

だが、細菌芽胞、エンドトキシン、エンベロプを有さないウイルスの一部、プリオン蛋白には無効である。加えて、不活化処理した血小板輸血では血小板回収率、血小板寿命、血小板回収率が低下する事実がある。さらに不活化処理した場合、輸血患者、血液センター職員、環境に毒性をもたらす危険性がある。必要なコストも細菌培養検査と比較して遥かに大きくなるであろう。

結論を言うと、細菌混入スクリーニング検査は血小板輸血関連敗血症予防に有効な手段である。この細菌スクリーニングと初流血 Diversion を併用することで、血小板の細菌混入を減少させる。しかし、細菌培養法を導入すれば、検査に要する時間が必要となるので、有効期限を延長させる必要性がでてくる。

国ごとに異なる感染症リスクを正しく評価したうえで、その国にあった適切な輸血感染症リスクを減じる手段を採用するべきである。

今回、Wagner 博士を外国人研究者として招へいして得られた成果は、血小板製剤有効期限延長にあたって、細菌混入対策を根源的に実施し、さらに大規模な市場後調査を課した米国の血小板輸血実情が明らかにされたことである。血小板製剤全数検査により、真の細菌混入率が明らかになるであろう。加えて、細菌混入スクリーニング検査を実施するには血小板製剤有効期限が必要であることも判明した。

日本でも血小板製剤の有効期限延長は高齢社会に突入していることもあって、避けて通れない差し迫った問題である。血小板製剤の有効期限延長に関する政策決定に当たり、示唆に富む情報を得た。すなわち初流血 Diversion による細菌混入それ自体を減少させる方策と、BacT/ALERT 装置のような微生物検出装置の導入による万一、細菌が混入してもそれを検出できるシステムの両方法により、安全性を現在の製剤よりも向上させた血小板製剤の供給も可能とする途が開けてきた。

しかし、病原体不活化技術については血小板製剤の有効性を減弱させるだけでなく、核酸を傷害するという本質的なテクノロジーのゆえに、受血患者と血液関連職員、環境に未知のダメージをもたらす危険性を内包している。

8. 外国人研究者のレポートは別添のとおりである。

Detection and prevention of bacterial contamination in platelet components

A series of lectures given to the Japanese transfusionists (1/26/06-2/6/06)

Presented by: Stephen J. Wagner, Ph.D. American Red Cross, Rockville, MD

In the United States, between 1 in 2000 and 1 in 5000 apheresis platelet units are contaminated with bacteria [1, 2]. Clinical signs of sepsis, such as fever, changes in blood pressure, and/or rigors, confirmed by culture of the same organisms from the blood bag and the recipient, are more infrequent than culture-positive units, with prevalence values ranging from one in 10 000–100 000 platelet units [3, 4]. Transfusion-associated sepsis is the most frequent cause of death from infectious agents, representing 17–22% of all reported fatalities, and only surpassed by fatalities from ABO errors [5]. Fatalities have been reported to occur in one in 50 000–500 000 platelet units [4, 6] and in one in 8,000,000 red cell units [7]. Septic deaths from red cells occur less frequently than those from platelets because refrigerated temperatures used in red cells storage inhibit bacterial growth.

Sources of bacterial contamination include the skin, blood, disposables, and the

environment. For donors who have developed scarring at the phlebotomy site, the skin may persistently harbor organisms, such as *Staphylococcus* spp., in a refuge unaffected by disinfectants. One frequent plateletpheresis donor was implicated in two septic episodes involving a coagulase-negative *Staphylococcus* that repeatedly contaminated units collected from a scarred and dimpled site of the donor's right antecubital fossa [8]. In contrast, when phlebotomy was on the left arm, the units were routinely culture negative. Coring of skin or the flushing of organisms from skin flaps into the primary blood container during phlebotomy has long been recognized as a source of contamination [9, 10]. Several studies have investigated the potential for diversion of the first 10–40 ml of whole blood to prevent skin plugs or flushing of organisms from skin flaps from entering the primary collection container [11-13]. *In vitro* studies suggest that this maneuver may

remove 95–98% of surface bacteria [11]. A prospective clinical study demonstrated that use of a 10-ml diversion of whole blood to a satellite pouch reduced overall bacterial contamination from 0.35 to 0.21% ($P = 0.05$) and, in particular, the skin organism, *Staph. epidermidis*, from 0.14 to 0.03 ($P < 0.02$) [12]. The prevalence of clinical sepsis has been demonstrated to be reduced 10-fold with the introduction of sample diversion [13]. Skin disinfection reduces bacterial load, but will not completely sterilize the phlebotomy site. In addition, some skin-disinfection methods may not be equivalent in efficacy. In two donor-based studies, 70% isopropyl alcohol followed by 2% tincture of iodine performed better than 0.75% povidone iodine followed by 1% povidone iodine [14, 15]. Moreover, the motion of disinfectant application (up and down was superior to spiral) had an impact on the extent of disinfection of surface organisms in one study [15].

Some units become contaminated because donors have asymptomatic or low-grade bacteraemia. For example, one plateletpheresis donor was linked to seven cases of *Salmonella*

choleraesuis sepsis, three of which were confirmed by positive cultures of the platelet unit. Two of the septic episodes were fatal. The donor unknowingly had a low-grade bacteraemia from *Salmonella* osteomyelitis of the tibia [16].

Other cases of sepsis arise from the contamination of disposables. Two well-recognized reports from Denmark and Sweden involved an outbreak of *Ser. marcescens* sepsis, which, when investigated, implicated a common lot of blood containers [17, 18]. A survey of 1515 blood containers in Denmark demonstrated the presence of the organism in 11 bags (0.73%). Subsequent investigation of the manufacturing plant identified contamination with an organism of the same ribotype as identified in the contaminated units.

