

شیوع آلودگی باکتریال پلاکت متراکم تولید شده در انتقال خون استان تهران

مجتبی دهقانیان^۱، حمیرا اعوانی^۱، بهمن میرزایی^۲، فرشته شاهچراغی^۳، مریم زادسر^۴

چکیده

سابقه و هدف

آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خونی، به عنوان یکی از مهمترین موانع عدم دستیابی به خطر صفر در طب انتقال خون، مطرح می‌باشد. با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته؛ عفونت‌های میکروبی ناشی از تزریق پلاکت در مقایسه با تزریق سایر فرآورده‌های خون بیشتر خطرناک است. در این تحقیق میزان آلودگی باکتریایی پلاکت متراکم تولید شده در پایگاه انتقال خون تهران با استفاده از روش‌های کشت میکروبی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در مطالعه مقطعی حاضر، ۱۵۰۰ نمونه پلاکت متراکم به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها در زمان‌های مختلف ذخیره‌سازی، بررسی شدند. بعد از گرماگذاری، نمونه به دست آمده خالص‌سازی و خصوصیات آن بررسی شد. از کیت Analytical Profile Index (API) 20 E برای شناسایی سویه جدا شده استفاده شد. نتایج در SPSS ۱۸ و Excel 2010 خلاصه و جمع‌آوری گردید. هم‌چنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه جدا شده به روش دیسک دیفیوژن ارزیابی گردید.

یافته‌ها

از بین ۱۵۰۰ نمونه پلاکت متراکم کشت داده شده، یک مورد (۰/۰۷٪) به عنوان نمونه آلوده تشخیص داده شد. این نمونه در آخرین روز ذخیره‌سازی تهیه شده بود. با توجه به نتایج به دست آمده، باکتری جدا شده سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد. بررسی نتایج معاینه پیش از اهدا، سابقه‌ای مبنی بر وجود باکتری در اهداکننده را رد کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده می‌تواند بیان‌کننده آلودگی محیطی در طول فرآیند جمع‌آوری، تهیه و ذخیره‌سازی پلاکت متراکم باشد. بهینه‌سازی روش‌های ضد عفونی محیطی و رعایت استانداردهای کاری می‌تواند در کاهش شیوع آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های خون موثر باشد.

کلمات کلیدی: پلاکت‌ها، باکتری، انتقال خون

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۶/ ۲/۹

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی - مرکز تحقیقات میکروبیولوژی - انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

۳- دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی - اسناد مرکز تحقیقات میکروبیولوژی - انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: متخصص بیماری‌های عفونی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق

پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

تزریق خون و فرآورده‌های آن یکی از روش‌های مهم برای درمان بیماران محسوب می‌شود. استفاده از روش‌های دقیق غربالگری آزمایشگاهی و هم چنین تهیه فرآورده‌های خون از اهداکنندگان داوطلب و بدون چشم داشت مالی، آموزش دیده و مستمر منجر به فراهم‌آوری سطح بالایی از سلامت برای فرآورده‌های تولید شده در انتقال خون شده است (۴-۱).

با وجود تمام پیشرفت‌های چشمگیری که در طب انتقال خون صورت گرفته است ولی آلودگی باکتریایی فرآورده‌های خون هم چنان به عنوان یکی از مهم‌ترین موانع عدم دستیابی به "خطر صفر" در طب انتقال خون مطرح می‌باشد (۵). تفاوت اساسی میان آلودگی به وسیله ویروس‌ها و آلودگی باکتریایی این است که آلودگی باکتریایی می‌تواند به راحتی در طول مدت ذخیره‌سازی و با توجه به شرایط نگهداری افزایش یابد. به عنوان مثال؛ تحت شرایط معمول نگهداری و ذخیره‌سازی پلاکت در کیسه‌های نفوذپذیر به هوا و حرکت مداوم در دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، حتی یک مقدار ناچیز از باکتری می‌تواند به مقدار خیلی زیادی افزایش پیدا کرده و به سطحی برسد که از نظر بالینی بسیار خطرناک باشد.

نحوه ذخیره‌سازی پلاکت متراکم، این محصول را به یک محیط کشت مناسب برای رشد طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها تبدیل کرده است (۸-۶). در سال ۲۰۰۴ طبق استاندارد تعیین شده از سوی انجمن انتقال خون ایالات متحده، مراکز انتقال خون موظف هستند که به صورت مداوم محصولات تولیدی خود را از لحاظ وجود آلودگی باکتریال با روش‌های تشخیصی تایید شده مورد ارزیابی قرار دهند (۱). روش‌های متعددی جهت کاهش خطر عفونت میکروبی ناشی از انتقال خون در دسترس قرار دارند. از جمله این روش‌ها می‌توان به مواردی هم چون انتخاب صحیح و دقیق اهداکننده، انتخاب صحیح و دقیق محل خونگیری، استفاده از یک روش مؤثر استریل کردن محل خونگیری، جداسازی حجم مناسبی از خون اولیه به وسیله کیسه‌های جانبی و هم چنین، ارزیابی مداوم سیستم فرایندهای مرتبط با تهیه و تولید فرآورده‌ها و

بررسی شرایط ظاهری کیسه اشاره کرد (۱۰، ۹).

در حال حاضر نتایج حاصل از روش‌های مبتنی بر کشت به عنوان استاندارد طلایی جهت تشخیص آلودگی باکتریال خون و فرآورده‌های آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). ولی با این حال این روش‌ها همواره با مفهوم "منفی تا تاریخ کشت" (Negative to Date) همراه بوده‌اند (۱۴-۱۲).

