



**CURRENT STATUS OF RAPID BACTERIAL DETECTION METHODS FOR PLATELET COMPONENTS:
A 20-YEAR REVIEW BY THE ISBT TRANSFUSION-TRANSMITTED INFECTIOUS DISEASES
WORKING PARTY SUBGROUP ON BACTERIA**

**TROMBOSİT BİLEŞENLERİ İÇİN HIZLI BAKTERİYEL TESPİT YÖNTEMLERİNİN GÜNCEL DURUMU:
ISBT TRANSFÜZYONLA BULAŞAN ENFEKSİYON HASTALIKLARI ÇALIŞMA GRUBU BAKTERİ ALT
GRUBU TARAFINDAN YAPILAN 20 YILLIK BİR İNCELEME**

ALINTI: doi: 10.1111/vox.13283

YAZARLAR: Michael Schmidt, Sandra Ramirez-Arcos, Lea Stiller, Carl McDonald, ISBT Transfusion-Transmitted Infectious Diseases Working Party, Subgroup on Bacteria

ÖZETLEYEN: Dr. Berrin UZUN

GİRİŞ

Bakteriyemi genellikle ateşe neden olmaktadır, bu durumdaki kişinin genellikle bağış yapabilmesi olası değildir. Ancak, diş temizliği veya endoskopi gibi kısa süreli bakteriyemiye neden olan durumlar bağışçılarda asemptomatik bakteriyemiye neden olabilirler. Bağışçı seçimi bu anlamda çok kıymetlidir. Bağış sırasında bakteriyel kontaminasyon riskinin büyük bir kısmı, kan alımı sırasında ve bağışçının derisinden kaynaklanır. Ayrıca bakteriler virüslerden farklı olarak, kan bileşeni depolanması sırasında çoğalabilirler. Trombositlerin depolanma ısısı bakterilerin çoğalması için uygun bir ortam sağlamaktadır.

Bakteriyel enfeksiyon riskini azaltabilmek için bakteriyel testlerin uygulanması veya patojen azaltma (PR) sistemleri kullanılabilir. Maksimum 7 günlük inkübasyon süresine sahip kültür yöntemleri ve 4 saat toplam test süresine sahip hızlı tespit yöntemleri mevcuttur. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) yakın zamanda Amerika Birleşik Devletleri'nde trombosit süspansiyonlarının (TS) güvenliğini artırmak için öneriler yayınlamıştır. FDA önerileri, maksimum 5 gün boyunca saklanan tam kandan türetilen TS'lerinin taranması için hızlı test yöntemlerini veya TS depolama raf ömrünün 7 güne kadar uzatılması için birincil kültürle birlikte kullanılması şeklindedir. Bu inceleme, hızlı bakteri tespit yöntemlerinin mevcut durumuna odaklanılmış; mevcut tüm yöntemlerin analitik duyarlılıkları, tanı özgüllükleri ve rutin kan bağışçısı taramasına

uygulanmaları açısından kısaca açıklanmış ve karşılaştırılmıştır. Şekil 1, hızlı test yöntemlerinin zaman içerisinde geliştirilmesini ve uygulamaya geçilmesini göstermektedir.