The environment can also be a source of skin contamination. One unusual and fatal case of sepsis involved the anaerobe, *Clostridium perfringens*, which contaminated a platelet pool and was traced back to the skin of a young male donor [19]. The organism is a spore-forming anaerobe, commonly found in

soil and the human intestinal tract. Apparently the father carried his two infants in the crook of his arm; the authors speculated on the transference of fecal material from the baby's diaper to the donor's antecubital fossa.

Several methods have been investigated for detecting bacteria in platelet products prior to transfusion. Because bacteria grow in components during storage, the most sensitive methods are recommended if sampling is performed within 1 or 2 days of blood collection, while less sensitive methods may be acceptable if sampling is performed within a few hours prior to transfusion. In general, a method's sensitivity seems to be inversely related to the time required for bacterial detection. For example, rapid methods, such as pH and/or glucose dipsticks, can only detect $> 10^7$ colony-forming units (CFU)/ml bacteria yet require only seconds to perform, while culture methods, which can detect as little as 1 CFU/mL, require up to 2 days for results. Investigative techniques, using semi-automated fluorescent microscopy, or cytometry, can detect 10^2 – 10^4 CFU/ml of bacteria in platelet components within minutes

[20, 21]. A molecular biology method based on unamplified ribosomal RNA can detect $> 10^4$ CFU/ml bacteria in platelet components within 60–90 min [22]. Amplification of bacterial rRNA sequences has also been evaluated and can detect organisms, at approximately 10 CFU/ml levels, in platelet components [23].

Two automated culture methods, the BioMerieux BacT/ Alert system (Durham, NC) and the Pall bacterial detection system (Pall BDS; Pall Medical, East Hills, NY), have been studied for bacterial detection in platelet components and have been approved by the USA FDA for quality control use. Because of their sensitivity to detect at least 1–10 CFU/ml *in vitro*, culture methods have become popular in many countries, including the United States where 100% of apheresis platelets are tested by these methods. Bacterial detection in the BacT/Alert is based on the evolution of carbon dioxide by proliferating bacteria. Culture bottles containing aerobic or anaerobic growth media are aseptically inoculated by a manufacturer-recommended volume of platelets. As bacteria grow in the

culture bottle during incubation at 34–37 °C, carbon dioxide is released, causing a reduction in the culture medium's pH. A pH-sensitive disk at the bottom of the culture bottle changes color, which is detected by alteration of reflected light on the disk. Because initial bacterial loads in freshly collected blood are thought to be very low (< 10 CFU/ml, with some fractions < 1 CFU/ml), the manufacturer recommends that samples be inoculated into bottles after ≥ 1 day of platelet storage to allow for some bacterial growth in the platelet component. This ≥ 24 h delay in bottle inoculation ensures that the collected sample volume is more likely to contain organisms from a contaminated unit. Following inoculation, bottles are incubated in the BacT/Alert for at least 24 h; however, incubation can extend up to the time limit for platelet storage. Bottles are monitored continuously during incubation for color changes in the sensor disk, indicating the presence of proliferating bacteria [24-26].

Bacterial detection in the Pall eBDS system is based on the measurement of reduced oxygen levels in contaminated

platelet components caused by microbial oxygen consumption during proliferation. In a closed system, a small volume of the unit (4 mLs) is transferred to a pouch containing 2 tablets of bacterial growth medium and incubated with agitation at 35°C for 24 hours to allow for bacterial growth, ensuring that the sample volume from a contaminated unit is more likely to contain organisms. The air above the culture fluid is then sampled for a one-time analysis of oxygen level. Oxygen levels less than a manufacturer-specified cut-off value indicate the presence of proliferating bacteria [27].

Another approach for preventing transfusion-associated bacterial sepsis is the introduction of pathogen-reduction methods, which are currently under clinical investigation [28]. These methods endeavor to reduce the transfusion-transmission of bacteria, enveloped viruses, some non-enveloped viruses and a number of parasites. The method is not effective against bacterial spores, bacterial endotoxin, some non-enveloped viruses or prion protein. In addition, pathogen-reduction methods tend to reduce blood cell

yields, 24 hour platelet recovery, platelet lifespan, platelet corrected count increment and may potentially present a toxicity risk to recipients, blood bank personnel, or the environment. In contrast to the potential risks of implementing pathogen reduction methods, there is little risk in the introduction of a laboratory bacterial culture test. Implementation of pathogen reduction methods is also expected to cost many times more than bacterial detection methods.

Whether a country decides to implement pathogen reduction or bacterial culture, additional time for platelet storage may be required because each of these measures require time. For example, bacterial culture takes up to 2 days for sampling and incubation steps. With pathogen reduction, it is highly advisable to already have knowledge of the unit's infectious disease test results before treatment and photochemical removal steps. A 3 day storage period is therefore not compatible with either of these two safety measures. Fortunately, the storage properties and efficacy of platelets are maintained for periods longer than 3 days [29-33]. In the

United States, the FDA has recently allowed 7 day storage of apheresis platelets in approved bags provided that blood centers participate in a large post-market study to measure the test sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the BacT/Alert. The previous storage period for platelets in the United States (without bacterial culture) was 5 days.

Each country has different infectious disease risks, and many countries, including the United States, already have bacterial screening measures in place. Therefore, each country needs to analyze their current infectious disease risks, estimate what fraction of these risks may be caused by bacterial contamination, and balance the benefit of reducing these risks with the costs and low risks associated with introducing bacterial culture screening. Alternatively, pathogen reduction might be considered if a country is willing to expend significantly more money and is willing to accept a reduction in platelet survival, lifetime, and corrected count increment with an unknown risk to blood bank workers and transfusion recipients.

