

• 综 述 •

血小板制品细菌检测方法研究进展

林 红, 陈 妍 综述, 黄成垠 审校
(江苏省血液中心, 江苏南京 210042)

关键词: 血小板制品; 细菌污染; 细菌检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)02-0187-03

在过去 20 年中,由于检测试剂的研制和技术的不断改进和提高,经输血传播病毒疾病的风险显著降低^[1],但是输注 1 单位细菌污染的血小板和红细胞的两种血液成分的风险分别是 1:2 000 和 1:20 000,比病毒感染高出 250 倍。这意味着,细菌污染是目前输血医学传染因素中导致死亡的最大单一因素^[2],因此认为输血传播感染(TTIs)引起发病和死亡的重要原因因为细菌性感染^[3]。血液制品的细菌污染在输血医学上是一个为时甚久的问题,尤其是血小板制品(包括手工浓缩血小板和机采血小板)和红细胞的细菌污染,是输血传播疾病的最大的致命感染风险,目前还没有可充分应对的通用方法。有鉴于此,许多国家已经开展了对血小板制品的筛检^[4]。本文将血小板制品的细菌检测方法研究进展综述如下。

1 细菌污染的原因和特点

在采集血样时细菌的数量理论上只有 2~3 个,但血小板制品储存的温度为 20~24 ℃,适合细菌生长和繁殖,从最初的污染,直到发生对数期生长的这段时间是充满变数,不可预测的。已发现许多不同种属的细菌污染捐献的血小板,在实际增长模式中因品种、品系、隔离、生命周期和接种量的差异呈现生物学方面的高度变化,因而难以检测。

Benso 等^[5]认为近期有皮肤破损或穿刺史的献血者可能有无症状的菌血症。FDA 报告的因血小板细菌污染导致的死亡病例中,有 2/3 是源自各种无症状菌血症的供血者^[6]。因此,严格挑选献血者是防止细菌污染的一个重要方面。

Klein 等^[7]指出造成血液污染的是普通细菌。检测到的污染血液制品的微生物为各种革兰阴性菌和革兰阳性菌,这些细菌大部分属于人体皮肤的正常菌群。细菌污染血液制品的种类和频率在不同国家之间和同一国家内的血液中心都会不同;输注细菌污染的血制品的临床症状也不相同。采血过程中,只能在表皮层消毒,而且消毒液可能不完全抑制细菌^[8]。目前认为采用留样袋移除血液收集前端 30~40 mL 血液的方法可降低风险^[9]。

其他污染源还包括血袋本身、采血和处理血液的环境、空气、仪器设备、人群等。尽管在每一个可能的环节都注意无菌操作,同时采取了多种方法检测血液制品的细菌污染,但是由于细菌本身的特点、生长特性和环境因素导致检测方法受到了严峻的挑战,因此,需要重新评估在新体系下血小板细菌污染的残余风险,不断完善血小板细菌污染质量控制体系。

2 血小板细菌污染的检测方法及其评价

决定用于细菌污染检测的方法应该是实用、高效、快速、直观、特异、敏感的。现已获得 FDA 批准并用于血小板产品质量控制的检测系统包括: Bact/ALERT 3D 细菌培养监测系统、Pall eBDS 细菌检测系统、Scansystem 系统和血小板 PGD 检

测系统。目前,中国大陆还没有关于血液及血液成分细菌污染检测的相关法律法规,所以,对细菌检测技术的发展关注不多。笔者将细菌检测技术分为细菌培养法、快速检测法和床旁检测法三类,分别阐述其原理和优缺点。

2.1 细菌培养法 细菌培养法是目前公认的最准确的血液细菌检测方法,欧洲、加拿大、美国等国血液服务机构都采用此法对采集的血液制品进行检测,但是由于耗时长,操作不方便,只能保证“Negative to date”等原因,不适宜用于医院临床。又因为细菌生长的迟滞性, Hundhausen 等^[10]报道采用血液培养方法仍然会有细菌污染的浓缩血小板的漏检。