این موضوع یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت جهت تشخیص آلودگی باکتریایی کنسانتره پلاکت می‌باشد. با توجه به اهمیت موضوع و دسترسی سریع به نتایج مورد انتظار، روش‌های دیگری نیز در طول این مدت برای بررسی آلودگی باکتریایی خون و فرآورده‌های آن مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش‌های مولکولی و تکثیر توالی اسید نوکلئیک اشاره نمود (۱۶، ۱۵). استفاده از این روش‌ها می‌تواند نقش مهمی در تشخیص و شناسایی آلودگی باکتریایی خون و فرآورده‌های خونی در زمان تزریق داشته باشد.

در ایران بیش از ۹۵٪ پلاکت متراکم تولید شده از اهداکنندگان تصادفی می‌باشد که از پلاسمای غنی از پلاکت مشتق از خون کامل تهیه می‌شود و تنها درصد جزئی از پلاکت مورد نیاز به صورت آفریزس تولید می‌گردد. در سازمان انتقال خون ایران طی ۱۰ سال گذشته مطالعه‌های مختلفی جهت تشخیص آلودگی باکتریایی و مقایسه روش‌های مختلف صورت گرفته است (۱۸، ۱۷، ۱۴).

با توجه به نگاه ویژه سازمان انتقال خون ایران به مقوله ارتقا کیفیت و سلامت فرآورده‌های خون تولیدی در کنار افزایش سایر شاخص‌ها و هم چنین مدیریت خون بیمار و برنامه‌ریزی جهت دسترسی به اهداکنندگان سالم و مستمر، استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق جهت بررسی وجود آلودگی باکتریال در خون و فرآورده‌های خونی جزو ضروریات دستیابی به این اهداف می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی میزان فراوانی آلودگی باکتریایی کنسانتره پلاکت تولید شده در پایگاه‌های انتقال خون تهران با استفاده از روش‌های روتین کشت بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه توصیفی از نوع مقطعی و شیوه نمونه‌گیری از نوع در دسترس و آسان بود. با توجه به شناخت از جامعه و با استفاده از داده‌های مطالعه‌های قبلی، تعداد ۱۵۰۰ نمونه پلاکت که با روش جداسازی پلاسمای غنی از پلاکت مشتق از خون کامل از اهداکنندگان تصادفی تهیه شده بودند، جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مورد استفاده در فاصله زمانی اردیبهشت تا مهر ماه سال ۱۳۹۴ از پایگاه انتقال خون تهران تهیه شدند. کلیه اهداکنندگان در این مطالعه پیش از اهدا پرسشنامه‌ای را مطابق با روش‌های اجرایی استاندارد انتخاب اهداکننده تکمیل کرده و مورد مصاحبه و معاینه پزشکی قرار گرفته بودند. اهداکنندگانی که شرایط اهدای پلاکت را داشتند، طبق استانداردهای انتقال خون ایران خونگیری شدند. برای شناسایی عوامل بیماری‌زا، کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده از نظر آزمایش‌های HIV، HBV و HCV توسط آزمایشگاه الایزا (بایومریکس و Davubcu) پایگاه انتقال خون تهران مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آزمایش‌های غربالگری الایزا شامل آنتی‌ژن هپاتیت B (HBs Ag) و آنتی‌بادی هپاتیت C (HCV-Ag) و آنتی‌ژن-آنتی‌بادی HIV (Ag-Ab) منفی بود.

نمونه‌برداری در روزهای صفر، اول، دوم و سوم انجام گرفت. کلیه مراحل در این روش طبق استانداردهای اجرایی سازمان انتقال خون ایران انجام شد. در این مرحله جهت بررسی وجود آلودگی باکتریایی در محصول پلاکت متراکم که در روزهای مختلف تولید و نگهداری بودند؛ نمونه‌گیری با استفاده از کورد متصل به کیسه پلاکت انجام شد (۱۹، ۱۷). فرآورده‌های پلاکت متراکم در شیکر انکوباتور بخش فرآورده پایگاه تهران نگهداری می‌شدند.

پس از فرآوری محصول پلاکتی در واحد فرآورده پایگاه انتقال خون تهران با استفاده از سانتریفیوژ خون کامل با دور سبک، ابتدا پلاسمای غنی از پلاکت از گلبول‌های قرمز جدا شده و سپس در سانتریفیوژ مرحله دوم با دور سنگین، سلول‌های پلاکتی جدا گردیدند. کورد متصل به کیسه پلاکت خالی باقی گذاشته شد و در زمان جمع‌آوری نمونه، کورد به وسیله رولر با محتویات داخل کیسه پلاکت

یکنواخت و سپس از کیسه پلاکت جدا گردید. مشخصات کیسه پلاکت با استفاده از شماره بارکد به همراه نمونه جهت پیگیری‌های بعدی یادداشت شد.

نمونه‌های جمع‌آوری شده بلافاصله و با حفظ شرایط استریل به زیر هود میکروبی که از قبل استریل شده بود انتقال یافته و به وسیله ماده ضد عفونی کننده (Huwa-san، بلژیک) کاملاً استریل گردیدند. پس از انجام فرآیند استریلیزاسیون با استفاده از سرنگ یک بار مصرف استریل (سرنگ ۵ میلی‌لیتر دو تکه، یزد سرنگ، ایران) یک میلی‌لیتر از نمونه پلاکتی به محیط کشت مایع تلقیح شد. یک میلی‌لیتر از نمونه مورد نظر جهت انجام آزمایش‌های بعدی به کرایوتیوپ‌های استریل منتقل و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد (فرانسه، ژوان) نگهداری شد.