1. Fang et al, *Transfusion* 2005;**45**:1845-52.
2. Brecher et al *Transfusion* 2002;**42**:774-9.
3. Barrett et al, *Transfusion* 1993; **33**:228-3.
4. Kuehnert et al., *Transfusion* 2001;**41**: 1493-9.
5. Lee J: Review of Heidelberg Symposium and FDA fatality reports. Presented at the FDA/CBER Bacterial Contamination of Platelets Workshop, MD, Bethesda, United States Food and Drug Administration, September 1999 (<http://www.fda.gov/cber/minutes/bact092499.pdf>)
6. Ness et al. *Transfusion* 2001; **41**:857-61
7. Wagner et al., *Clin Microb Rev* 1994; **7**: 290-302.
8. Anderson et al, *Am J Med* 1986; **81**:405-11.
9. Gibson et al, *Lancet* 1958; **2**:983-5.
10. Kojima et al, *Vox Sang* 1998; **74** (Suppl. 1):Abstr. 1205.
11. Wagner et al, *Transfusion*, 2000; **40**:335-8.
12. de Korte et al. *Vox Sang* 2002;**83**:13-16.
13. Robillard et al, *Transfusion* 2005;**45S**: 25A.
14. Goldman et al, *Transfusion*;1997; **37**: 309-12.
15. McDonald et al, *Vox Sang* 2001;**80**:135-41.
16. Rhame et al, *Ann Intern Med* 1973;**78**:633-41.
17. Heltberg et al, *Transfusion* 1993; **33**:221-7.
18. Hogman et al, *Transfusion* 1993; **33**:189-91.
19. McDonald et al., *Transfus Med* 1998; **8**: 19-22.
20. Seaver et al, *Transfusion* 2001; **41**:1351-5.
21. Morel et al, *Transfusion* 2002;**42S**:40S (Abstr. SP37).
22. Kenny et al. *Transfusion* 2003; **43S**:48A (Abstr. SP17).
23. Petershofen et al, *Transfusion* 1999; **39S**: 116S (Abstr. S532-040J).
24. Wagner et al, *Transfusion* 1998; **38**:674-9.
25. Brecher et al, *Transfusion* 2001; **41**:477-82.
26. McDonald et al, *Vox Sang* 2001; **81**:154-60.
27. Fournier-Wirth et al, *Transfusion* 2006;**46**:220-4.
28. Wagner SJ: Pathogen reduction in cellular blood components; in Simon TL, Dzik WH, Snyder EL, Stowell CP, Strauss RG (eds):*Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. Lippincott Williams & Wilkens, Philadelphia, PA, 2002:806-14.
29. Dumont et al, *Transfusion*.2002;**42**:847-54.
30. Dumont et al, *Transfusion*, 2003;**43**:143-50.
31. Sweeny et al, *Transfusion*. 2004;**44**:1212-9.
32. Hogge et al, *Transfusion* 1986;**26**:131-5.
33. Dijkstra-Tiekstra et al, *Transfusion* 2004; **44**:330-6.

血小板製剤における細菌混入の検出と予防

日本の輸血関係者への輸血講演シリーズ（2006年1月27日～2月3日）

ステファン J ワーグナー博士、米国赤十字社、メリーランド州ロックビル市

血小板製剤への細菌混入頻度

米国では成分献血由来血小板製剤の2000本から5000本に1本の割合で細菌が混入している[1,2]。敗血症の臨床的症候、たとえば発熱、血圧の変動、悪寒があつて、同一の病原体が血液バッグと患者から検出され確定されるのはさらに少なく、血小板製剤10,000～100,000本に1本の割合である[3,4]。輸血敗血症は、感染性病原体による死亡の最大原因である。全死亡の17～22%を占め、ABO 誤輸血による死亡に次ぐ[5]。死亡は50,000～500,000血小板輸血に1回[4,6]、赤血球製剤は800万輸血に1回と報告されている[7]。赤血球による敗血症死亡が血小板よりも少ないのは、冷蔵保存が細菌増殖を抑制するからである。

細菌混入の原因と予防対策

細菌混入の原因には皮膚、血液、器材類、環境が挙げられる。採血部位に瘻痕があると、その部分は微生物（ブドウ球菌など）に消毒操作からの隠れ場所を与えてしまう。ある頻回血小板成分ドナーはコアグラージェ陰性ブドウ球菌による2回の敗血症に関与していた。そのドナーの右側前肘部の瘻痕窪部から採血するとブドウ球菌が何度も混入していた[8]。しかし、左腕から採血する

と、いつも培養陰性であつた。採血の際に切り取られた皮膚や皮膚組織からの微生物が血液バッグに入り込むことが、細菌混入の原因になること以前から認識されていた[9,10]。いくつかの研究は、全血の最初の10～40mlを排除することで、皮膚プラグや皮膚組織の微生物が血液バッグに進入するのを防ぐ可能性を検討している[11～13]。実験ではこの操作で表在菌の95～98%を排除できる可能性を示している[11]。予視的臨床研究では10mlの全血を付属小袋に転流することで全体の細菌混入率が0.35%から0.21% ($p=0.05$) に、特に皮膚常在菌の表皮ブドウ球菌は0.14%から0.03% ($p<0.02$) に減少する結果が得られている[12]。初流血を検査用として転流すると臨床的敗血症は10分の1に減少することが証明されている[13]。皮膚消毒は穿刺部位の菌量を減少させるが完全に滅菌はしない。加えて、いくつかの消毒法はその効果において、同等ではない。ドナーを対象とした二つの研究がある。70%イソプロピルアルコールとヨードチンキ法は0.75%と1%ポビドンヨード法よりも効果的である[14,15]。さらに、消毒綿棒の動き（上下動はらせん状に勝る）は表在微生物