2.1.1 BacT/ALERT 该仪器的原理是持续监测培养瓶中 CO₂ 的浓度。若培养瓶中有细菌生长,则 CO₂ 的浓度增加,实验的结果则会由仪器自动判定,有利于操作者及时进行观察。其灵敏度甚至可以检测小于 5 CFU/mL^[11]。检测前需将产品保存至少 24 h,让细菌达到一定的数量;同时培养达到阳性结果也需要一定的时间(3 d 以上),而且整个过程需要 2 个时间段;如果 3 d 后出现阳性结果,已发出的血小板制品要被召回,但可能已被用于临床。

2.1.2 Pall eBDS 该检测系统是通过连续测量留样袋中的 O₂ 的消耗量来检测细菌污染情况。当 O₂ 浓度小于 9.4% 时判断为阳性。该系统只对需氧菌和兼性厌氧菌有效,对绝对厌氧菌无效。由于培养系统是完全封闭的,所以外在污染导致的假阳性不会出现。但由于只培养 24 h,所以生长缓慢的细菌检测不出来^[12]。

2.2 快速检测方法

2.2.1 Scansystem 该检测系统是利用单抗聚集血小板滤过后,对留在样品中的细菌 DNA 用通透剂和荧光标记,激光扫描,确定污染情况。它既可检测活菌又可检测死菌,且不同的接种量对结果没有很大影响,因此该方法所用的样品量很少,在 30 h 内即可发出阳性报告,灵敏度为 50 CFU/mL。经过 McDonald 等^[13]改良后,又将检测阳性报告时间缩短为 90 min,但其灵敏度只有 10³ CFU/mL。该系统需要有经验的微生物学家区分荧光信号,在常规临床输血中可行性不强。

2.2.2 核酸检测系统(NAT system) 该检测系统已经广泛应用于血库快速、敏感地检测血液相关病原体。为了研究出一种通用的细菌检测的 PCR 系统,一些研究者使用细菌核糖体(16S 和 23S rRNA),即真核细菌核酸序列保守的区段作为潜在的靶点。不幸的是,DNA 的提取和扩增试剂也存在痕量污染细菌 DNA;而且有些细菌(如嗜水生或大肠杆菌)是用于 PCR 扩增的酶原。因此,在 PCR 中出现的非特异性信号可能会降低本系统的灵敏度。为了克服这个问题,深度纯化试剂是必要的,但提高了检测成本。从死去的细菌可能检测到 DNA,

从而导致假阳性结果也是 NAT 系统的一个缺点^[14]。

2.2.3 流式细胞术 用荧光激活细胞分选(FACS)分析细菌污染情况时,需要先用去垢剂裂解血小板,再用膜渗透染料噻唑橙染色有生命力的和死亡的细菌的核酸 5 min。流式细胞仪分析检测细菌,检测灵敏度大约为 10^5 CFU/mL,大约需要 20 min。但如果细菌事先在孵育培养基中生长,其检测灵敏度将大大增加,可达 10 CFU/mL^[15]。但当血小板中掺入肺炎克雷伯菌时,细菌发出的信号与血小板碎片的信号有重叠,这种背景信号会影响细菌定量^[16]。

2.3 床旁检测方法 细菌培养方法和快速检测方法,对实验室条件和检测人员的要求较高,而且只能保证离开血站的血液及血液制品细菌污染是阴性的,不能保证保存在医院血库的血液以及输注前的血液的安全性。床旁细菌污染检测或称为发放时点检测,即输血机构在血小板临近使用时再次对其检测,可以有效避免已染菌血小板的误输,这是预防输注前血液和血液制品细菌污染的主要方向。