فرآیند کشت در دو مرحله، کشت اولیه در محیط مایع تایوگلیکولات (آلمان، مرک) و کشت ثانویه در محیط جامد بلاد آگار (آلمان، مرک)، به صورت هوازی و بی‌هوازی صورت گرفت. برای انجام این مرحله یک میلی‌لیتر از نمونه کنسانتره پلاکت تهیه شده در شرایط کاملاً استریل (زیر هود میکروبی و در مجاورت دو شعله) به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (آلمان، ممرت) گرماگذاری گردید. لوله‌ها در طول مدت زمان گرماگذاری به صورت روزانه از لحاظ کدورت و تغییر رنگ بررسی شدند. بعد از کنترل روزانه و بررسی محیط پس از گذشت ۷ روز از زمان گرماگذاری، از نمونه‌های محیط مایع مورد نظر کشت ثانویه بر روی محیط بلاد آگار به صورت هوازی و بی‌هوازی جهت دسترسی به کلنی تک و شناسایی عامل باکتریایی انجام شد. پلیت‌ها بعد از ۴۸ ساعت از لحاظ رشد کلنی بررسی شدند. با توجه به حساسیت و نیاز به دقت کافی و به منظور حفظ شرایط استاندارد در اجرای طرح، کلیه مراحل توسط مجریان طرح و منطبق با روش اجرایی شرح داده شده، صورت گرفت.

نمونه مثبت جدا شده جهت شناسایی دقیق جنس و گونه باکتری، در شرایط کاملاً استریل (زیر هود میکروبی و در مجاورت دو شعله) مجدداً بر روی محیط کشت بلاد آگار به صورت چهار منطقه‌ای، کشت خطی داده شد و

پلیت‌ها جهت رشد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از مدت زمان ۲۴ ساعت و با ظاهر شدن و رشد کلنی‌ها در محیط کشت، تک کلنی‌ها برای به دست آوردن مقدار مناسبی از کلنی خالص مجدداً بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شدند. سپس نمونه خالص‌سازی شده در محیط تریپتیک سوی برای (آلمان، مرک) حاوی ۱۸٪ گلیسرول کشت داده شد و جهت شناسایی و انجام آزمایش‌های آتی در فریزر و دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کلنی خالص به دست آمده مورد آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز و اکسیداز و بررسی‌های مورفولوژیک در زیر میکروسکوپ قرار گرفت. پس از اطمینان از گرم منفی بودن و کاتالاز و اکسیداز مثبت سویه مورد نظر، خصوصیات مورفولوژیک سلولی در زیر میکروسکوپ بررسی شد و باسیل بودن آن تایید گردید. با توجه به نتایج به دست آمده شناسایی اولیه بر اساس آزمایش رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، بررسی حرکت در محیط SIM (Sulfide, Indole, Motility medium)، بررسی رشد در TSI (Triple Sugar Iron Agar medium)، تولید رنگ دانه و بوی خاص صورت گرفت.

جهت تعیین هویت سویه جدا شده با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی، علاوه بر آزمایش‌های لوله‌ای شامل آزمایش‌های ایندول، TSI، SIM، سیترات، از کیت API 20 E (فرانسه، بیومریوکس) نیز استفاده گردید. برای این منظور از سویه مورد نظر در سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ استریل سوسپانسیون میکروبی تهیه و سپس با استفاده از پیت پاستور استریل در حفره‌های کیت که حاوی ترکیبات و قندهای لیوفلیزه می‌باشند اضافه و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، سایر مراحل بعدی انجام گردید. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کد ۷ رقمی حاصل از نتایج ثبت و سپس این کد وارد نرم‌افزار اختصاصی apiweb (فرانسه، بیومریوکس) شد و نام ارگانیزم ثبت گردید. بر اساس نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و افتراقی انجام گرفته و بر اساس طبقه‌بندی ارائه شده در کتاب برگگی، سویه جدا شده تا حد امکان تعیین هویت شد.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه به دست آمده به روش انتشار از دیسک کربی بائر بر روی محیط مولر هیتون آگار (آلمان، مرک) طبق دستورالعمل پیشنهادی سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) مورد بررسی قرار گرفت. در این روش سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. برای هر سری آزمایش، کشت تازه ۲۴ ساعته تهیه گردید. سپس یک لوپ از سویه در سرم فیزیولوژی استریل تلقیح شد. جذب نوری سوسپانسیون میکروبی با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر، ۱-۰/۸ تنظیم گردید. سپس این سوسپانسیون میکروبی برای تلقیح در محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده گردید. طی این مرحله سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده در محیط مولر هیتون آگار با استفاده از سوآپ پنبه‌ای استریل به صورت چمنی کشت داده شد. ۱۵ دقیقه پس از پخش کردن کامل سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط کشت و خشک شدن محیط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (انگلستان، مست دیسک) به فاصله حداقل ۲/۵ سانتی‌متر از لبه پلیت و یکدیگر بر روی محیط قرار داده شد.

سپس محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در ادامه با استفاده از خط کش مخصوص، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و طبق دستورالعمل شرکت سازنده سویه مورد نظر به صورت مقاوم، نیمه حساس و حساس گزارش گردید.

از سویه سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده شامل دیسک‌های ای‌می پنم (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سیفپییم (۳۰ میکروگرم)، ارتاپنم (۱۰ میکروگرم) و مروپنم (۱۰ میکروگرم) بودند. شیوع با استفاده از روش‌های آماری توصیفی در نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۸ به دست آمد. گزارش تمام شماره‌های اهدا به دست آمد و نتایج حاصل در نرم‌افزار Excel 2010 خلاصه و جمع‌آوری گردید.