の消毒程度に影響するという研究もある[15]。

ドナーが無症状であったり、低濃度の菌血症のために血液製剤に細菌混入する場合もある。たとえば、ある血小板ドナーは7例の *Salmonella choleraesuis* 敗血症に関与していた。3回は血小板製剤の培養陽性が確認された。敗血症症状を呈した2回は患者が死亡した。そのドナーは知らずに、脛骨のサルモネラ骨髄炎による低濃度菌血症であった[16]。

ディスプレイ製品による敗血症も発生する。*Serratia marcescens* 敗血症の発生に関するかなり知られた二つの論文がデンマークとスウェーデンから報告されている。両方とも同じロットの血液バッグが原因であった[17,18]。デンマークで1515の血液バッグを調査したところ、11バッグ(0.73%)に微生物が検出された。引き続いてバッグ製造工場の調査で細菌混入した血液製剤と同一のリボタイプの微生物が同定された。

周囲の環境も皮膚からの細菌混入の原因となりうる。プール血小板に混入した嫌気性菌 *Clostridium perfringens* による稀な致命的敗血症例は感染源を若い男性ドナーの皮膚までたどることができた[19]。この微生物は芽胞形成性嫌気性菌で土やヒト腸管から普通に検出される。この男性は曲げた自分の腕の中に二人の子供を抱いていた。著者らは赤ん坊のオムツから便が男性の前

肘窪部に付着したのだらうと推定している。

細菌検出装置

輸血前に血漿分画製剤中の細菌を検出する目的でいくつかの方法が検討されている。細菌は保存中に製剤中で増殖するので、最も感度に優れた方法では検体採取は採血後1～2日以内にするのが推奨されている。一方、感度がやや落ちる方法では輸血前2～3時間以内の検体採取でも検査可能である。一般的に、検査法の感度は検出に要する時間と反比例する関係にあるようである。たとえば、迅速検査法、pH や糖浸漬検査テープ、では 10^7 CFU/ml を超える菌数の検出にたった数秒で充分である。一方、培養法ではわずか1CFU/mlの細菌を検出するが、結果が得られるまで2日も要する。半自動蛍光顕微鏡やサイトメトリーのような研究段階の技術では 10^2 - 10^4 CFU/ml の細菌を数分以内に検出できる[20,21]。

増幅工程なしのリボゾームRNAによる分子生物学的手技では血小板製剤中の 10^4 CFU/ml より多い細菌を60-90分で検出可能である[22]。細菌リボゾームRNA塩基配列増幅法では血小板製剤中の約10CFU/mlレベルで微生物の検出が可能である[23]。

2種の自動培養装置、バイオメリュー社のBacT/AlertシステムとPall社のBDSは、血小板製剤の細菌検出にずーと研究され、米国FDA(食品薬品安全局)に品質管理用と

して使用の承認が得られている。試験管内では最小 1~10CFU/ml を検出する感度なので、培養法は多くの国で採用されつつある。米国ではこれら 2 機種を用いて血小板製剤の全数が検査されている。BacT/Alert の細菌検出の測定原理は増殖した細菌からの CO₂ 発生に置く。好気性または嫌気性培養液を含む培養ボトルに血小板製剤からメーカーの推奨量が無菌的に接種する。34-37℃ の培養ボトル内で細菌が増殖すると、CO₂ が放出されて、培養液の pH が低下する。ボトル底部の pH 反応性ディスクの色が変化すると、投影反射光の変化によって読み取られる。新鮮血液製剤中の初期細菌量は非常に少ない (10CFU/ml 未満、部分によっては 1CFU/ml 未満) と考えられるので、メーカーは採血後 1 日以上経過した検体を用いるよう推奨している。そうすることで、血小板製剤中で細菌が増殖する。24 時間以上遅延させることで接種検体に細菌混入製剤中の細菌を含む可能性がより高まる。しかし、検体接種して BacT/Alert で少なくとも 24 時間培養すると、血小板の有効期限を過ぎてしまうこともありうる。ボトルは連続してモニターされ、検知ディスク色の変化が細菌の増殖を表示する [24-26]。

Pall 社の eBDS システムの測定原理は細菌混入した血小板製剤では細菌増殖により、酸素が消費され、酸素の低下を測定するこ

とによる。閉鎖系で少量(4ml)検体を付属小バッグに移す。その中には 2 粒の細菌培養メヂウムが入っていて、35℃で 24 時間振盪して、増殖を促し、接種検体に細菌が含まれていた場合に検出を確実なものにする。培養液上部の空気を 1 回だけ採取する。メーカーが設定した酸素圧 cut-off より低値ならば、増殖した細菌の存在を示唆する [27]。

病原体不活化技術

輸血関連細菌敗血症を予防するもう一つの方法は病原体不活化法の導入である。これらの方法は現在臨床研究が実施されている [28]。輸血に関連した細菌、エンベロープを有すウイルス、ある種のエンベロープを有さないウイルス、一連の寄生虫を減少させようとするものである。だが、細菌芽胞、細菌エンドトキシン、ある種のエンベロープを有さないウイルス、プリオン蛋白には無効である。加えて、病原体不活化技術は輸血細胞の回収率、血小板 24 時間回収率、血小板寿命、血小板補正回収率を低下させ、輸血患者、血液センター労働者、環境に毒性をもたらす危険の可能性がある。病原体不活化技術の導入の潜在的危険性に反して、細菌培養検査の導入はそのようなリスクは殆んど無い。また、病原体不活化技術は細菌培養検査に比べて何倍ものコストがかかると予想される。

