

RINGKASAN TESIS.

Produk darah yang dikeluarkan oleh Unit Donor Darah (UDD) harus terjamin keamanannya sehingga tidak menimbulkan penyakit yang ditularkan melalui transfusi darah. Sementara ini pemeriksaan skrining darah dilakukan terhadap penyakit-penyakit hepatitis B, hepatitis C, HIV, dan Sifilis. Sedangkan untuk kontaminasi bakteri selain sifilis belum dilakukan. Karenanya masalah kontaminasi bakteri pada produk darah transfusi di Indonesia belum banyak dilaporkan. Peralatan untuk deteksi belum tersedia di semua UDD. Baru tahun ini mulai ada di beberapa UDD yang besar. Di Surabaya sejak April tahun ini mulai tersedia *BacT/ALLERT*, alat yang kemudian kami gunakan dalam penelitian ini.

Kontaminasi bakteri, terutama pada produk trombosit, dilaporkan merupakan produk yang dapat membahayakan pasien yang menerima. Di negara maju, 1 – 2000-3000 kantong trombosit terkontaminasi bakteri, dan di Amerika diistimasikan morbiditas yang parah dan mortalitas karena *TC* pada tahun 2005 mencapai 100-150 orang per tahun. Kontaminasi pada *WB* atau *PRC* lebih sedikit, karena bakteri kurang kondusif pada suhu penyimpanan 4-6 °C dari pada *TC* yg disimpan pada suhu 20-24°C. Di negara berkembang kontaminasi bakteri prevalensinya lebih tinggi, bahkan mencapai prevalensi sampai 4-17 %.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati produk darah di UDD Surabaya apakah memang ada kontaminasi bakteri dan bakteri apa yang mengkontaminasi bila ada kontaminasi akan dianalisa pada proses yang mana kontaminasi tersebut terjadi.

Sampel diambil dari 120 donor, 60 donor yang disiapkan untuk dipakai sebagai *WB* dan 60 donor yang disiapkan untuk pembuatan *TC*. Sampel donor diambil dari slang yang masih melekat pada lengan donor sebelum masuk kedalam kantong darah. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan spuit 10 CC dengan cara seaseptis mungkin. Sampel langsung dimasukkan kedalam tabung kultur, dan langsung dikultur dalam alat detector bakteri *BacT/ALLERT*. Darah dalam kantong untuk *WB* disimpan pada suhu 4-6°C dan diambil sampel pada hari ke 2x 24 jam, hari ke 7, dan hari ke 14. Sedangkan darah dalam kantong *TC* disimpan dalam *agitator refrigerator* pada suhu 20 -24°C, diambil sampelnya pada hari ke-2, ke-3, dan ke-5. Semua sampel dikultur dalam alat detektor *BacT/ALLERT* selama 7 hari.

Bila kultur sampai 7 hari tetap negatif, dinyatakan tidak ada kontaminasi bakteri.

Sampel yang terdeteksi bakteri, kemudian diidentifikasi spesies bakterinya dengan menggunakan alat VITEX-2.

Hasil kultur, 8 sampel dari 120 sampel donor (6,67%) terkontaminasi bakteri yang berasal dari 4 donor *WB* dan 4 dari donor *TC*. Pada sampel dari dalam kantong darah *WB*, tidak diketemukan bakteri sedangkan pada sampel dari dalam kantong produk darah *TC* diketemukan 3 sampel positif bakteri (5%). Namun, kontaminasi yang terdeteksi pada darah donor, tidak diikuti dengan terdeteksinya kontaminasi pada produk darah dari donor yang sama. Sebaliknya kontaminasi yang terdeteksi pada produk darah

(dalam hal ini produk TC) tidak berasal dari darah donor yang terdeteksi kontaminasi bakteri. Spesies bakteri yang ditemukan pada darah donor tidak sama dengan spesies bakteri pada produk darah.,

Kontaminasi positif pada darah donor dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain karena:

- a) Donor sudah mengidap bakteri (bakteremia) karena pernah menderita penyakit-penyakit seperti penyakit gigi atau perawatan gigi beberapa hari sebelumnya, atau penyakit gastrointestinal dan penyakit nasofaring. Bakteremia asimtomatis sering dapat lolos sebagai donor.
- b) Proses flebotomi, karena SOP yang tidak dilakukan sebagaimana mestinya,
- c) Peralatan atau tangan petugas yang sudah terkontaminasi bakteri.
- d) Disinfektan yang digunakan tidak memenuhi syarat.
- e) Jarum yang digunakan menusuk sarang bakteri flora normal pada *adnexa* kulit seperti pada kelenjar lemak, *follicle* rambut yang kemudian ikut aliran dalam jarum ke slang kantong darah.

