用いて繋いだ別のバッグに移す。このバッグからサンプルを約7mlずつ好気性菌培養ボトルと

嫌気性菌培養ボトルに注入する。次にBacT/Alert 微生物検出システム (BacT/Alert240、ピオメリュー、フランス) を用いて連続的に5日間モニターする。

血小板製剤には出庫を控える検疫期間は設定していない。一旦培養が始まってしまえば、いつでも出庫される。しかし、病院施設に出庫される時点では全て培養陰性でなければならない。陰性の培養は血小板製剤の有効期限である5日間までフォローアップされる。培養が陽性になれば、その培養ボトルと血小板製剤が可能ならばそれも独立した検査ラボに送られて、確認検査がされる。まだ、血小板製剤が残っていれば、出庫は止められて、廃棄される。あるいは病院に連絡して返品してもらう。血小板が既に患者に投与されていれば、担当医に知らせて、有害

事象があれば、それを報告してもらう。  
グラム陰性菌が同定されれば、同じドナーからの赤血球製剤は在庫停止、返却される。

4年間で、血小板製剤 107,827 本を検査して、0.96%がスクリーニング培養陽性となった。偽陽性(BacT/Alert で陽性シグナル、培養陰性)は 4 年間平均 0.16%であったが、1999 年(検査の 0.33%)はソフトウェアに難があったせいで特に高かった。これらの問題が解決されて以降は徐々に低下して、2002 年は 0.05%となった。細菌混入の 59.9%は試験 24 時間以内に、74.5%は 48 時間以内に検出された。検出時間は菌種に大いに影響される。好気性菌の大部分(83.9%)は 48 時間以内に、67.9%は 24 時間以内に検出された。しかし、嫌気性菌と緩徐に増殖する好気性菌(Corynebacterium など)の大部分(74.5%)は、2-4 日しないと、検出できなかった。4年間でグラム陰性菌は 6 回同定された。全体で、52.4%の細菌スクリーニング陽性血小板製剤はセンターで供給スト

ップ、返品された。返却された血小板は検体を再度採取して 75.6%に陽性が確認された。知る限りでは、輸血後に BacT/Alert 陽性シグナルを示した血小板製剤の輸血による有害事象報告は受け取っていない。さらに 2 本で偽陰性事象(血小板輸血で輸血反応出現)が確認された。その 2 例では、同一の菌種が患者と血小板製剤に同定されたが、スクリーニング試験は陰性だった。1 例では血小板バッグの欠陥があった。

結論を言えば、細菌混入スクリーニングは血小板製剤に由来する敗血症を予防するのに有効な戦略である。細菌が混入した製剤が臨床症状を呈するレベルに増加する前に排除されるからである。細菌混入血小板製剤の率を低下させるために、主バッグに採血する際、初期 20ml を排除する方法の導入を検討している。ベルギーにおいて、血小板製剤の有効期限は法律で 5 日間に限定されている。しかしながら、菌種株によっては、長い培養時間(>96 時間)を経て、ようやく陽性になる

ので、細菌培養試験なしで有効期限延長を図るのは正しくない。今年発布された欧州委員会指導には血小板製剤の有効期限を5日から7日に延長する場合のオプションが含まれ、細菌混入の検出手段あるいは減少手段が講じられた場合に許される。血小板製剤有効期限を延長すると、おそらく輸血までの平均保存期間も増加するであろう。保存時間は血小板の数的、質的影響をもたらす。それゆえに、保存時間が長くなれば、供給される血小板製剤の質に影響を及ぼす問題も発生する。

## BACTERIAL SCREENING OF PLATELET CONCENTRATES

### FOUR YEARS OF EXPERIENCE



### Bacteria in blood components (prospective studies)

PREVALENCE	BLOOD COMPONENTS		
	APH PLC	WB-PLC	RBC
Bacterial contamination *	1:2,000	1:3,000	1:40,000
Transfusion associated septic reactions **	1:31,000	1:14,000	1:170,000
Transfusion associated fatal septic reactions **	1:140,000	0 ***	1:720,000