یافته‌ها

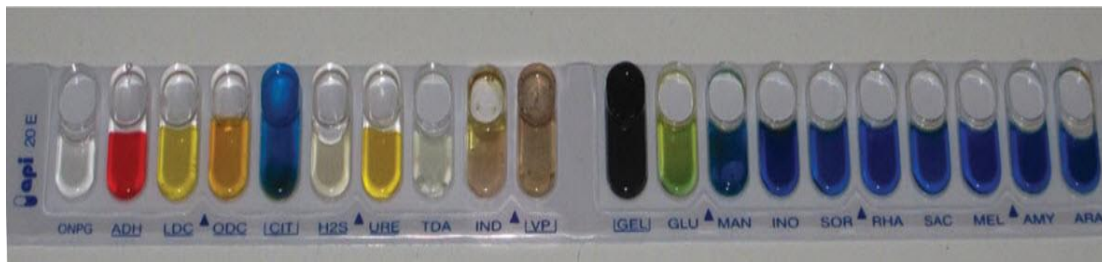
خصوصیات باکتری در لام رنگ‌آمیزی شده به طریقه گرم به عنوان باسیل گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داده شد. با استفاده از کیت API 20 E (فرانسه، بایومریوکس) نیز جنس و گونه نمونه جدا شده را به عنوان باسیل گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا تایید کرد (جدول ۱) (شکل ۱).

یافته‌های حاصل از آزمایش‌های انجام گرفته بر روی ۱۵۰۰ نمونه پلاکت متراکم جمع‌آوری شده نشان داد که تنها یک مورد (۰/۰۷٪) از مجموع نمونه‌ها به عنوان نمونه آلوده تشخیص داده شد. نمونه جداسازی شده بعد از کشت در محیط‌های افتراقی و بررسی‌های مورفولوژیک و

جدول ۱: خصوصیات فنوتیپی و آزمایش‌های تشخیصی بیوشیمیایی سویه باکتری جدا شده

خصوصیات فنوتیپی و آزمایش‌های تشخیصی بیوشیمیایی		
آزمایش	ویژگی	نتایج
	شکل	میله‌ای (باسیل)
خصوصیات فنوتیپی	مورفولوژی کلونی	گرد، برآمده، با حاشیه‌های نامنظم، براق با قطر ۲ تا ۴ میلی متر، تولید بوی خاص
	رشد بر روی بلاد آگار	+
	رشد بر روی محیط مکانکی	+
	رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد	+
	رنگ آمیزی گرم	-
آزمایش‌های تشخیصی بیوشیمیایی (آزمایش‌های لوله‌ای)	تولید رنگدانه	+
	حرکت	+
	اکسیداز	+
	کاتالاز	+
	ایندول	-
آزمایش‌های تشخیصی بیوشیمیایی (آزمایش‌های لوله‌ای)	تست هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد	محلول آبکی موکوئیدی
	سیترات	+
	TSI	قلیایی/قلیایی
API 20 E	ONPG	-
	ADH	+
	LDC	-
	ODC	-
	CIT	+
	H ₂ S	-
	URE	-
	TDA	-
	IND	-
	VP	-
	GEL	+
	GLU	-
	MAN	-
	INO	-
	SOR	-
	RAH	-
	SAC	-
	MEL	-
	AMY	-
	ARA	-

ONPG (اورتو- نیترو فنیل-بتا-گالاکتوزیداز)؛ ADH (آمینو اسید دکربوکسیلاسیون)؛ LDC (لایزین دکربوکسیلاز)؛ ODC (اورنیتین دکربوکسیلاز)؛ CIT (سیترات)؛ H₂S (سولفید هیدروژن)؛ URE (اوره)؛ TDA (تریپتوفان دآمیناز)؛ IND (ایندول)؛ VP (ووگس پروسکوئر)؛ GEL (ژلاتیناز)؛ GLU (گلوکز)؛ MAN (مانیتول)؛ INO (اینوزیتول)؛ SOR (سوربیتول)؛ RAH (رامنوز)؛ SAC (سوکروز)؛ MEL (ملیبیوز)؛ AMY (آمیگدالین)؛ ARA (آرابینوز)



شکل ۱: نتایج حاصل از نوار تشخیصی API 20E پس از تلقیح نمونه و گرماگذاری

جدول ۲: الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه جدا شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده

ردیف	نام آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	غلظت (µg/disc)	الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی		
				قطر هاله	حساس	نیمه حساس
۱	ایمی پنم	IMI	۱۰	۲۵	√	---
۲	آمیکاسین	AN	۳۰	۳۰	√	---
۳	کلستین	CL	۱۰	۱۶	√	---
۴	مروپنم	MEM	۱۰	۲۷	√	---
۵	ارتاپنم	ETP	۱۰	۲۵	√	---
۶	آزترئونام	ATM	۳۰	۲۰	√	---
۷	سفتازیدیم	CAZ	۳۰	۲۵	√	---
۸	سفپیم	CPM	۳۰	۳۰	√	---
۹	سیپروفلوکساسین	CIP	۵	۳۰	√	---
۱۰	پپراسیلین	PRL	۱۰۰	۳۰	√	---
۱۱	سفوتاکسیم	CTX	۳۰	۲۳	√	---
۱۲	جتتامایسین	GM	۱۰	۲۵	√	---

اندوسکوپی و داشتن اعمال جراحی و دندانپزشکی و عدم مصرف داروهای خاص برای اهداکننده مشخص گردید. دمای بدن اهداکننده نیز در زمان اهدا ۳۷ درجه سانتی‌گراد ثبت شد. بر همین اساس و سایر نتایج به دست آمده از مطالعه پرسشنامه اطلاعات پزشکی قبل از اهدا، نتیجه معاینه به صورت سالم گزارش شده است. بر اساس نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام برای سویه جدا شده، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن نیز مشخص شد (جدول ۲).

