

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

**RANDOM BAĞIŞ TROMBOSİT  
SÜSPANSİYONLARINDA BAKTERİYEL  
KONTAMİNASYONUN AKIŞ SİTOMETRİSİ İLE  
GÖSTERİLMESİ**

**Hediye SOLTEKİN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2008**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı**

**RANDOM BAĞIŞ TROMBOSİT  
SÜSPANSİYONLARINDA BAKTERİYEL  
KONTAMİNASYONUN AKIŞ SİTOMETRİSİ İLE  
GÖSTERİLMESİ**

**Hediye SOLTEKİN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. İhsan KARADOĞAN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No:2006.02.0122.015)

‘Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir’

**Antalya, 2008**

## ÖZET

Trombosit transfüzyonları günümüzde trombosit sayısında azalma ve/veya trombosit fonksiyonlarında bozulma ile giden çeşitli kanamalı hastalıkların tedavisinde ve/veya proflaksisinde, özellikle malign hastalıkların tedavisinde izlenen yoğun kemoradyoterapiden sonra açığa çıkan aplazi dönemlerinde en önemli destek tedavisidir.Trombosit süspansiyonları gönüllü bağışçılardan alınan tam kanın santrifügasyon yöntemi ile elde edilir.Bu şekilde elde edilen trombosit " Random Bağış Trombositi " denir.

Random bağış trombositlerinin hazırlanma aşamalarında asepsi ve kapalı ortam koşullarına uyulmasına rağmen saklama süresinin dört günü aşması, trombositlerin oda ısısında saklanması bakteriyel kontaminasyon varlığında üreme olasılığını arttırmaktadır.Bakteri bulaşı farkedilmez ise transfüzyon sonrası yaşamı tehdit eden ağır septik tablolar izlenebilir.

Trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun tam olarak gösterilmesi için çeşitli otomatik kültür sistemleri kullanılmaktadır.Akış sitometrisi ile bakteri varlığının gösterilmesi mümkündür. Ancak hızlı ve pratik şekilde gösterilmesini sağlayan standardize edilmiş bir yöntem bulunmamaktadır.

Kapalı ortam koşullarında hazırladığımız random bağış trombositlerinde 24 saatlik, normal koşullar altında ve 5 gün, inkübasyon sonrası akış sitometrisi ile bakteri DNA' larını boyayan thiazole orange boyasını kullanarak bakteri varlığını göstermeye çalıştık.24 saat ve beş günlük saklama sonrası otomatik kültür sistemleri ile korelasyonunu araştırdık.

**Anahtar Kelimeler:** Random bağış trombosit, bakteriyel kontaminasyon, akış sitometri

## ABSTRACT

Nowadays, platelet transfusion is the most important supporting treatment at the period of aplasia emerging after the intense kemoradyotherapy used especially in the treatment of malign disease, in the treatment and/or prophylaxis of various hemorrhage disease, goes with decreasing of the number of platelet. Platelet suspension is obtained by the method of full blood centrifugation which is gotten from volunteer contributor. Platelet gotten by this method is called "Random Donation Platelet".

Exceeding four days for storage time in spite of the complying with conditions asepsi and covered environment in the preparation steps of random donation platelets, the storage of platelets in room heats. If bacterial contamination exists, it increases the probability of procreation. If bacteria infect is not noticed, heavy septic cases treating the vita could be seen after transfusion.

In platelet suspensions, various automatic culture systems is used to demonstrate bacterial contamination. It is possible to demonstrate the existing of bacteria with flow cytometer. But there isn't a standart method which shows fast and practical way.

We will try to show the existing of bacteria by using thiazole orange stain which colours the DNA of bacteria with in early stages of flow cytometer after the incubation for 24 hours in random donation platelet made in covered environment conditions with automatic culture systems after the storage for five days.

**Key words:** Random donor platelet, bacterial contamination, flow cytometry

## **TEŞEKKÜR**

Bu alıőmanın gerekleőmesinde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta tez danıőmanım Prof. Dr. İhsan KARADOĞAN'a, beraberinde Dilara ÖĐÜN'E, araőtırmalarımındaki desteğinden dolayı bilim dalı baőkanım sayın Prof. Dr. Ayően TİMURAĞAOĞLU'na, kan baėıőçılarından random trombosit toplanmasında yardımcı olan kan bankası çalıőanlarına, akış sitometri ve mikrobiyoloji laboratuvarında beraber çalıőtıėımız arkadaşlarıma yardım ve sabırları için ve manevi desteklerinden dolayı da aileme