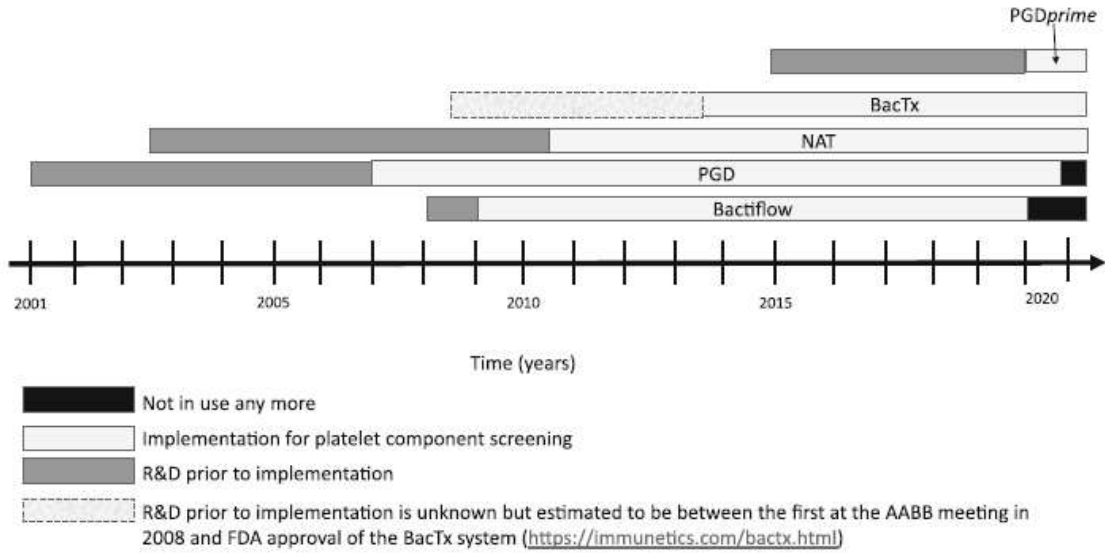


FIGURE 1 Timeline of development of rapid detection systems

GEREÇ-YÖNTEM

Hızlı tespit yöntemleri; TS'lerinin saklama sıcaklığı bakteri çoğalması açısından en büyük riski taşıdığından bakteri tespit testleri TS'lerine odaklanır. Bu testlerin analitik duyarlılığı 50-100.000 koloni oluşturan birim (CFU)/ml arasında değişir ve test süresi yarım saat ile 4 saat arasında değişmektedir. Bakteri hücre duvarını tespitini hedef alan iki yöntem vardır: Verax Pan Genera Tespiti (PGD ve PDGprime) ve BacTx testleri. Hızlı sistemler, akım sitometrisi tabanlı BactFlow ve NAT yöntemini de içerir.

Bu review için, PubMed'de (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) "hızlı yöntem"+"trombosit taraması"+"bakteri kontaminasyonu" anahtar kelimeleri kullanılarak bir literatür taraması yapılmıştır. Bu makalede, şu anda lisanslı ve kullanımda olan PGD testi, trombositler için BacTx bakteri tespit kiti ve NAT testleri gibi farklı yöntemlere odaklanılmıştır. Şekil 2'de, TS raf ömrü boyunca hızlı test yöntemlerinin uygulanabilirliği, TS kültür yöntemleri ve PR uygulamasıyla karşılaştırarak gösterilmiştir.

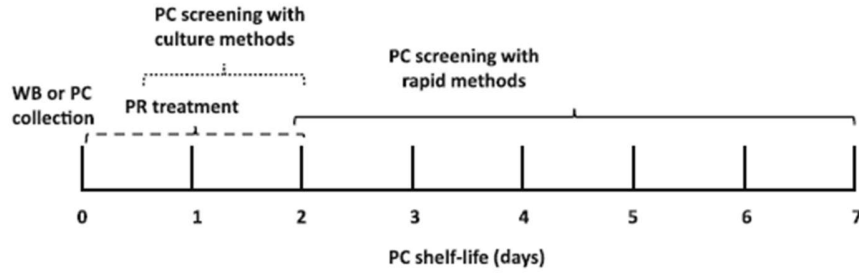


FIGURE 2 Timeline for application of platelet component (PC) safety strategies. PR, pathogen reduction; WB, whole blood

Verax Pan Genera Detection (PGD ve PGDprime) testleri: Bu immünolojik testler, Gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit bileşenini ve Gram-pozitif bakterilerin lipoteikoik asitlerini tespit etmektedir. Negatif bir PGD sonucuna sahip TS, 4-24 saat içinde transfüze edilebilir; ancak bu sonucun güvenilir olması için, öncelikle bir kültür yöntemiyle veya birincil PC kültürüyle (ABD'de TS raf ömrünü 5 günden 7 güne uzatmak için FDA önerilerine göre) de taranmalıdır denmektedir.

PDGprime, 2021 ortasında önceki PDG testinin yerini alan yeni nesil test sistemidir. PGDprime testinin çalışma prensibi makale içerisinde anlatılmaktadır. Trombosit PDGprime testi basitleştirilmiş bir iş akışına sahiptir ve orijinal teste kıyasla daha yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterir. Orijinal PGD testine kıyasla PGDprime testi ile geliştirilmiş tespit sınırı *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* için bildirilmiştir. PGDprime testinin özgüllüğü farklı TS bileşenlerinde belirlenmiş ve %99,9-%100 (alt tek taraflı %95 güven sınırı [GA]) olarak bulunmuştur. Daha yakın zamanda, *Acinetobacter spp.*'nin tanınmasını da içerecek şekilde geliştirilmiş bir PGDprime testi de geliştirilmiştir. PGD analizlerinin kapsamlı bir incelemesi yakın zamanda Mintz ve Vallejo tarafından yayınlanmıştır, incelenebilir.