\* Hillier 2001

\*\* Perez 2001

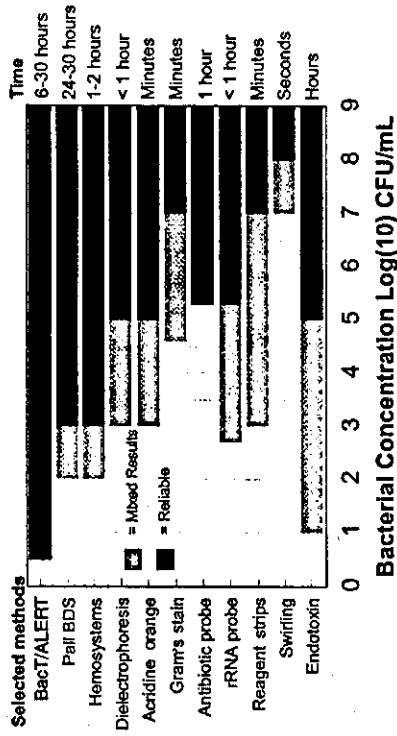
\*\*\* few number of WB-PLC

### Bacterial contamination: sources

- donor bacteraemia
- skin contaminants on the donor's arm
- contamination of pack and/or contents

### Possible explanations for apparent infrequency of clinical events

- Non-pathogenic bacteria
- Insufficient numbers of bacteria to cause symptoms
- Patients premedicated with steroids/antipyretics, which mask the typical signs of a reaction
- Patients already taking antibiotics effective against the contaminating bacteria
- Patients are immunosuppressed and expected to have infections (episodes and underinvestigated/reported)



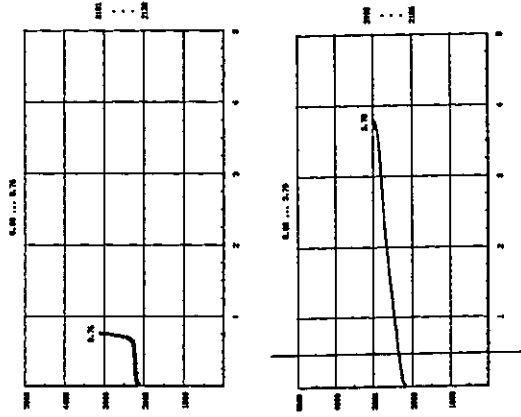
M.E. Brechtner, 2003

## BACTERIAL CONTAMINATION TESTING

### MATERIALS AND METHODS

- all platelet concentrates (SD and pooled PLC, all leukocyte depleted)
- uniform method in all blood centers (BS RC-FL)
- standard screening, aerobic and anaerobic, 5 days
- automated culture system (Bact/Alert 240)
- samples :
  - volume : 5 ml
  - taken from sample bag (integrated or docked)
  - taken immediately after preparation of PLC
- ( ↓ pooled PLC; overnight storage of WB)

DVB - RC - FL - 240 - 9 - 2003



DVB - RC - FL - 240 - 9 - 2003

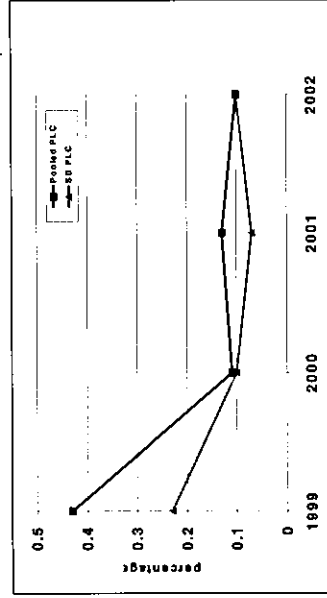


## BACTERIAL CONTAMINATION TESTING

### MATERIALS AND METHODS

- Confirmation of a screening positive result:
  - vial → independent reference lab (identification)
  - if PLC available : new sample for culture
- Issue of PLC for transfusion requires a negative culture (negative to date)
- Action when testing becomes positive :
  - blocking in-house PLC
  - recalling issued PLC
  - notifying prescribing physician if PLC transfused
  - recalling red cells if gram-negative bacteria are identified

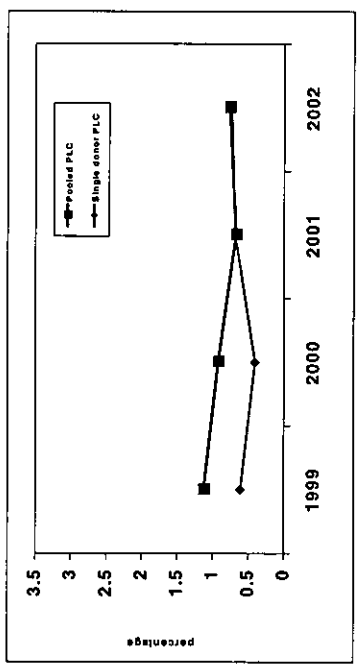
## BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999 – 2002 : % false positive PLC