2.3.1 纤维试纸检测 是通过血小板产品中 CO_2 的增加、pH 的变化、葡萄糖浓度的异常对血小板产品中的细菌污染进行检测。试纸条虽能检测多种细菌,检测结果却因为菌种不同有差异,且对嗜血杆菌和奈瑟球菌不敏感^[17]。该方法价格低廉、快速,但灵敏度比培养法低($10^7 \sim 10^8$ CFU/mL),适用于输注前使用,能有效识别并防止输注因大量细菌污染的血小板制品。

2.3.2 血小板 PGD 检测系统 血小板 PGD? 检测系统是首个对提取自全血的混合血小板制品进行输注前快速检测细菌污染的系统,不需要培养过程,在 60 s 内即可显示有无细菌。原理是制备靶向编码革兰阳性菌的脂磷壁酸(LTA)和革兰阴性菌的脂多糖(LPS)的保守基因序列的单克隆抗体,与细菌细胞壁表面大量表达的抗原反应^[18]。该系统的检测限较高(约为 10^3 CFU/mL),不能用作血小板质量控制检测方法,主要用于医院输血服务部门在全血中提取血小板并混合之后,以及输血之前对血小板进行床旁细菌检测。与目前常用的在输血前检测混合血小板制品细菌污染的方法相比,该系统将细菌污染检测的灵敏度提高了 100~1 000 倍,是提高接受血小板输血患者安全的一项重要措施。随着技术的不断改进,该系统也开始用于红细胞输注前以及细胞治疗的细胞培养过程中的细菌检测,但其对革兰阴性菌的检出率较低^[19]。

2.3.3 BacTx Test 是由美国 Immunetics 公司开发的一种快速检测血小板细菌方法^[20]。该系统是通过革兰阳性菌和革兰阴性菌的细胞壁共有成分肽聚糖启动酶反应发出可见光,BacTx 阅读器和软件自动根据可见光颜色强度变化,提供细菌污染动力学结果,该系统能够标志任何污染的血小板,测试时间不到 1 h,敏感性阈值为 10^4 CFU/mL。但这个检测方法还是没能克服对革兰阴性菌特异性不强的问题。

4 不同细菌检测方法的比较

在常规培养条件下,普遍认为 BacT/Alert 的敏感性是最好的,Pall eBDS 的特异性是最好的^[21]。比较 Scansystem、内部 NAT 方法和 FACS 分析,发现内部 NAT 方法对细菌污染血小板的敏感性最高,Scansystem 的敏感性低,FACS 的敏感性则取决于菌株的染色效率^[22]。与 BacT/Alert 系统相比,基于细菌的 16S rRNA 基因的 NAT 检测显示出 100% 的灵敏度和特异度^[23]。比较 Bacti Flow 流式细胞术、BacT/Alert 培养系统、基于 23S rRNA 的反转录 PCR 和血小板 PGD 检测系统,发现血小板 PGD 检测系统对革兰阳性菌的检测更敏感,

革兰阴性菌的滴度需达到 10^7 CFU/mL 才能被检测到,而引起输血相关死亡的主要是革兰阴性菌^[24]。

5 展 望

为了预防血液制品细菌污染,在采供血环节采取了很多无菌措施,在此基础上,还在不断研发新的细菌污染检测技术和病原体灭活技术,血液制品细菌污染率、脓毒性输血反应率乃至死亡率都显著降低。同时,也发现相关数据在不同的研究报告中差异较大,这主要是由于研究中各环节的设计不同所致。引起血小板细菌污染率和临床输血反应率之间差异的原因主要是两方面^[25],一方面是低水平的细菌污染不能引起临床表现;另一方面,由于大多数血小板用于肿瘤、血液病和骨髓移植等免疫功能抑制的患者,特别是儿童患者,这些患者疾病的严重性和使用血小板时机选择的不同,使其表现的脓毒症,甚至是脓毒性休克和死亡等临床事件常常未能和输入细菌污染的血小板相关联。目前的细菌检测方法已经显示出局限性,突出表现在假阴性的检测结果下患者对浓缩血小板的败血性输血反应。另一方面,在阳性结果检出时,已经输注细菌污染阳性血液制品的患者,并没有产生输血反应的迹象。然而上述方法并不能够完全防止污染的血小板制品的发放,血小板制品的细菌检测方法的开发和研究仍需继续。