بحث

در این مطالعه از بین ۱۵۰۰ نمونه پلاکت متراکم کشت داده شده، یک مورد به عنوان نمونه آلوده تشخیص داده

با بررسی‌های انجام شده و با توجه به شماره نمونه جدا شده، مشخص گردید که نمونه مورد نظر در روز سوم (با احتساب روز تولید صفر) از پلاکت متراکم تهیه شده است. هم چنین با مرور اطلاعات رایانه‌ای اهداکننده و بررسی دقیق نتایج حاصل از معاینه پزشکی پیش از اهدای خون، مشخص گردید که اهداکننده مورد نظر هیچ نوع سابقه و علامتی مبنی بر وجود باکتری می‌مخفی ندارد. اهداکننده مذکر، متاهل، دارای سطح تحصیلات دیپلم و اهداکننده مستمر بود. اهداکننده شرایط شغلی خاصی نداشته و هیچ گونه علامتی مبنی بر خستگی، ضعف، بیحالی و یا اضطراب در زمان اهدا نداشته است. با بررسی پرسشنامه و معاینه قبل از اهدا، عدم سابقه بستری در بیمارستان و یا

شد. این نمونه در روز سوم (با احتساب روز تولید صفر) ذخیره‌سازی از پلاکت متراکم تهیه شده بود. بررسی‌های آزمایشگاهی صورت گرفته، باکتری جدا شده را سودوموناس آئروژینوزا تشخیص داد. نتایج حاصل از بررسی استریلیتی محیط‌های کاری مرتبط با تولید محصول کنسانتره پلاکت در طول مدت زمان انجام تحقیق از لحاظ وجود آلودگی باکتریال منفی نبوده است. بنابراین می‌توان گفت که نتایج حاصل از ارزیابی استریلیتی محیط‌های کاری و مرور اطلاعات رایانه‌ای اهداکننده و بررسی نتایج معاینه پیش از اهدا، مشخص گردید که هیچ نوع سابقه‌ای مبنی بر وجود باکتری می در اهداکننده وجود نداشته است و نتایج حاصل از معاینه پزشکی اهداکننده قبل از اهدا، وضعیت اهداکننده را سالم گزارش کرده است.

در آخرین مطالعه‌ای که در ایران جهت بررسی آلودگی باکتریایی کنسانتره پلاکت در سال ۱۳۸۴ صورت گرفت، از ۷۷۰۰ نمونه پلاکتی مورد بررسی، ۱۴ مورد آلوده تشخیص داده شد. در این مطالعه سویه‌های استافیلوکوک اپیدرمیس، استافیلوکوک ساپروفیتیکوس، آسینه توباکتر و باسیلوس جداسازی شدند (۱۷).

یافته‌های این تحقیق در مقایسه با تحقیق مشابه صورت گرفته در سال ۱۳۸۴ نشانگر تفاوت معنادار و ارزشمندی در کاهش شیوع آلودگی باکتریایی در کنسانتره پلاکت تولید شده می‌باشد. این در صورتی است که تخمین‌های ارائه شده در مقالات مختلف میزان شیوع آلودگی در پلاکت را ۱ در ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ واحد پلاکتی عنوان کرده‌اند که این موضوع بیان‌کننده دستیابی سازمان انتقال خون ایران به استانداردهای کیفی و کمی در سطح بین‌المللی می‌باشد (۲۰). استفاده از کیسه‌های خونگیری همراه با کیسه نمونه‌گیری (sampling pouch) جهت حذف حجم ۱۵ تا ۳۰ میلی‌لیتر ابتدایی خون جمع‌آوری شده، ارتقا‌فرایندهای مختلف مرتبط با تولید محصول و هم‌چنین رعایت استانداردهای تولید محصول منطبق با اصول (Good Manufacturing Practice) GMP و تاکید بر نظام مراقبت از خون و مراقبت از اهداکننده و هم‌چنین برگزاری دوره‌های آموزشی مختلف جهت اجرای هر چه بهتر استانداردها را می‌توان از جمله مهم‌ترین دلایل این کاهش در آلودگی

باکتریال کنسانتره پلاکت در این مطالعه بیان کرد (۲۴-۲۱، ۱۹، ۱۸، ۱۴). مطالعه‌های صورت گرفته مهم‌ترین میکروارگانیسم‌هایی که باعث ایجاد آلودگی باکتریایی در کنسانتره پلاکت می‌گردند را گونه‌های استافیلوکوک (۴۲٪)، اشرشیاکولی (۹٪)، باسیلوس (۹٪)، سالمونلا (۹٪)، استرپتوکوک (۱۲٪)، سراشیا (۸٪)، انتروباکترها (۷٪) و سایر میکروارگانیسم‌ها (۴٪) بیان کرده‌اند. همان‌طور که مشخص است، حدود ۵۶٪ این موارد سویه‌های گرم مثبت و هوازی هستند که مهم‌ترین منبع ایجاد آلودگی می‌تواند فلور پوست بازوی اهداکننده و عدم رعایت استانداردهای لازم برای ضد عفونی بازو باشد. بروز شوک سپتیک به وسیله باکتری‌های گرم منفی نیز گزارش شده است که می‌تواند بسیار کشنده‌تر از عفونت با باکتری‌های گرم مثبت باشد. مهم‌ترین منابع ورود باکتری‌های گرم منفی به خون و فرآورده‌های خون می‌تواند باکتری می نهفته اهداکننده و گاه حتی کلونیزاسیون پوست اهداکننده یا خونگیر و یا آلودگی محیطی باشد که در نهایت می‌تواند در هر یک از مراحل جمع‌آوری، تهیه و ذخیره‌سازی و نگهداری، فرآورده را آلوده نماید. به عنوان مثال در یک مطالعه صورت گرفته مشخص گردید وجود سودوموناس سپاسیا در محلول ضد عفونی کننده بازوی اهداکننده، باعث ورود عامل عفونی به محصول خونی و در نهایت ایجاد شوک سپتیک در دریافت کننده شده است (۲۹-۲۵).