国が病原体不活化技術か、培養法の導入

を決定する際には、どちらの方法も時間が必要であるので血小板有効期限の延長が必要となるかもしれない。細菌培養法では検体採取と培養ステップに最大2日を要する。病原体不活化技術では処置前の病原体検査結果と光学化学物質の除去についての知識を持つのが極めて賢明である。それゆえに、3日間の有効期限ではどちらの方法にも適していない。幸い、血小板は3日間より長期間保存でも質と有効性は保たれる[29-33]。米国では、最近、食品薬品安全局は血液センターに細菌検出の敏感性、特異性、BacT/Alertの陽性・陰性予測値を評価する大規模市場後調査に参加することを条件に、認証バッグで7日間の成分採血由来血小板保存を承認した。米国では以前の血小板有効期限（細菌培養しない）は5日間であった。

それぞれの国は異なった感染症の危険を有している。米国を含む多くの国では、既に細菌培養法を導入し、機能している。それ故に、おのおのの国は現状の感染危険を分析して、そのうち細菌汚染によるリスクはどの程度か、コストをかけてリスクを減らすベネフィットと細菌培養スクリーニング導入によるリスクの低下のバランスを評価する必要がある。言葉を換えれば、病原体不活化技術は、国家がより多くの財源をつぎ込んで、血液センター職員と輸血患者に未知のリスクを負わせて、血小板生存、

血小板寿命、補正血小板回収率を減少させることを厭わないならば、考慮されよう。

Detection and prevention of bacterial contamination in platelet components

Stephen J. Wagner, Ph.D.
American Red Cross
Holland Laboratory, Rockville, MD, USA

血小板製剤における細菌汚染の検出と予防

Stephen J. Wagner, Ph.D.
American Red Cross
Holland Laboratory, Rockville, MD, USA

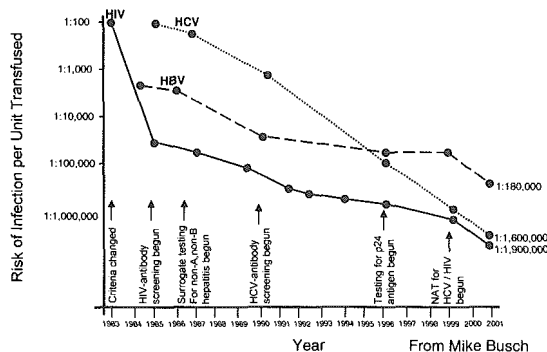
Presentation outline

- Risks of transfusion-associated bacterial contamination and sepsis
- Sources of contamination and contamination avoidance
- Bacterial detection methods
- Pathogen reduction methods
- Extended platelet storage
- Discussion of the merits of bacterial detection, pathogen reduction, and extended platelet storage

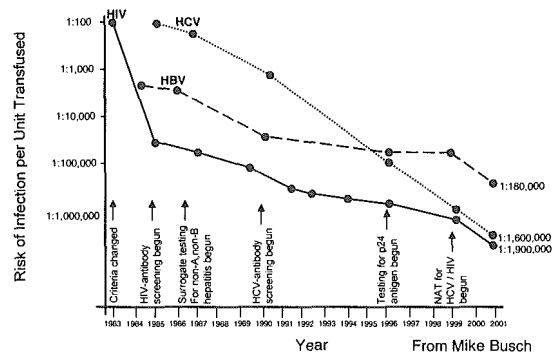
概要

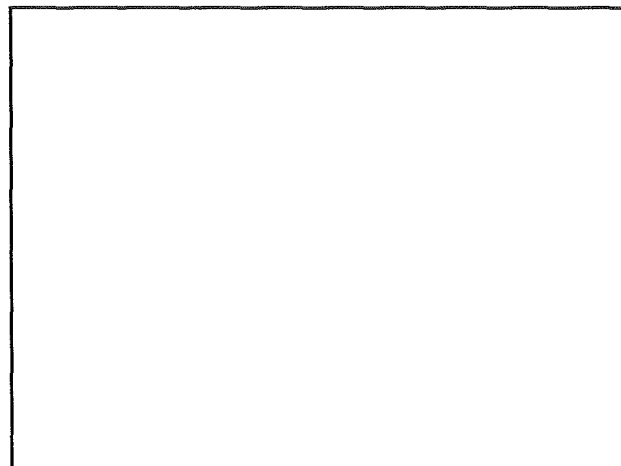
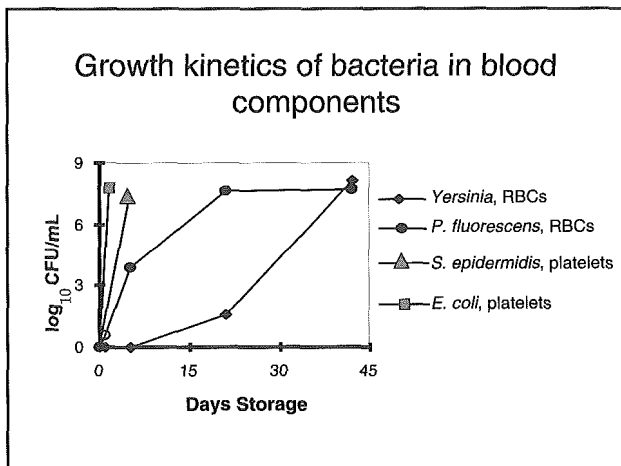
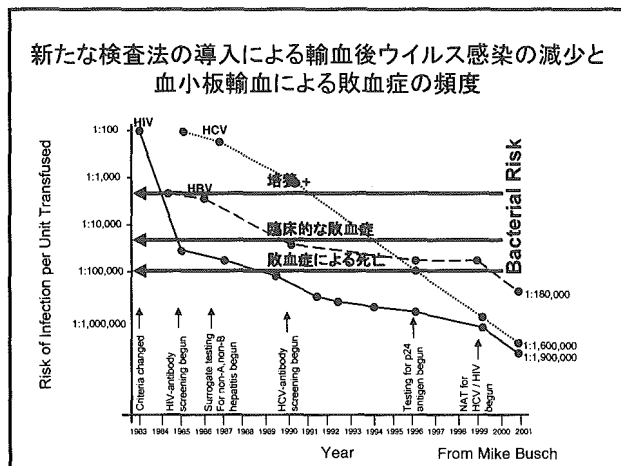
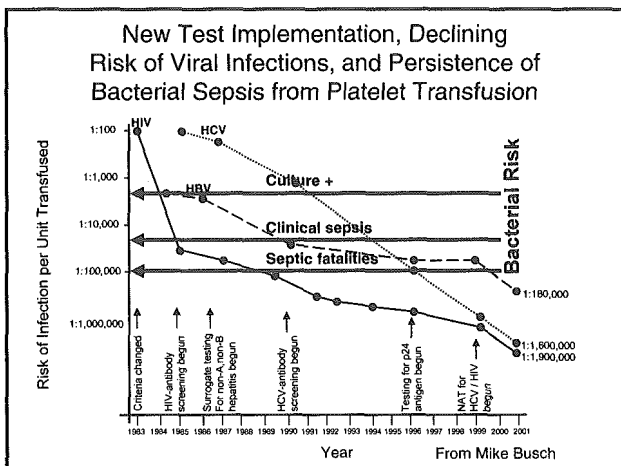
- 輸血に関連した細菌汚染と敗血症のリスク
- 汚染の原因と汚染回避
- 細菌の検出方法
- 病原菌の除去方法
- 血小板の保存期間の延長
- 細菌の検出、病原菌除去、および血小板の保存期間延長のメリットについて