Pada penelitian ini, pada produk darah WB tidak terjadi kontaminasi bakteri. Hal ini dapat disebabkan karena :

- a) Donor memang tidak bakteremia (steril) , sehingga WB dari donor yang sama juga tidak terkontaminasi bakteri
- b) Pada darah WB dalam kantong darah terutama pada 2 jam pertama sebelum dimasukkan kedalam *refrigerator* (waktu transit) , dapat terjadi proses *fagositosis in vitro*
- c) Donor bisa juga membentuk antibodi spesifik terhadap bakteri yang dapat melakukan *clearance* terhadap bakteri tersebut. .
- d) Leukosit , merupakan effektor dalam pertahanan anti bakteri, dan masih aktif beberapa jam sesudah penyadapan. Banyak bakteri Gram negative diinaktivasi oleh mekanisme pertahanan komplemen; LPS yang terdapat pada dinding bakteri Gram negatif, mengaktifkan komplemen dan terjadi opsonisasi sehingga meningkatkan proses fagositosis.

Di Eropah penyimpanan transit ini kadang kala diperpanjang sampai 12- 24 jam untuk memberi kesempatan leukosit memfagositosis bakteri sebanyak mungkin. (Aubuchton J.O, 2001),

Peneliti yang lain juga melaporkan bahwa aktivasi komplemen juga dapat terjadi didalam darah WB yang disimpan dalam *refrigerator* (Schleuning M et al , 2002)

Pada darah dalam kantong TC, terjadi kontaminasi. Namun TC tersebut tidak berasal dari donor yang terkontaminasi. Begitu juga spesies bakteri pada darah donor yang positif kontaminasi, tidak sama dengan spesies bakteri pada produk darah TC .

Dalam hal kontaminasi pada produk darah TC kemungkinan dapat terjadi karea anatara lain:

- a) Pertumbuhan bakteri dalam kantong TC yang disimpan pada suhu 20-24⁰ C, sangat pesat karena suhu lingkungan yang kondusif, sehingga darah donor yang pada kultur belum terdeteksi bakteri, sesudah menjadi TC dapat terdeteksi kontaminasi bakteri.
- b) Karena pengolahan TC yang kurang sempurna.

Dari pengamatan kemungkinan dapat terjadi karena proses pengolahan TC yang kurang steril. Ini terjadi pada waktu penyambungan slang tube pada kantong darah TC yang perlu diperpanjang. Slang tube diambil dari pemotongan slang tube kantong PPP (kantong satelit yang lain). Slang tube kantong TC dianggap terlalu pendek sehingga slang tube ini diperpanjang untuk alasan praktis, yaitu agar sampel yang diperlukan pada proses testing berikutnya (cross matching dll) tersedia volume sampel yang cukup. Namun, untuk memastikan analisis ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Dalam penelitian ini, spesies bakteri yang ditemukan ada 5 macam yaitu *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus hominis*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Fusobacterium varium*, *Prophyromonas assaccharolytica*. Kelima spesies ini merupakan kuman komensal, yang sering tinggal pada kulit manusia, dapat menjadi kuman oportunistis, dan dapat menimbulkan *outbreak* penyakit nasokomial di RS. Dari para peneliti mengatakan, kuman ini tidak bisa dianggap enteng karena bisa berbahaya, tidak seperti yang diperkirakan.

Propionibacterium acnes juga banyak ditemukan di Bood Bank di Jepang (S.Kanisawa et al, 2001) dan di negeri Belanda (Barker. LM et al, 2010), Bakteri ini tidak sekedar bisa menimbulkan Acne Vulgaris, namun beberapa keadaan klinis seperti *spondylitis*, *endocarditis*.

Staphylococcus hominis, yang merupakan bakteri *coagulative negative Staphylococci* (CoNS), sering merupakan bakteri kontaminan, dan dapat menimbulkan *outbreak nasokomial bakteremia* di RS disamping sebagai bakteri oportunistis yang dapat memperparah pasien yang sudah mengidap suatu penyakit.