خون و فرآورده‌های خونی که برای تزریق آماده می‌شوند می‌توانند در هر یک از مراحل تولید تا مصرف، دچار آلودگی باکتریایی گردند. به کارگیری روش‌هایی از قبیل رعایت استانداردهای انتخاب اهداکننده واجد شرایط، بهینه‌سازی روش‌های ضد عفونی بازوی اهداکننده، اتخاذ روش‌های مختلف ضد عفونی محیط‌های کاری مرتبط با تولید محصول، حذف حجم ابتدایی خون اهدایی، به کارگیری روش‌های غربالگری میکروبی برای پلاکت‌ها و غیر فعال‌سازی عوامل پاتوژن از جمله روش‌هایی هستند که نقش اساسی در کاهش شیوع آلودگی باکتریایی در خون و فرآورده‌های خون دارند (۳۱، ۳۰). تمامی این اقدامات و سیاست‌های احتیاطی عنوان شده، در حال حاضر در تمامی مراکز انتقال خون در حال اجرا می‌باشند (۳۲).

از زمان معرفی سیستم بسته برای تهیه خون و فرآورده‌های خون (از رگ اهداکننده تا رگ گیرنده) تاکنون اقدامات مناسبی جهت حفظ سلامت و کیفیت خون و فرآورده‌های خون صورت گرفته است (۲۷). دو عامل مهم باعث شده است که کنسانتره پلاکت به عنوان محیطی مناسب برای رشد باکتری‌های مختلف مطرح شود. اولین عامل، شرایط نگهداری و ذخیره‌سازی در کیسه‌های نفوذپذیر به گاز در دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دومین عامل فراهم‌آوری نیازهای غذایی و زیستی میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده در ترکیبات تشکیل دهنده این محصول می‌باشد (۳۴، ۳۳).

طبق استانداردهای انتقال خون، مراکز انتقال خون موظف هستند که به صورت مداوم محصولات تولیدی خود را از لحاظ وجود آلودگی باکتریایی با روش‌های تشخیصی تایید شده مورد ارزیابی قرار دهند. در حال حاضر نتایج حاصل از روش‌های مبتنی بر کشت به عنوان استاندارد طلایی جهت بررسی آلودگی باکتریال خون و فرآورده‌های آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱). در ایران تنها روش کنترل کیفی، محصولات از نظر کشت میکروبی به کار گرفته می‌شود و غربالگری پلاکتی جزء استانداردهای ایران قرار ندارد. در کشورهای پیشرفته استفاده از غربالگری پلاکت‌ها بر پایه روش‌های کشت از قبیل Bact/Alert مورد تایید قرار گرفته است، ولی با این حال روش‌های بر پایه کشت همواره با مفهوم منفی تا تاریخ کشت (Negative to Date) همراه هستند (۱۴). بدین معنی که نتایج کشت منفی تا روز نمونه‌گیری قابل اتکا می‌باشد و احتمال کشف آلودگی در روزهای باقی‌مانده تا انقضای محصول خونی وجود خواهد داشت.

تعداد باکتری‌ها در روزهای ابتدایی جمع‌آوری تهیه محصولات خونی بسیار پایین می‌باشد. از همین رو احتمال دستیابی به نتایج دقیق در روش‌های کشت که بر پایه نمونه‌گیری در روزهای ابتدایی تهیه محصول می‌باشد، بسیار پایین است. زیرا احتمال رشد میکروب در روزهای بعدی هم چنان وجود دارد. راه حل دیگری که جهت غلبه بر مشکلات ناشی از نمونه‌گیری در روزهای ابتدایی تهیه محصولات خونی وجود دارد، به کارگیری روش‌های بر

پایه نمونه‌گیری در روزهای آخر (قبل از تزریق و یا قبل از انقضا) فرآورده‌های خونی می‌باشد. در این روش‌ها، میکروارگانیسم‌ها فرصت کافی برای رشد در محیط فرآورده‌های خون دارند و با استفاده از روش‌های مختلف سریع می‌توان وجود آلودگی باکتریایی را در محصول تشخیص داد (۱۳، ۹، ۴). روش‌های سریع این قابلیت را دارند که می‌توانند نتایج را در مدت کوتاهی در اختیار قرار بدهند در نتیجه با استفاده از این قابلیت، می‌توان از این روش‌ها جهت بررسی آلودگی باکتریال قبل از تزریق فرآورده (point of care) اقدام کرد. در حال حاضر ایجاد آگاهی در زمینه شیوع آلودگی باکتریال در واحدهای پلاکت و عواقب ناشی از آن یکی از مهم‌ترین نکاتی است که مراکز انتقال خون در سراسر دنیا مورد توجه قرار داده‌اند. سیستم نظارتی مراقبت از خون و فرآورده‌های خون می‌تواند نقشی مؤثر در طب انتقال خون داشته باشد و سلامت خون و فرآورده‌های خون را در تمام مراحل زنجیره انتقال خون کنترل نماید. این سیستم ضرورت قابل ردیابی بودن خون و فرآورده‌های خون را از اهداکننده تا دریافت کننده در مراکز درمانی و انتقال خون فراهم می‌آورد (۳۵، ۹). می‌توان گفت که با استفاده از تکنولوژی‌های هم‌زمان غربالگری و شناسایی آلودگی باکتریایی، روزی فرا خواهد رسید که بتوان بررسی آلودگی را در زمان تزریق و در کوتاه‌ترین زمان ممکن تشخیص داد (۳۵، ۸، ۲).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده، رشد چشمگیری در بهبود فرآورده پلاکت متراکم، از نظر میزان آلودگی باکتریایی نشان می‌دهد. با رعایت دستورالعمل‌های داخلی مربوط به فرآیند تهیه، جمع‌آوری و تولید فرآورده کنسانتره پلاکت و هم چنین رعایت اصول و استانداردهای GMP در تولید این محصول، میزان آلودگی به طور چشمگیری کاهش یافته است. با توجه به جداسازی نمونه مورد نظر در آخرین روز و هم چنین مرور اطلاعات رایانه‌ای اهداکننده و بررسی دقیق نتایج حاصل از معاینه پزشکی پیش از اهدای خون و عدم وجود هیچ نوع سابقه و علامتی مبنی بر وجود باکتری می‌مخفی در اهداکننده، نتایج به دست آمده در این