New Test Implementation and Declining Risk of Viral Infections from Transfusion



新たな検査法の導入による輸血後ウイルス感染の減少





Bacteria represent the largest current infectious disease risk to blood safety.

| Mortality | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Platelet components (bacteria) | 1:60,000 [†] -450,000* |
| USA FDA fatality reports | 16.6% |
| Red cells (bacteria) | 1:7,700,000 |
| HIV | 1:2,000,000 |

*Transfusion 2001;41:1493-99
[†]Transfusion 2001;41:857-60

細菌は輸血の安全性を脅かす最大の感染リスクである

| 死亡率 | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| Platelet components (bacteria) | 1:60,000 [†] -450,000* |
| USA FDA fatality reports | 16.6% |
| Red cells (bacteria) | 1:7,700,000 |
| HIV | 1:2,000,000 |

*Transfusion 2001;41:1493-99
[†]Transfusion 2001;41:857-60

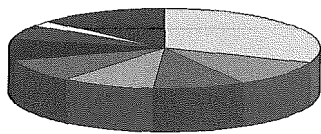
Why is the frequency of sepsis from platelets > that from RBCs?

- Many more bacterial species are capable of room temperature growth than growth at 1-6°C

なぜ血小板製剤による敗血症の頻度は、赤血球製剤による敗血症の頻度より大きいのか？

- 多くの細菌は1-6°Cより、室温でよく増殖することができるから

Bacterial species in platelets implicated in clinical sepsis

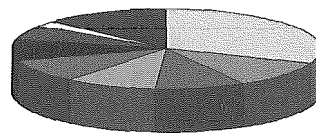


- *S. epidermidis*, 30.2%
- *S. aureus*, 10.5%
- *E. coli*, 9.3%
- *B. cerus*, 9.3%
- *S. cholerae-suis*, 8.1%
- *E. cloacae*, 5.8%
- *B-hem. Strep*, 5.8%
- *E. aerogenes*, 2.3%
- 10 others, 1.3% each

Compilation of data from Clin Micro Rev 1994; 7:290-302; Transfusion 2001;41:1493-99; www.shot.demon.co.uk/toc

n = 86

顕性敗血症に関連した血小板製剤中の細菌

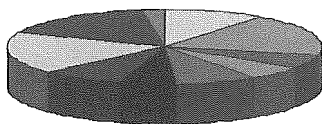


- *S. epidermidis*, 30.2%
- *S. aureus*, 10.5%
- *E. coli*, 9.3%
- *B. cerus*, 9.3%
- *S. cholerae-suis*, 8.1%
- *E. cloacae*, 5.8%
- *B-hem. Strep*, 5.8%
- *E. aerogenes*, 2.3%
- 10 others, 1.3% each

Compilation of data from Clin Micro Rev 1994; 7:290-302; Transfusion 2001;41:1493-99; www.shot.demon.co.uk/toc

n = 86

Bacterial species in platelets implicated in septic fatalities reported to the USA FDA (1976-1998)



- *S. epidermidis*
- *S. aureus*
- *E. coli*
- *Bacillus*
- *Salmonella*
- *Enterobacter*
- *Streptococcus*
- *Klebsiella*
- *Serratia*
- *P. mirabilis*

n = 52

Comments about organisms implicated in sepsis from platelets

- 18 organisms identified
- Approximately 30% are associated with normal skin flora, and \approx 56% are gram positive
- Skin flora are less likely to cause fatalities compared to gram negative organisms (eg., *Klebsiella*)
- All aerobic or facultative anaerobes
 - One not represented but notable exception: ***Clostridium perfringens* fatality from a pooled platelet unit** Trans Med 1998;8:19-22