Sphingomonas paucimobilis, sering bersarang pada peralatan ataupun dikran air, kamar mandi dll yang memungkinkan terjadi kontaminasi pada produk darah. *Outbreak* sering terjadi di RS, sebagai contoh di RS pendidikan di Turki (Kilic A et al, 2007) dan *outbreak* di USA yang sampai menjangar beberapa negara bagian karena suntikan *fentanyl* yang tidak steril. (RS Maryland, 2007)

Prophyromonas assaccharolytica, dapat ditemukan dirongga mulut, *Periodontitis*, *gingivitis*, dapat disebabkan infeksi bakteri ini yg dapat berkembang menjadi ANUG (*acute necrotizing ulcerative gingivitis*) yg selanjutnya bisa menjadi *Noma*. Penyakit *periodontitis* atau *gingivitis* diderita banyak orang yang menurut laporan 70-90% orang dewasa pernah menderita *gingivitis* dan *periodontitis*, yang kadang tidak diperhatikan pada waktu memeriksa calon donor

Akhirnya, kesimpulan dari penelitian ini, ada kontaminasi bakteri pada darah donor dan produk darah. Bakteri yang ditemukan adalah bakteri komensal. Analisis dimana proses kontaminasi dapat terjadi, kemungkinannya adalah pada proses flebotomi, pada proses pengolahan darah (*TC*), dan tidak lepas kemungkinan karena donor yang bakteremia.

SUMMARY

Any blood products manufactured by Blood Donor Unit (BDU) should ensure the safety for the recipients. This is to prevent any disease possibly transmitted through blood transfusion. Therefore, blood screening examination is a crucial step for prevention. Today, blood screening has been done to detect several diseases such as hepatitis B, hepatitis C, HIV and syphilis, but not to other bacterial contaminations, which is why there are only few problems in blood products transfusion containing any bacteria have ever been reported so far. Besides, the detector device for such problems hasn't been provided in each Blood Donor Unit. Only recently some major branches in big cities finally have them. Fortunately, Surabaya had its turn in April this year. The device called BacT/ALLERT, with which the study could be conducted.

Bacterial contaminations, especially in platelet products, have been reported to extremely harm the blood recipients. In developed countries, 1 out of 2000 to 3000 units of platelet is contaminated. In USA, bacterial contamination is considered the second most common cause of death overall from transfusion. The estimation of severe morbidity and mortality ranges from 100 to 150 transfused individuals each year (Hillyer C.D et al, 2005).

In the other hand, the number of bacterial contaminations in WB or PRC was minor. This is because those bacteria suffered from less conducive growth when stored at 4 -6 °C compared to PC when stored at 20 - 24 °C. Meanwhile in developing countries, the number of bacterial contaminations is even higher, with estimated prevalence rates ranging from 4% up to 17 % (Okrah, et al, 2009)

The objective of this study is to discover the possibility of bacterial contaminations in blood products of Red Cross BDU in Surabaya branch. Whenever detected, there will be several analyses conducted to get information about where or in which process the contaminations occur.

The study started by collecting samples out of 120 donors, 60 of whom were prepared for WB while 60 others were readied for PC. These donor samples were taken by a direct process from the tube which was still attached to the donor's during collection, using 10 cc syringes, and it was performed as aseptic as possible. These samples were instantly cultured in bacteria detector device, BacT/ALLERT for 7 days. The blood in WB bag, which was a single bag, was stored at the temperature of 4 - 6 °C and taken as samples on Day 2x24 hours, Day 7 and Day 14. While the blood in PC bags, which were triple bags, were stored in agitator refrigerator at temperature of 20 - 24 °C. After this period of 7 days culture, any positive results can be detected on the monitor, which turns to yellow. But in case of no yellow signs after 7 days, it means that the result is negative. The bacterial contaminated samples were then tested using VITEK -2 to identify the species of the bacteria.

As a result, 8 samples out of 120 donors (6,67%) were bacterial contaminated. The contaminations were derived from 4 WB donors and 4 PC donors. There were no bacteria found in WB blood bag samples, while in PC blood samples, 3 of them were positively bacterial contaminated (5 %).

There were differences between the culture result of donor blood and blood in bags. The positive result of donor samples was not followed by positive result of blood in bag units derived from the same donor origin and also the species of bacteria detected in donor blood were not same as the species detected in blood bag units.

Below are several factors causing positive contaminations on donor's blood:

1. The donor has suffered from bacteraemia due to the previous diseases such as toothache or dental treatments, gastrointestinal or nasopharing illness several days before the blood collections take place. However, someone with asymptomatic bacteraemia often passes the donor screening.
2. Phlebotomy process is not applied thoroughly because of
 - a) inappropriate implementation of SOP
 - b) the hands and equipments which are bacterial contaminated
 - c) environmental contaminations
 - d) unqualified disinfectant
 - e) scars which make disinfectant substance spreads unevenly
 - f) the syringes that pierce through bacterial normal flora buds on the adnexa of the skin such as fat glands and , hair follicle which then carried away through blood bag tube.