TS'ler için BacTx bakteri tespit kiti: BacTx, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanının tespitini hedefleyen bakteri tespiti için nitel bir kolorimetrik yöntemdir. Bu hızlı yöntem, FDA'nın önerilerine göre tek başına veya birincil TS kültürüyle birlikte de kullanılabilir. Testin çalışma prensibi makale içerisinde anlatılmaktadır. Test işlemlerinden sonra test tüpü, BacTx analizörüne yerleştirilir. BacTx analizörü, tespit reaksiyonunu otomatik izleyen ve bilgisayardaki bir yazılımla sonucu yorumlayan bir fotometredir. Bakteriler 30 dakikalık okuma süresi içinde tespit edilirse, sesli bir alarmla birlikte "TS için Başarısız"; bakteri tespit etmezse "TS için Geçti" sonucu verir. Bu testin özgüllüğü

%99,8'dir (%99,0'lık tek taraflı %95 CI ile) ve analitik duyarlılığı Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, S.epidermidis ve Bacillus cereus için yaklaşık 10^3 CFU/ml'den Streptococcus agalactiae, P.aeruginosa ve Serratia marcescens için 10^5 CFU/ml'ye kadar değişmektedir. BacTx testinin TS taraması için rutin kullanımına ilişkin yayınlanmış bir rapor bulunmamaktadır.

Nükleik amplifikasyon testi: NAT, bakteriyel DNA veya ribozomal RNA'nın tespiti için evrensel bir tarama yöntemidir. Genel olarak, test için düşük TS hacimleri (yaklaşık 0,5 ml) kullanılır ve üreticinin talimatları doğrultusunda çalışılır. Evrensel bakteri tespiti, 16s veya 23s ribozomal genleri veya rpoB veya groEL gibi diğer genleri hedef alarak gerçekleştirilebilir. Bu testlerin kalite kontrolü çok önemlidir ve genellikle kültür negatif TS kullanılarak gerçekleştirilir.

Dreier ve ark.(28) TS'lerde bakteriyel tespit için iki RT-TSR testinin geliştirildiğini bildirmişlerdir. DNA kontaminasyonunu azaltmak için 8-metoksipsoralen ve UV ışınlaması uygulanmıştır. Yazarlar, test duyarlılığının kullanılan amplifikasyon enzimine bağlı olduğunu, iki farklı enzim bir arada kullanıldığında duyarlılığın oldukça arttığını ve insan DNA'sıyla çapraz kontaminasyon sorunu bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu test bakteri canlılığını da göstermektedir.

Paul Ehrlich Enstitüsü tarafından onaylan bir NAT yöntemi de Almanya'da bağışçılar için 5'li veya 10'lu mini havuzlar şeklinde kullanılmıştır. Bu yöntem ilk olarak 2010 ila 2015 yılları arasında kullanılmış ve 2021'den beri Alman Kızıl Haçı Baden-Wuerttemberg-Hesse tarafından TS'lerin günlük olarak serbest bırakılması için rutin olarak tekrar kullanılmaya başlanmıştır.

Dreier ve arkadaşları 27 nolu kaynakta, tam kan, kırmızı kan hücresi konsantreleri ve TS'ler dahil olmak üzere farklı kan bileşenlerindeki bakteriyel kontaminasyonu tespit etmek için TSR veya RT-TSR uygulamasının bir özetini sunmuşlardır. NAT analizlerinin kan bileşenlerini taramak için büyük bir potansiyele sahip olduğunu ancak diğer TS tarama sistemleriyle yöntem standardizasyonu ve karşılaştırılabilirliği gerektirdiği sonucuna varmışlardır.

Daha yakın bir zamanda, Brezilyalı bir ekip TS'lerde bakteriyel kontaminasyonu tespit etmek için bir RT-TSR yönteminin optimizasyonunu bildirmiştir. Bu testin tespit sınırı 10 genomdur ve işlem 4 saat sürmektedir. Yöntemin, bakteriyel kontaminasyon için negatif sonuç veren 50 TS havuzunu test etmek için kullanıldığında spesifik olduğu gösterilmiştir.

NAT yöntemleri esas olarak bakteriyel tespit için geliştirilmiş olsa da, spesifik organizmalar için analizler de geliştirilmiştir. TS taraması için NAT testlerinin sınırlılığı, reaktiflerinin potansiyel kontaminasyonudur ve bu da özgüllüğü ve duyarlılığı ve maliyeti etkilemektedir. Şu anda kan bankacılığı kullanımına sunulan ticari, jenerik bakteriyel NAT testleri bulunmamaktadır.