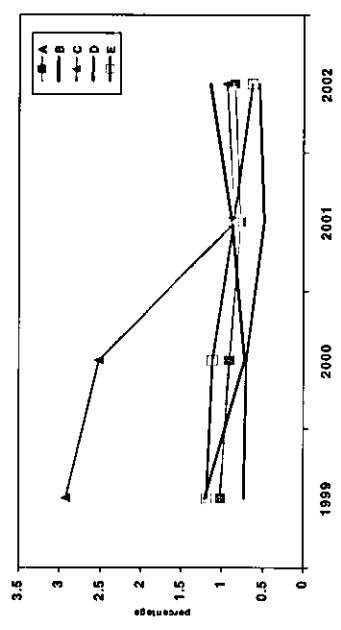
## BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999-2002

	Number tested	Screening positive	False Positive	Confirmed Positive
Pooled PLC	75,829	793	140	622
percentage		1.05 %	0.18 %	0.78 %
Single-donor PLC	31,998	237	41	181
percentage		0.74 %	0.17 %	0.76 %
Total	107,827	1,030	181	803
percentage		0.96 %	0.18 %	0.78 %

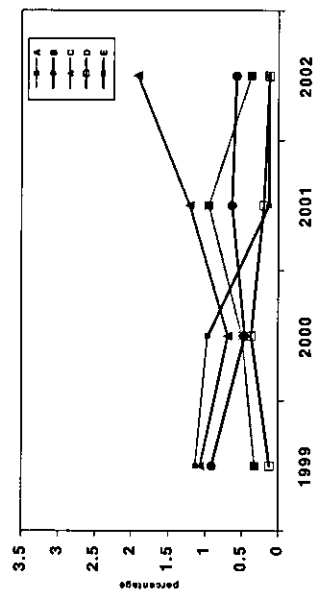
**BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999 – 2002 :  
% confirmed positive PLC**



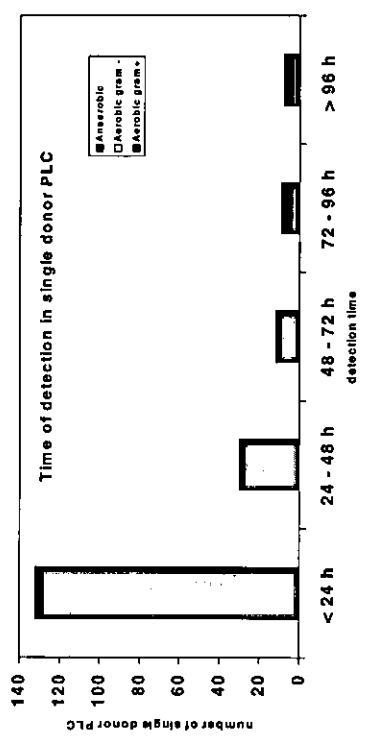
**BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999 – 2002 :  
% confirmed positive pooled PLC per blood center**



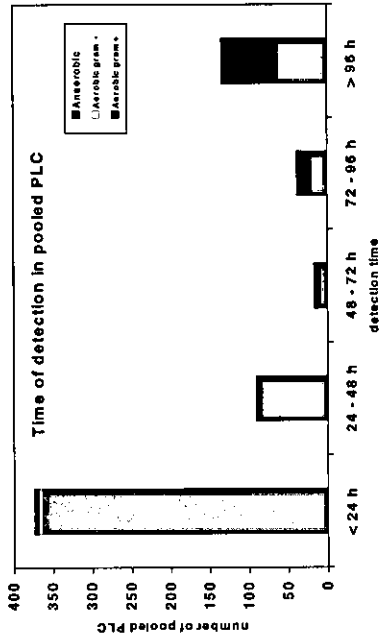
**BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999 – 2002 :  
% confirmed positive single donor PLC per blood center**



**TIME TO DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION  
IN PLC 1999 – 2002**



### TIME TO DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION IN PLC 1999-2002



### Time to detection of bacterial contamination in single donor PLC

name	<24h	24h-48h	48h-72h	72h-96h	>96h	Total
<b>Anaerobic</b>						
Propionibacterium	4	0	2	5	5	16
Aerobic rods	0	1	0	0	0	1
Subtotal	4	1	2	5	5	17
<b>Aerobic gram neg</b>						
Gram negative rods	0	0	0	0	1	1
Subtotal	0	0	0	0	1	1
<b>Aerobic gram pos</b>						
Escherichia spirochetes	12	5	3	1	0	21
Corynebacterium	0	4	1	1	2	8
Micrococci	1	0	0	0	0	1
Staphylococcus aureus	5	0	0	0	0	5
Staphylococcus coagulase neg	53	20	6	2	0	121
Streptococcus	7	0	0	0	0	7
Subtotal	118	29	10	4	2	163
<b>Total</b>	122	30	12	9	8	181