In this study, the WB is not bacterial contaminated. It is possible because :

- a) The donor is not a bacteraemia carriers, so the whole blood from this donor will have negative results.
- b) The whole blood in blood bag, especially in the first 2 hours before stored in the refrigerator can experience phagocytosis *in vitro* process.
- c) The donor may also have performed antibodies directed against specific bacteria that may lead to the clearance of contaminating bacteria.
- d) Leukocytes are an important effector in bacterial defense, and leukocytes remain active at least for several hours post-collection. Many Gram-negative bacteria are inactivated by a complement-dependent mechanism. LPS on the wall of Gram- negative bacteria will stimulate and activate complement so that when opsonization occurs, it will increase phagocytosis process.

Occasionally, some European Blood Transfusion Services delayed refrigeration for up to 24 hours to allow leukocytes to phagocytize as many contaminating bacteria as possible (Aubuchton J.O, 2001), The others report that complement activation can also occur in WB blood bag unit which was stored in *refrigerator* (Schleuning M et al , 2002)

As for the PC blood bags, some bacteria were detected. But the positive contamination result of PC bags were derived from negative result of the same origin blood donors. The species of bacteria in positive PC bag units were not same with the species of positive PC blood donor.

In this case, bacterial contaminations in PC can possibly occur because of:

a) The thriving growth of the bacteria in the storage with temperature of 20 – 24 °C so that the blood of PC donor is negative during the culture time but after it becomes PC blood products, the BactT/ALLERT devise detects some bacteria in it

b) The improper processing of PC preparation

Based on the observation, contaminations might take place at the time the tube of PC is elongated by inserting another tube. This blood bag tube is considered too short, which is why it is then extended using the part of satellite bag tube containing PPP for practical use. Besides, it is also to ensure a sufficient amount of the volume of samples in the following testing process, for example cross matching test etc. Nonetheless, it takes further research to set the ground on this analysis.

In this study there were 5 bacteria identified i.e *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus hominis*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Fusobacterium varium*, and *Prophyromonas assaccharolytica*. They are commensal germs which mostly found on human skin and can turn into opportunistic germs causing nosocomial outbreak in hospital. The researchers suggested that these germs are not to be taken for granted because the danger is beyond our expectations.

Propionibacterium acnes, is also found in Japan (S Kanisyawa et al, 2001) and Netherland (Barker, LM et al, 2010) blood banks. Not only this bacterium can cause *Acne Vulgaris*, but also other clinical state such as *spondylitis* and *endocarditis*.

Staphylococcus hominis, a *coagulativenegative Staphylococci* (CoNS) bacterium, is mostly a contaminant bacterium that can cause bacteraemia nosocomial outbreak in the hospital. Known as an opportunistic bacterium as well, it can worsen patient's condition who already suffers from another disease.

Sphingomonas paucimobilis, frequently nests in water taps, dishes, bathroom etc, also enables someone having contaminations on the blood products. As a result, outbreaks occur frequently in hospitals, for example in a teaching hospital in Turkey (Kilic A et al, 2007) and in USA which spread

through several states due to unsterile *fentiny* injection (Maryland hospital, 2007). Another type of bacterium,

Prophyromonas assaccharolytica, can be found in mouth cavity and can cause *periodontitis* or *gingivitis* which then develop into ANUG (*acute necrotizingulcerative gingivitis*) and leads to what is called *Noma*. Based on the report, many people suffer from *periodontitis* or *gingivitis*, 70-90 percent of whom is adults. Often, in the examination of donor screening, the administrator doesn't really notice this possibility.

Finally, this study concludes that there were bacterial contaminations in donor blood and blood products. The study also found some commensal types of bacteria. The analyses of the processes from which contaminations take place include phobotomy process, blood component (PC) processing and last but not least, from the probable bacteraemia donor.

ABSTRAK**Analisis Kontaminasi Bakteri pada Produk Darah Transfusi**

Nur Achmad Tjiptoprajitno, dr

Program Studi Imunologi UNAIR.

LATAR BELAKANG : Pemeriksaan kontaminasi bakteri pada produk darah transfusi belum dilakukan secara rutin di Indonesia dan laporan dari kasus kontaminasi bakteri hampir tidak ada. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah produk darah transfusi, baik *WB* dan *TC*, telah terkontaminasi bakteri atau tidak. Bila terdeteksi bakteri, spesies bakteri apa yang teridentifikasi dan akan dianalisis pada titik rawan proses mana terjadi kontaminasi.