血小板製剤による敗血症

- 18 の菌種が同定された。
- おおよそ30%が皮膚の常在菌で、56%はグラム陽性である。
- 皮膚常在菌はグラム陰性菌(例えば*Klebsiella*)と比較すると致死的ではないようである。
- 全て好気性あるいは偏性嫌気性菌である。
 - よく知られた例外としてプール血小板製剤由来の致死性の*Clostridium perfringens*がある。

Trans Med 1998;8:19-22---

Pooling issues

Risk of clinical sepsis: Johns Hopkins hospital, Baltimore MD USA

- Ness et al, Transfusion 2001;41:857-60.
 - Identified clinical cases of transfusion associated sepsis over a 12 year period, when there was a conversion from 51.7% random donor platelets (48.3% pools) to 99.4% single donor platelets (0.6% pools)
 - The # donors/septic event was 15,000 throughout the 12 year period, despite the conversion to single donor platelets
 - Therefore, pools were 5.5-times more likely to cause sepsis than single donor platelets

Patient population issues

The frequency of sepsis depends on the patient population

- Chiu et al, Transfusion 1994;34:950-4 (Hong Kong)
 - Studied 161 patient post BMT who received 3584 platelets
 - Septic work up was initiated with 2°C rise in pre-transfusion temp. or 1°C rise with rigors
 - Sepsis was defined as positive cultures from both platelet bag and recipient with identical biochemical profile, antibiotic profile, serotype or ribotype
 - Observed 10 cases, or 1 case in 358 units

Sources of Contamination

- Skin
- Donor Bacteremia
- Containers and Disposables
- Environment

汚染源

- 皮膚
- ドナーが菌血症
- 製剤バッグなど
- 環境

Skin source: Interesting Cases

Recurrent contamination from the dimpled skin of one plateletpheresis donor

- Anderson et al., Am J Med 1986;405-11.
 - One individual gave 17 plateletpheresis donations from a scarred dimpled site on the right antecubital fossa
 - Two units were implicated in septic events traced to the donor
 - Four units, which included the two units tied to the septic event, were culture positive with coagulase negative *Staphylococcus*
 - Follow up blood samples obtained from the non-scarred left antecubital fossa were routinely culture negative

Skin source

Contamination Avoidance

- Diversion of the initial blood flow
- Improvement of phlebotomy cleansing

皮膚が汚染源

細菌汚染の防止策

- 初流除去
- 静脈穿刺部位の消毒法の改善

Skin source

Diversion of initial blood flow

- Reduction of the load of skin associated bacteria
- Prevention of unnecessary destruction of WB units which occurs when sample tubes cannot be collected at the end of the procedure

皮膚が汚染源

初流除去

- 皮膚に関連した細菌量の減少
- 検体を回収できなかった時にもWB unitsを破壊しなくてよい(初流除去血を検体に使用できる)

Phlebotomy coring

- Gibson T, Norris W. Skin fragments removed by injection needles. Lancet 1958;2:983-985.
- Kojima K et al. Subcutaneous fatty tissue can stray into a blood bag. Vox Sang 1998;74(Suppl 1):(abstract 1205)

Reduction of load of skin organisms by sample diversion

- Vassort-Bruneau et al. Vox Sang 1998;74S1;(abstract 1039)
 - 15 mL of WB diverted into each of 2 satellite containers
 - 2% (116) of 3440 units were culture positive in 1 of the 2 satellite containers
 - Only 7 components associated from the 116 contaminated satellite bags were culture positive (after 30 mL diversion)

Vassort-Bruneau study analysis

- Encouraging results, but further evaluation difficult because:
 - high culture positive rate compared to other studies, did not repeat positive culture result
 - did not compare culture positive rate pre and post diversion of WB
 - no quantization to demonstrate reduction in bacterial load

In vitro evidence of bacterial load reduction by diversion of initial blood flow

- Figueroa et al., Transfusion 1995;35S:(abstract S42)
 - small liquid inoculum of *S. aureus* introduced inside the lumen of a needle
 - either remained as liquid or allowed to dry
 - needle used to pierce plasma and five 5-mL samples were taken for quantitative plating
 - ≈98% reduction of CFU/mL from 1st to 5th tube

In vitro evidence of bacterial load reduction by diversion of initial blood flow

- Wagner et al, Transfusion, 40:335-338, 2000.
 - Sterile medication port on a container with whole blood was "painted" with a *S. aureus* culture and allowed to dry
 - A sterile needle was used to pierce the contaminated septum and withdraw 42 mL of whole blood in six successive, 7 mL aliquots (tubes), and whole blood was then drained to a transfer pack
 - Bacteria were measured in the original container (via a different port) the tubes, and the transfer pack
 - There was an average 1.3 log₁₀ reduction in bacteria by diverting the initial blood flow into sample tubes

初流除去によって細菌の負荷量が減少することの in vitroでの証拠

- Wagner et al, Transfusion, 40:335-338, 2000.
 - 全血の入ったバッグポートに黄色ブドウ球菌の培養液を塗布し乾燥させる。
 - 無菌的な針で、汚染されたポートの隔壁を突き刺し、全血42mlを7mlのチューブに6回に分けて連続して採取し、のこりの全血はトランスファーバッグに入れる。
 - もともとのバッグは(別なポートを介して血液を採取)、チューブ、そしてトランスファーバッグ内の細菌数を測定した。
 - 初流をサンプルバッグに除去することで平均1.3logの細菌数の減少が得られた。