### Time to detection of bacterial contamination in pooled PLC

	<24 h	24-48 h	48-72 h	72-96 h	>96 h	Total
<b>Anaerobic</b>						
anaerobic gr. coccus	0	2	3	3	7	15
Propionibacterium	6	4	1	13	46	70
Peptostreptococcus	0	1	3	2	8	14
Clostridium	1	0	0	0	0	1
Subtotal	7	7	7	18	61	100
<b>Aerobic gram neg</b>						
gram - rods	1	0	1	0	0	2
Acinetobacter	0	0	0	0	1	1
Serratia	2	0	0	0	0	2
Subtotal	3	0	1	0	1	5
<b>Aerobic gram pos</b>						
Bacillus	52	16	2	3	7	80
Staphylococcus aureus	4	0	0	0	0	4
Staphylococcus CNS	276	60	4	10	17	367
Streptococcus	8	0	0	0	0	8
Corynebacterium	0	6	2	7	36	51
Micrococci	0	0	1	1	3	5
Subtotal	342	82	9	21	63	517
<b>Total</b>	352	89	17	39	125	622

### BACTERIAL SCREENING OF PLC 5 days after collection

	Aerobic gram +	Aerobic gram -	Anaerobic
<b>Pooled PLC</b>	404	4	38
percentage	91.5 %	0.8 %	7.7 %
<b>Single-donor PLC</b>	163	1	17
percentage	90.1 %	0.5 %	8.9 %
<b>Total</b>	617	5	55
percentage	91.10 %	0.70 %	8.10 %



BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999 – 2002

	Confirmed positive	Transfused	Recalled
Pooled PLC	622	285	337
	percentage	45.8%	54.2%
Single-donor PLC	181	85	109
	percentage	39.8%	60.2%
Total	803	357	446
	percentage	44.50%	55.50%

BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999 – 2002

	Recalled Rtested	Recalled Confirmed Pos
Pooled PLC	337	235
	percentage	69.7%
Single-donor PLC	109	79
	percentage	74.5%
Total	446	314
	percentage	70.4%

BACTERIA IDENTIFIED IN RECALLED AND RETESTED PLC

Name	Retested negative (n)	Retested positive (n)	Total (n)
Anaerobic			
anaerobic D+ toccus	4	1	5
Propionibacterium	4	6	10
Peptostreptococcus	4	2	6
Clostridium	1	0	1
Subtotal	13	9	22
	(59.3%)	(28.8%)	
Aerobic gram neg			
gram - rods	1	0	1
Serratia	1	1	2
Subtotal	2	1	3
	(15.3%)	(31.3%)	
Aerobic gram pos			
Bacillus	27	35	62
Staphylococcus aureus	1	5	6
Staphylococcus CNS	79	256	335
Streptococcus	3	3	6
Corynebacterium	6	6	12
Subtotal	116	305	421
	(89.5%)	(96.8%)	
Total	131	315	446

CLINICAL SIGNIFICANCE OF BACTERIA IDENTIFIED IN RETESTED PLC

Bacteria	Bacterial contamination Present study 1999-2002 n = 319 frequency: 1:200	Transfusion associated septic reactions Hemovillea France 1995-2002 n = frequency: 1:17,000	SHOT UK 1998-2003 n = 25 Frequency:
Anaerobic			
Peptostreptococcus	0.6%	7%	-
Anaerobic not listed	2.2%	-	-
Aerobic gram neg			
E coli	0%	9%	12%**
Gram neg not listed	0.3%	1%	8%*
Aerobic gram pos			
Staphylococcus CNS	81.5%	37%	40%**
Staphylococcus aureus	1.8%	11%	12%**
Bacillus	11%	11%	18%**
Corynebacterium	1.8%	3%	-
Streptococcus	0.9%	7%	12%**
Gram pos not listed	-	7%	-
Bacteria not listed	-	18%	-