TARTIŞMA

TS tarama yöntemleri, kültür yöntemleri ve hızlı tespit yöntemleri olmak üzere iki alt bölüme ayrılır. Hızlı bakteri tespit yönteminin, test sonucunu 4 saat içinde vermesi beklenir. İdeal bir hızlı bakteri tespit sistemi, yüksek tanısal duyarlılığa ve yüksek tanısal özgüllüğe sahip olmalıdır. Bakteri kültüründe, tespit edilememe riskini azaltmak için, 24-48 saatlik bir inkübasyon süresi sağlanmalıdır. NAT, PGD ve BacTx gibi hızlı tespit yöntemleri, kontamine TS'deki bakterilerin, TS raf ömrünün ilerleyen dönemlerinde yapılmasını önermektedir. Örneğin, Almanya'da uygulanan NAT yöntemlerinde, 48-72 saatten sonraki TS'leri için kullanılır. NAT, hem tekli hem de 10'lu havuzlu TS'lerle kullanılabilir ve buffy-coattan oluşturulmuş havuzlanmış TS'ler ve aferez TS'leri için uygundur.

Bakteriyel kültür taramasında genellikle otomatik mikrobiyal sistemler kullanılmaktadır. Bu test sonunda "bugüne kadar negatif" kavramı kullanılmaktadır. Bu kavramla TS'dan belli bir raf ömründe alınan örnek hem aerobik hem de anaerobik kültür şişesine ekilir ve 7 gün boyunca inkübe edilir. TS kullanılırken "bugüne kadar negatif" tanımıyla kullanıma sunulur. Eğer ilerleyen zamanda alınan kültürde reaktif sonuç ortaya çıkarsa kullanıma sunulan TS için geri çağırma yapılır. "bugüne kadar negatif" serbest bırakma kriterinin olumsuz bir yönü, ünitelerin otomatik bir sistemle pozitif tespitten önce transfüze edilebilmesidir. Amerikan Kızıl Haçı, bağıştan 24 saat sonra TS'lerin bakteri kültürü taramasını ve yalnızca aerobik kültür şişesi ile ve 4 ml'lik hacimle kullanmış; septik transfüzyon reaksiyonlarında %50 oranında bir azalma olduğunu bildirmiştir. FDA'nın endüstriye yönelik kılavuzunda, kültür yöntemleriyle tespiti artırmaya yönelik önerilerde bulunmaktadır. Kültür şişesi başına 8 ml'lik hacimde ekim, aerobik ve anaerobik kültür kullanımı ile bağıştan itibaren örneklemede 36-48 saat gecikmenin bakteri tespitini artırdığını ve pasif gözetimle bildirilen septik transfüzyon vakalarının sayısını bir milyonda 1'den az olacak şekilde önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.



PGD prime ve BacTx yöntemleri, transfüzyondan önce point of care (POC, bakım noktası) testleri olarak kullanılabilir. POC testinin avantajı, bakteriyel kontaminasyonu test etmek için en uygun zaman olan transfüzyon zamanına yakın bir zamanda kullanılabilmesidir. Bu durumda, sorumluluk ve uygulama kan toplama kuruluşundan hastaneye kayar. Bu testleri gerçekleştirmek için eğitimli teknisyenler gerekecektir. NAT analizleri oldukça spesifik ve hassastır; ama bu yöntemler validasyon ve özel ekipman gereksinimleri nedeniyle rutin uygulama için zorluklar barındırır.

SONUÇ

Bakteriyel kontaminasyonla ilgili genel kan güvenliği yöntemlerine ek olarak, bağışçı seçim programları, bağışçı kolunun etkili dezenfeksiyonu ve diversiyon torbasının kullanılması (ilk gelen kan örneğinin ayrı bir torbaya alınması), hızlı bakteriyel tespit yöntemleri artık mevcuttur ve kan bileşeni güvenliğini artırabilir. Hızlı tespit yöntemleri, hastalarda septik transfüzyon reaksiyonlarına neden olma olasılığı daha yüksek olan hızla büyüyen bakteriler için idealdir. Azalmış tanısal duyarlılık nedeniyle, örnek toplama raf ömrünün sonlarında ve ideal olarak transfüzyondan hemen önce yapılmalıdır. Bu literatür incelemesi, BacTx'in rutin tanıya uygulanmadığını göstermektedir. Çeşitli metodolojik yaklaşımlar, her yöntemin avantajlarının yanı sıra dezavantajlarının da olduğunu böylece bakteriyel taramanın karmaşıklığını bir kez daha göstermektedir. Hızlı tarama yöntemlerinin, POC testleri olarak, TS raf ömrünü uzatmak veya kültür yöntemlerini desteklemek için kullanılma potansiyeli vardır.