参考文献

- [1] Goodough L, Shander A, Brecher M. Transfusion medicine: looking to the future[J]. Lancet, 2003, 361(9352): 161-169.
- [2] Ness P, Braine H, King K. Single-donor platelets reduce the risk of septic platelet transfusion reactions[J]. Transfusion, 2001, 41(7): 857-861.
- [3] Chapman CE, Stainsby D, Jones H, et al. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma[J]. Transfusion, 2009, 49(3): 440-452.
- [4] Brecher ME, Hay SN, Rothenberg SJ. Validation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing of whole-blood-derived leukoreduced platelet-rich-plasma-derived platelets [J]. Transfusion, 2004, 44(8): 1174-1178.
- [5] Benson K, Leparac G. Bacterial contamination of platelet from a previously injured donor[J]. Transfusion, 1997, 37(Suppl): S182.
- [6] Yomtovian R, Tomasulo P, Jacobs MR. Platelet bacterial contamination: assessing progress and identifying quandaries in a rapidly evolving field[J]. Transfusion, 2007, 47(8): 1340-1346.
- [7] Klein HG, Dodd RY, Ness PM, et al. Current status of microbial contamination of blood components: summary of a conference[J]. Transfusion, 1997, 37(1): 95-101.
- [8] Yomtovian R. Bacterial contamination of blood: lessons from the past and road map for the future[J]. Transfusion, 2004, 44(3): 450-460.
- [9] Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003; 575-589.
- [10] Hundhausen T, Muller TH. False positive alarms for bacterial screening of platelet concentrates with BacT/ALERT new generation plastic bottles: a multicenter pilot study[J]. Transfusion, 2005, 45(8): 1267-1274.
- [11] Brecher ME, Hay SN, Rose AD, et al. Evaluation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing pooled whole blood-derived leukoreduced platelet-rich plasma platelets with a

single contaminated unit [J]. *Transfusion*, 2005, 45 (9): 1512-1517.

[12] McDonald CP, Colvin J, Smith R, et al. A novel method for the detection of bacteria in platelet concentrates utilizing oxygen consumption as a marker for bacterial growth [J]. *Transfus Med*, 2004, 14(6): 391-398.

[13] McDonald CP, Colvin J, Robbins S, et al. Use of a solidphase fluorescent cytometric technique for the detection of bacteria in platelet concentrates [J]. *Transfus Med*, 2005, 15(3): 175-183.

[14] Corless CE, Guiver M, Borrow R, et al. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(5): 1747-1752.

[15] Schmidt M, Hourfar MK, Nicol SB, et al. FACS technology used in a new rapid bacterial detection method [J]. *Transfus Med*, 2006, 16(5): 355-361.

[16] Mohr H, Lambrecht B, Bayer A, et al. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates [J]. *Transfusion*, 2006, 46(1): 41-49.

[17] Yazer MH, Triulzi DJ. Use of a pH meter for bacterial screening of whole blood platelets [J]. *Transfusion*, 2005, 45(7): 1133-1137.

[18] Yazer MH, Stapor D, Triulzi DJ. Use of the RQI test for bacterial screening of whole blood platelets [J]. *Am J Clin Pathol*, 2010, 133(4): 564-568.

[19] Vollmer T, Hinse D, Schottstedt V, et al. Inter-laboratory com-

parison of different rapid methods for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates [J]. *Vox Sang*, 2011, 103(1): 1-9.

[20] Palavecino EL, Yomtavian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets [J]. *Transfus Apher Sci*, 2010, 42(1): 71-82.