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد که با همکاری بخش میکروبی‌شناسی انستیتو پاستور ایران انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان مقاله از همکاران محترم بخش‌های فرآورده و کنترل کیفی پایگاه انتقال خون تهران که با همکاری خود ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تحقیق می‌تواند بیان‌کننده احتمال آلودگی محیطی در طول فرآیند جمع‌آوری، تهیه و ذخیره‌سازی و مصرف پلاکت متراکم باشد. از همین رو کنترل شرایط استریلیتی و روش‌های ضد عفونی محیطی می‌تواند نقشی مهم در کاهش شیوع آلودگی باکتریایی در فرآورده‌های خون داشته باشد. گسترش اطلاعات به دست آمده می‌تواند نتایج و اطلاعات بیشتری را برای جلوگیری و کاهش عفونت‌های باکتریایی منتقله از خون در اختیار قرار بدهد.

References:

- Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. *Transfus Apher Sci* 2010; 42(1): 71-82.
- Schmidt M, Sireis W, Seifried E. Implementation of bacterial detection methods into blood donor screening—overview of different technologies. *Transfus Med Hemother* 2011; 38(4): 259-65.
- Störmer M, Vollmer T. Diagnostic methods for platelet bacteria screening: current status and developments. *Transfus Med Hemother* 2013; 41(1): 19-27.
- Walther-Wenke G, Schmidt M. Impact of Bacterial Contamination on Blood Supply. *Transfus Med Hemother* 2011; 38(4): 229-30.
- Menitove JE, Leach Bennett J, Tomasulo P, Katz LM. How safe is safe enough, who decides and how? From a zero-risk paradigm to risk-based decision making. *Transfusion* 2014; 54(3 Pt 2): 753-7.
- Murphy WG, Coakley P. Testing platelet components for bacterial contamination. *Transfus Apher Sci* 2011; 45(1): 69-74.
- Störmer M, Vollmer T. Diagnostic methods for platelet bacteria screening: current status and developments. *Transfus Med Hemother* 2014; 41(1): 19-27.
- Sireis W, Rüster B, Daiss C, Hourfar MK, Capalbo G, Pfeiffer HU, et al. Extension of platelet shelf life from 4 to 5 days by implementation of a new screening strategy in Germany. *Vox Sang* 2011; 101(3): 191-9.
- Vasconcelos E, Seghatchian J. Bacterial contamination in blood components and preventative strategies: an overview. *Transfus Apher Sci* 2004; 31(2): 155-63.
- McDonald CP. Bacterial risk reduction by improved donor arm disinfection, diversion and bacterial screening. *Transfus Med* 2006; 16(6): 381-96.
- Munksgaard L, Albjerg L, Lillevang ST, Gahrn-Hansen B, Georgsen J. Detection of bacterial contamination of platelet components: six years' experience with the BacT / ALERT system. *Transfusion* 2004; 44(8): 1166-73.
- Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, Vostal JG, Epstein JS, Goodman JL. Bacterial Contamination of Blood Components: Risks, Strategies, and Regulation Joint ASH and AABB Educational Session in Transfusion Medicine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 575-89.
- Koopman MM, van't Ende E, Lieshout-Krikke R, Marcelis J, Smid WM, de Korte D. Bacterial screening of platelet concentrates: results of 2 years active surveillance of transfused positive cultured units released as negative to date. *Vox Sang* 2009; 97(4): 355-7.
- Razjou F, Dabirmoghdam A. Comparison of the Bact/Alert blood culture system and manual culture method for detection of aerobic and facultative anaerobic bacterial contamination in platelet concentrates. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2012; 8(4): 265-71. [Article in Farsi]
- Reesink HW, Mohammadi T, Pietersz RN, Savelkoul PH. Rapid screening by real-time 16S rDNA PCR for bacterial contamination of blood products. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(7): 954-62.
- Dreier J, Stormer M, Kleesiek K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. *Transfus Med Rev* 2007; 21(3): 237-54.
- Ahmadi J, Gholizadeh HR, Farseh R, Sharifi Sh. Evaluation of bacterial contamination of platelet concentrates collected at Tehran Regional Blood Center. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2006; 2(6): 233-7. [Article in Farsi]
- Dabirmoghdam A, Razjou F, Kokab Sayar E. Evaluation of an automated microbiological blood culture for detection of bacteria in platelet units. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2013; 9(4): 399-405. [Article in Farsi]
- Sadeh M, Razjou F, Maghsudlu M, Norouzi G. Evaluation of the effect of Virkon disinfectant in reducing bacterial contamination of platelet