Field study data supporting diversion of initial blood flow

- de Korte et al. Vox Sang 2002;83:13-16
 - Collected blood normally or diverted the first 10mL of whole blood into a satellite bag
 - Performed bacterial testing by automated blood culture (BacT/Alert) in a laminar flow hood

| | Total bacterial prevalence | S. epidermidis prevalence |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Standard Collection | 0.35% (0.27-0.44) | 0.14% |
| Collection with diversion | 0.21% (0.12-0.35) | 0.03% |
| P-value | <0.05 | <0.02 |

初流除去を支持するフィールドスタディのデータ

- de Korte et al. Vox Sang 2002;83:13-16
 - 血液は定法通り回収、あるいは初めの10mlを付属のバッグに除去してから回収
 - 細菌の検出はクリーンベンチ内で automated blood culture (BacT/Alert)を用いて行った。

| | 全細菌検出率 | 表皮ぶどう球菌検出率 |
|----------|-------------------|------------|
| 通常の血液回収 | 0.35% (0.27-0.44) | 0.14% |
| 初流除去後の回収 | 0.21% (0.12-0.35) | 0.03% |
| P-value | <0.05 | <0.02 |

Clinical Study data supporting the diversion of initial blood flow

- Robillard et al, Transfusion 2005;45S:25A
 - Hemovigilance reported septic reactions due to transfusion of whole blood derived platelets before and after introduction of sample diversion
 - Sample diversion reduced sepsis 10-fold

| Time | Rate of Sepsis | P value |
|----------------|----------------|----------------------------|
| Pre-diversion | 1:2,670 | χ^2 : 8.04 p=0.005 |
| Post-diversion | 1:27,735 | |

初流除去を支持する臨床研究データ

- Robillard et al, Transfusion 2005;45S:25A
 - Hemovigilance により報告された、初流除去 (diversion)開始前および後の全血由来のPC製剤の輸血による敗血症。
 - 初流除去により敗血症が1/10に減少した。

| Time | Rate of Sepsis | P value |
|----------------|----------------|----------------------------|
| Pre-diversion | 1:2,670 | χ^2 : 8.04 p=0.005 |
| Post-diversion | 1:27,735 | |

Impact of skin disinfection on surface bacteria

| CFU per plate | PVPi | Isopropyl Alcohol + Tincture of Iodine | Chlorhexidine Gluconate | Green soap + Isopropyl alcohol |
|---------------|--------|--|-------------------------|--------------------------------|
| 0 | 34-40% | 63% | 60% | 0% |
| 1-10 | 35-43% | 34% | 25% | 17% |
| 11-100 | 10-14% | 2% | 12% | 47% |
| >100 | 0-13% | 1% | 3% | 36% |

Goldman et al, Transfusion 1997;37:309-12

Impact of skin disinfectant and method on surface bacteria

| | 0.75% PI up and down | 70% IPA up and down | 70% IPA up and down | 0.5% chlorh spiral |
|----------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Stage 1 | | | | |
| Stage 2 | 1.0% PI spiral | 2% tinct spiral | 2% tinct up and down | |
| 0 CfU/mL | 39% | 57% | 79% | 28% |
| <10 | 57% | 71% | 93% | 55% |
| <100 | 75% | 86% | 100% | 66% |
| <1000 | 96% | 100% | 100% | 82% |

McDonald et al, Vox Sang 2001;80:135-41

皮膚表面の細菌に及ぼす消毒液と消毒法のインパクト

| | 0.75% PI 上下 | 70% IPA 上下 | 70% IPA 上下 | 0.5% chlorh 螺旋 |
|----------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| Stage 1 | | | | |
| Stage 2 | 1.0% PI 螺旋 | 2% tinct 螺旋 | 2% tinct 上下 | |
| 0 CfU/mL | 39% | 57% | 79% | 28% |
| <10 | 57% | 71% | 93% | 55% |
| <100 | 75% | 86% | 100% | 66% |
| <1000 | 96% | 100% | 100% | 82% |

McDonald et al, Vox Sang 2001;80:135-41

Comments about skin disinfection methods

- Some agents may reduce the number of surface bacteria more than others – 70% IPA + tincture vs 0.75% PI + 1.0% PI
- Method of application and applicator may have some impact on the extent of reduction of surface bacteria
 - Application motion – up and down may be superior
 - Applicator vs. swab – applicator may reduce inadvertent touching of phlebotomy site

皮膚消毒法

- ある種の消毒液は他のものよりも皮膚表面の細菌数を減少するようだ……
例えば 70% IPA + tincture に対して 0.75% PI + 1.0% PIのほうが効果がある……
- 消毒液の塗布の仕方と塗布機は皮膚表面の細菌の減少の程度に影響を与えるようである。
 - 塗布の仕方は上下がよいであろう
 - 塗布機と綿棒 – 塗布機は静脈穿刺部位への不注意な接触を減らすであろう

Donor bacteremia: Interesting Cases

Recurrent contamination from an asymptomatic bacteremic donor

- Rhame et al., Ann Intern Med 1973;78:633-41.
 - One plateletpheresis donor was linked to 7 cases of *Salmonella cholerae-suis* transfusion associated bacterial sepsis; 2 cases were fatal
 - Three of the cases were linked to positive culture of the platelet units
 - The donor had a low-grade bacteremia who unknowingly had *Salmonella* osteomyelitis of the tibia

ドナーの菌血症: 興味あるケース

不顕性菌血症のドナーによる頻回の汚染

- Rhame et al., Ann Intern Med 1973;78:633-41.
 - 一人の血小板アフェレーシスドナーが7例の輸血が原因と思われるサルモネラ敗血症に関与していた: 2例は致死的であった。
 - 3例で血小板製剤から菌が検出された。
 - ドナーは知らないうちにサルモネラ菌による頸骨の骨髄炎になっていて、軽度の菌血症であった。