[21] Schmidt M, Karakassopoulos A, Burkhart J, et al. Comparison of three bacterial detection methods under routine conditions [J]. *Vox Sang*, 2007, 92(1): 15-21.

[22] Schmidt M, Hourfar MK, Nicol SB, et al. A comparison of three rapid bacterial detection methods under simulated real-life conditions [J]. *Transfusion*, 2006, 46(8): 1367-1373.

[23] Mohammadi T, Pietersz RN, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Detection of bacteria in platelet concentrates: comparison of broad-range real-time 16S rDNA polymerase chain reaction and automated culturing [J]. *Transfusion*, 2005, 45(5): 731-736.

[24] Dreier J, Vollmer T, Kleesiek K. Novel flow cytometry-based screening for bacterial contamination of donor platelet preparations compared with other rapid screening methods [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(8): 1492-1502.

[25] Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1): 195-204.

(收稿日期: 2012-09-11)

• 综 述 •

多重耐药菌医院内感染的研究现状及预防控制措施

王燕萍 综述, 阎琳晶 审校

(海南省农垦总医院, 海南海口 570311)

关键词: 交叉感染; 抗药性; 细菌; 预防; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 02. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)02-0189-03

近年来,随着抗菌药物、免疫抑制剂的应用和有创技术的开展,细菌的耐药性不断增强,普遍呈现出高度耐药、多重耐药的态势,多重耐药菌(MDRO)^[1],已经逐渐成为医院感染的重要病原菌。多重耐药(MDR)是指对下列 5 类抗菌药中 3 类或 3 类以上的抗菌药物耐药,5 类抗菌药包括头孢菌素类、碳青霉烯类、β-内酰胺酶抑制剂复合剂、氟喹诺酮类和氨基糖苷类;泛耐药(PDR)是指对现有的(或可获得的)所有抗菌药物耐药或对以上 5 类抗菌药物均耐药。

1 多重耐药菌医院感染的研究现状

多重耐药细菌的感染往往危及外科手术、移植、肿瘤化疗、重症监护及人免疫缺陷病毒(HIV)感染等住院患者,因缺乏有效的抗菌药物治疗,给临床治疗和医院感染的控制带来严峻挑战^[2]。感染病原菌常以革兰阴性菌为主,有大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、嗜麦芽芽食单胞菌,革兰阳性菌有金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、肠球菌与白色假丝酵母菌、热带念珠菌等真菌,这些病原菌大都为多重耐药菌。要预防和控制这些病原菌在医院病房传播,必须开展多重耐药菌的目标性监测^[3],从而及时发现、早期诊断多重耐药菌感染患者和定植患者,采取有效措施,预防和控制多重耐药菌的传播。

2 耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)

耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCN),因其染色体 *mecA* 基因编码产生变异的低亲和力的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a),造成该葡萄球菌对目前所有可用的 β-内酰胺类抗菌药物都耐药。

1961 年 Jevons 在英国首次发现 MRSA,20 世纪 60 年代中期扩展至欧洲许多国家及加拿大;70 年代末 MRSA 急剧增多遍及全球;80 年代后期已成为全球性的病原微生物。2006~2007 年 Mohnarin 监测结果显示^[4],MRSA 的检出率为 61.6%,2008 年 CHINET^[5] 的 MRSA 平均检出率为 55.9% (14.8%~77.5%)。中国上海市 1980 年前 MRS 仅占有金黄色葡萄球菌的 5%,但在 1985 年至 1986 年其上升至 24%,1992 年后达 50%~70%。不同医院检出率有较大的差异,2007 年全国 12 家医院监测的数据表明,MRSA 的检出率平均为 58.3%,检出率最高的医院达 80.4%^[6]。耐药范围日益扩大,耐药程度也日益严重,使得 MRSA 成为临床最关注的一类耐药菌。

MRSA 的耐药特征如果甲氧西林/苯唑西林耐药,不管体外药敏结果敏感与否,均应对全部 β-内酰胺类抗菌药报告耐