- components. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2008; 5(3): 179-84. [Article in Farsi]
- 20- Larsen CP, Ezligini F, Hermansen N, Kjeldsen-Kragh J. Six years' experience of using the BacT/ALERT system to screen all platelet concentrates, and additional testing of outdated platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. *Vox Sang* 2005; 88(2): 93-7.
 - 21- Abedini M, Soleimani Frizhandy A, Amini Kafi abad S. Evaluation and analysis of the results of the quality RBC units in blood centers of Iran. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2016; 12(4): 311-7. [Article in Farsi]
 - 22- Razeghi MS, Chatr Abnous N, Soleimani S, Kafi E. Evaluation of Bacterial contamination of platelet products by triple packs with and without sampling pouch in two different periods in Kerman Blood Center. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2016; 13(3): 243-7. [Article in Farsi]
 - 23- Rahimkhani M, Alizadeh Mohammad Shir Z, Erfani Y. Microbial contamination detection methods in platelet concentrates. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2008; 4(4): 265-74. [Article in Farsi]
 - 24- Bakhshandeh Z, Mohammadipoor M, Halabian R, Hamed Asl P, Hashemi V, Mohammadzadeh M, *et al.* Recombinant Human Lipocalin 2 as an antibacterial agent to prevent platelet contamination. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2012; 9(2): 114-23. [Article in Farsi]
 - 25- Anderson RL, Vess RW, Carr JH, Bond WW, Panlilio AL, Favero MS. Investigations of intrinsic *Pseudomonas cepacia* contamination in commercially manufactured povidone-iodine. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991; 12(05): 297-302.
 - 26- Védy D, Robert D, Gasparini D, Canellini G, Waldvogel S, Tissot JD. Bacterial contamination of platelet concentrates: pathogen detection and inactivation methods. *Hematol Rev* 2009; 1(1): e5.
 - 27- Wagner S. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang* 2004; 86(3): 157-63.
 - 28- Schmidt M, Karakassopoulos A, Burkhart J, Deitenbeck R, Asmus J, Müller T, *et al.* Comparison of three bacterial detection methods under routine conditions. *Vox Sang* 2007; 92(1): 15-21.
 - 29- Fournier-Wirth C, Deschaseaux M, Defer C, Godreuil S, Carrière C, Bertrand X, *et al.* Evaluation of the enhanced bacterial detection system for screening of contaminated platelets. *Transfusion* 2006; 46(2): 220-4.
 - 30- Webster J, Bell-Syer SE, Foxlee R. Skin preparation with alcohol versus alcohol followed by any antiseptic for preventing bacteraemia or contamination of blood for transfusion. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; (2): CD007948.
 - 31- Patel TG, Shukla RV, Gupte SC. Impact of Donor Arm Cleaning with Different Aseptic Solutions for Prevention of Contamination in Blood Bags. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2013; 29(1): 17-20.
 - 32- Razeghi MS, Chatr Abnous N, Soleimani S, Kafi E. Evaluation of Bacterial contamination of platelet products by triple packs with and without sampling pouch in two different periods in Kerman Blood Center. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2016; 13(3): 243-7. [Article in Farsi]
 - 33- Salunkhe V, van der Meer PF, de Korte D, Seghatchian J, Gutiérrez L. Development of blood transfusion product pathogen reduction treatments: a review of methods, current applications and demands. *Transfus Apher Sci* 2015; 52(1): 19-34.
 - 34- Vamvakas EC, Blajchman MA. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood* 2009; 113(15): 3406-17.
 - 35- Zweitzig DR, Riccardello NM, Pester JM, Jeanmonod R, Kopnitsky MJ, O'Hara SM. A novel approach for rapid detection of bacterially contaminated platelet concentrates via sensitive measurement of microbial DNA polymerase activity. *Transfusion* 2014; 56(6): 1642-51.

Original Article

Bacterial contamination Rate of Platelet Concentrates in Tehran Blood Center

Dehghanian M.¹, Avani H.¹, Mirzaei B.², Shahcheraghi F.², Zadsar M.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Microbiology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Bacterial contamination of platelet concentrates (PCs) is a longstanding problem in transfusion medicine. The present study aimed to evaluate the frequency of bacterial contamination in the platelet concentrates of Tehran Blood Center by culture-based method.

Materials and Methods

In this cross sectional study, totally 1500 platelet concentrates were randomly selected and assayed by standard aerobic and anaerobic bacterial culture methods. The PCs were collected at different time points during storage. One milliliter of each platelet concentrate was inoculated in 10 milliliter fluid Thioglycollate. The presence of bacteria was subsequently monitored. Any positive culture was further evaluated by subculture in the blood agar in both aerobic and anaerobic conditions.

Results

Of the 1500 PCs analyzed, one was found contaminated by gram negative bacteria. By further investigation it was confirmed that the responsible organism pertained to the *Pseudomonas* spp. It was isolated on day 4 of incubation. No evidence of infection in donor was found by reviewing the donor questionnaire.

Conclusions

Based on the findings of the current study, the contamination rate of PCs has reduced dramatically; however, the isolation of the *Pseudomonas* spp. is suggestive of environmental contamination. The previous studies have shown that improved donor screening, better skin disinfection, and removal of initial aliquot of donors' blood play an important role in controlling the bacterial contamination rate. These findings suggest that more attention should be paid to optimizing new methods for disinfection techniques and sterilization procedures for preparation premises and storage equipment.

Key words: Platelets, Bacteria, Blood Transfusion

Received: 21 Jul 2017

Accepted: 29 Apr 2017

Correspondence: Zadsar M., MD. Specialist in Infectious Diseases and Tropical Medicine. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 8898997; Fax: (+9821) 88963034
E-mail: maryam_zad@yahoo.com