\* Fatal case

## FOLLOW UP OF PATIENTS TRANSFUSED WITH PLC THAT BECAME POSITIVE LATER ON

PLC Transfused 357  
 Reports received 203  
 Transfusion reactions reported 12

Rash: 2  
 Shivering: 1  
 Fever: 6 (hemoculture: 2x different species)  
 Sepsis: 2 (hemoculture: 1x negative; 1x different species)  
 Blood pressure drop: 1

## BACTERIAL SCREENING: FALSE NEGATIVE RESULTS

- Pooled PLC:**
  - Initial culture: negative
  - Inspection of storage bag on day 2: PLC liquid on the outside
  - second culture taken on day 2: positive after 14 hours (staphylococcus epidermidis identified)
- Pooled PLC:**
  - Initial culture: negative
  - septic transfusion reaction
  - hemocultures of patient and PLC: positive: Bacillus cereus
  - Inspection of storage bag: small defect

## BACTERIAL SCREENING

when to sample

## UK SHOT: TRANSFUSION-ASSOCIATED SEPTIC REACTIONS BY SPECIES, COMPONENT TYPE AND AGE

	Platelets					All	Red cells
	Age (in days) at use						
All species	1	2	3	4	5	NK	4
Enterobacter aerogenes	0	2	3	6	10	4	25
Escherichia coli	1*						1
Escherichia coli	1*						3
Morganella morganii							1
Serratia lipifaciens							1
Yersinia enterocolitica							1* (32 days)
Staphylococcus epidermidis	1*		2	6		9	1 (32 days)
Coagulase negative Staphylococci					1	1	1 (23 days)
Staphylococcus aureus				2	1*	3	
Bacillus cereus				3*		1	4
Group B Streptococcus			1	1		1	3

\* Infection was incubated in the serum of a recipient

www.shotuk.org

## OVERVIEW OF BACTERIAL SCREENING IN EUROPE (2003)

Country	Percentage	Year	Method
Belgium (Flanders)	100 %	1998	Bact/Alert
Netherlands	100 %	2001	Bact/Alert
Wales	100 %	2003	Bact/Alert
Northern Ireland	75 %	2000	Bact/Alert
Sweden	60 %	1998	Bact/Alert
Denmark	60 %	1998	Bact/Alert
Norway	60 %	1998	Bact/Alert
Scotland	10 %	2000	Bact/Alert
Germany	limited		Bact/Alert / Pall BDS
Republic of Ireland	limited		Bact/Alert / Pall BDS

Petersz 1999

2003-04-01 13:00:00

## EUROPEAN UNION COMMISSION DIRECTIVE 2004/33/EC (March 22, 2004)

Maximum storage time of platelet concentrates:

“5 days; may be stored for 7 days in conjunction with detection or reduction of bacterial contamination.”

## INITIAL ALIQUOT DIVERSION: EFFECT ON BACTERIAL CONTAMINATION RATE OF BLOOD COMPONENTS

Study	Volume of Diversion	Time from Phlebotomy to Culture	Positive Cultures/Total Cultures %	
			Without Diversion	With Diversion
de Korte et al	10 mL	2-14 hours	63/18,257 (0.35 %)	157,087 (0.21 %)
Boe et al	20 mL	Not stated	42/4,064 (1.03 %)	7/1,447 (0.48 %)
Schneider et al	42 mL	> 5 days	14/602 (2.32 %)	4/409 (0.98 %)

Goldman 2003

2003-04-01 13:00:00

## BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999-2002

### SUMMARY

- PLC - screening positive : 0.96 %; really positive : 0.52 %
- 59.9 % of all bacteria and 83.9 % of aerobic bacteria detected within 24 h
- Sampling 2 h after PLC preparation allows early detection of bacteria
- Bacterial contamination : SD-PLC = pooled PLC (effect of timing of leukocyte depletion)
- Detection of aerobic bacteria increases after 4 days of storage (1 extension of storage period of PLC)
- Transfusion associated septic reactions prevented (1 exception)

2003-04-01 13:00:00

## **BACTERIAL SCREENING OF PLC 1999-2002**

---

This is a joint study.

I particularly would like to mention :

**M. Baeten - G. Mertens  
J. Coene  
H. Claeys - F. Logghe  
L. Steenssens  
B. Vandekerckhove - I. Van Haute**

### **CONCLUSION :**

- Bacterial screening is an effective strategy to prevent septic transfusions reactions
- Allows extension of storage time of PLC to 7 days
- Effect of timing of leukocyte depletion
- Indirect quality control of preparation of venipuncture site