METODE: Sampel darah diambil dari 60 donor untuk *WB*, 60 donor untuk *TC*, Setiap sampel diambil langsung dari pipa selang yang masih melekat pada lengan donor pada waktu penyadapan darah, dengan cara seaseptis mungkin. Sampel *WB* diambil dari dalam kantong darah *WB* yang telah disimpan dalam refrigerator dengan suhu 4-6⁰ C, pada hari ke 2x 24 jan, 7 hari dan 14 hari. Sampel *TC* diambil dari dalam kantong *TC* yang sudah disimpan dalam refrigerator dengan suhu 22-24⁰ C pada hari ke 2, 3, dan ke 5, Proses pengambilan dilakukan dalam “lemari laminari” untuk meyakinkan sterilitasnya, Sebagai kontrol juga dilakukan pemeriksaan pada isi dari kantong darah, 5 kantong yang akan digunakan untuk *WB* dan 5 kantong yang akan digunakan untuk *TC*. Untuk pemeriksaan kultur digunakan alat deteksi bakteri BacT/ALLERT dan untuk identifikasi bakteri digunakan alat VITEK-2.

HASIL : 8 sampel dari darah donor terdeteksi bakteri (6,5%), 1 sampel donor *WB* mengandung *Staphylococcus hominis* dan *Fusibacterim varium*, 3 sampel donor *WB* mengandung *Propionibacterium acne* dan 1 sampel tidak teridentifikasi. Pada darah dalam kantong *WB* tidak terdeteksi bakteri sedangkan sampel dari kantong *TC* terdeteksi pada 3 sampel (5%) yang mengandung *Staphylococcus hominis* dan *Propionibacterium acne*. Hasil positif maupun negatif kontaminasi bakteri pada darah donor *WB* tidak diikuti oleh positif atau negative kontaminasi pada darah *WB* maupun *TC* dalam kantong yang berasal dari donor darah yang sama. Spesies bakteri yg terdeteksi pada darah donor juga tidak sama dengan spesies bakteri pada produk darah,

KESIMPULAN: Pada penelitian ini terdeteksi bakteri pada darah donor dan produk darah transfusi. Bakteri yang teridentifikasi adalah bakteri komensal yang non patogenik atau patogenik rendah. Analisis dari titik rawan terjadinya kontaminasi kemungkinan pada tindakan flebotomi, pada tindakan pengolahan darah (*TC*) dan tidak lepas kemungkinan dari donor yang bakteremia.

KATA KUNCI : Kontaminasi bakteri, kultur darah donor dan produk darah, deteksi dan identifikasi bakteri, analisis titik rawan kontaminasi.

ABSTRACT:

**An Analysis of Bacterial Contamination
In Transfusion Blood Products.**

Nur Achmad Tiptoprajitno

Immunology Magister Program

Background: Bacterial contamination of blood products examination is not a routinely done in Indonesia and the report of these cases are almost none. Since April 2012, Surabaya Red Cross Blood Transfusion Service has had a bacterial detector BacT/ALLERT so this study could be done. This study is to find out whether the blood products, either the whole blood or other blood products especially platelet concentrate, have been contaminated. Beside this the aim was to analysis the critical points of the blood transfusion process from which bacterial contamination take place.

Methods: Blood samples from 60 donors used for WB and 60 donors for PC were examined. Each blood sample was taken directly through the bag tube that still attached on the donor's arm during blood collection. WB samples were taken from the bags which had been stored at 4-6° C after 48 hours, 7 and 14 days. The PC samples were taken from PC bags which had been stored at 20-24°C after 2, 3, and 5 days. The process was performed in a "laminary box" to ensure sterility. As a control the content from 5 single blood bags, and 5 triple blood bags were cultured. BacT/ALLERT was used to culture and detect the samples for aerobic and anaerobic bacteria, and VITEK-2 to identify the species of bacteria.

Results : Eight samples from donor were positive (6.67%). One WB donor sample containing *Staphylococcus hominis* and *Fusibacterium varium*, 3 WB donor samples containing *Propionibacterium assaccharolitica*, where as 3 samples from TC donor contain *Sphingomonas paucibilis* and *Propionibacterium acne* , one sample could not be identified. Samples from WB bags showed no contamination where as 3 bags of PC samples (5%) contained *Staphylococcus hominis* and *Propionibacterium acne*. The positive or negative result of donor samples was not followed by positive or negative result of blood in bag units derived from the same donor origin or vise versa. The species of bacteria detected in blood donor samples was not same as the species detected in blood bag units.

Conclusion : In this study, there were bacterial contaminations in blood donor and blood products. The identified bacterial species were commensal and less pathogenic bacteria. The analyses of critical points of the processes from which contaminations take place include phlebotomy process, blood (TC) processing and probable bacteremia donor.

Key word: Bacterial contamination, blood donor and blood products culture, bacterial detection, bacterial identification, analysis of processing critical point of bacterial contamination.