**TEŞEKKÜR EDERİM.**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	x
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xi
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Trombositler	
2.1.1. Yapı	3
2.1.1.1. Trombosit Granülleri	3
2.2. İşlev	5
2.2.1. Trombosit Adezyonu	5
2.2.2. Trombosit Salıverme (Release) Reaksiyonu	5
2.2.3. Trombosit Agregasyonu	6
2.2.4. Prokoagulan Aktivite	6
2.3. Trombosit Süspansiyonları	6
2.3.1. Random Bağış Trombosit Konsantresi	7
2.3.2. Aferez Trombosit Konsantresi	8
2.3.3. Trombosit Süspansiyonunda Kalite Kontrol	8
2.3.4. Trombosit Süspansiyonunda Kontaminasyon	9
2.3.4.1. Trombosit Süspansiyonunda Bakteriyel Kontaminasyonu	9
2.3.5. Stafilocoklar	10
2.3.5.1. Stafilococcus Aureus	11
2.3.6. Akış Sitometrisi	12
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	15
3.1. Çalışma Grubu	15
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	15
3.3. Yöntem	15
3.4. Akış Sitometrik Analiz	16
3.5. İstatistik	18
<b>BULGULAR</b>	19
4.1. Hazırlanan havuzlanmış trombosit süspansiyonlarının bakteri inokülasyonundan önceki akış sitometri ve Bactec kültür sonuçları	19
4.2. A torbalarının bakteri inokülasyonundan sonraki 1.gün akış sitometri ve Bactec kültür sonuçları	19
4.3. B torbalarının bakteri inokülasyonundan sonraki 5.gün akış sitometri ve Bactec kültür sonuçları	20
4.4. A ve B torbalarının bakteri inokülasyonundan sonraki 1. ve 5.gün akış sitometri sonuçları	20

<b>TARTIŞMA</b>	<b>25</b>
<b>SONUÇLAR</b>	<b>27</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>28</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>32</b>

## SİMGELELER ve KISALTMALAR

<b>ADP</b>	:	Adenozin Di Fosfat
<b>ATP</b>	:	Adenozin Tri Fosfat
<b>cAMP</b>	:	Siklik Adenozin Mono Fosfat
<b>FALS</b>	:	Forward Angle Light Scatter
<b>FDA</b>	:	Food and Drug Administration
<b>FITC</b>	:	Fluorescein isothiocyante
<b>DMSO</b>	:	Dimetil sulfoksit
<b>mL</b>	:	mililitre
<b>PMT</b>	:	Foto multiplier tüpler
<b>nm</b>	:	Nanometre
<b>µL</b>	:	Mikrolitre
<b>vWF</b>	:	Von willebrand faktör



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Akış Sitometrisinin Şeması	13
2.2. FALS/RALS Histogramında Periferik Kan Hücre Dağılımı	14
3.1 Akış sitometrik olarak bakteri varlığının gösterilmesi (a: negatif kontrol, b: pozitif kontrol)	17

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Trombosit Granüllerin İçerikleri ve İşlevleri	<b>4</b>
<b>2.2.</b> Trombosit Süspansiyonları ve İçerikleri	<b>7</b>
<b>2.3.</b> Florokromların saçılım ve emilim değerleri (nm)	<b>13</b>
<b>4.1.</b> $10^2$ S. aureus inokule edilen random bağış trombositlerin akış sitometri ve bactec kan kültür sonuçları	<b>21</b>
<b>4.2.</b> $10^6$ S. aureus inokule edilen random bağış trombositlerin akış sitometri ve bactec kan kültür sonuçları	<b>22</b>
<b>4.3.</b> $10^2$ bakteri inoküle edilen torbaların (A1-50) 1. gün değerleri	<b>19</b>
<b>4.4.</b> $10^6$ bakteri inoküle edilen torbaların (A11-100) 1. gün değerleri	<b>19</b>
<b>4.5.</b> $10^2$ bakteri inoküle edilen torbaların (B1-50) 5. gün değerleri	<b>20</b>
<b>4.6.</b> $10^6$ bakteri inoküle edilen torbaların (B1-50) 5. gün değerleri	<b>20</b>
<b>4.7.</b> $10^2$ ve $10^6$ S. aureus inokule edilen A ve B torbalarının akış sitometri değerleri	<b>21</b>

## GİRİŞ ve AMAÇ

Trombosit transfüzyonları günümüzde trombosit sayısında azalma ve/veya trombosit fonksiyonlarında bozulma ile giden çeşitli kanamalı hastalıkların tedavisinde ve/veya profilaksisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle malign hastalıkların tedavisinde izlenen yoğun kemoradyoterapilerden sonra açığa çıkan aplazi dönemlerinin en önemli destek tedavilerinin başında gelmektedir.

Trombosit süspansiyonları gönüllü bağışçılardan "tam kan alınması" veya "aferez yöntemi" ile elde edilmektedir. Alınan tam kan santrifüjasyon yöntemi ile komponentlere (eritrosit + plazma + trombosit) ayrılmaktadır. Bu şekilde elde edilen trombosit "random bağış trombosit" adı verilmektedir ve 1 üniteden elde edilen trombosit sayısı düşük olduğu için 6-8 tanesi havuzlanarak kullanılmaktadır. Aferез yönteminde ise trombosit özel cihazlar yardımı ile periferik kandan ayrıştırılmakta ve tek bir bağışçıdan terapötik sayıda (minimum  $3 \times 10^{11}$ ) trombosit toplanabilmektedir.

Elde edilen trombositler 5 gün süreyle saklanabilmektedir. Trombositlerin saklanabilmesi için gaz geçirgen özel torbalara alınmış olması, saklama boyunca hareketli ortamda (ajitator, rotator) ve normal oda ısısında ( $20-24^{\circ} C$ ) bulunması gerekmektedir.

Bilindiği gibi kan bakterilerin üremesi için uygun bir besiyeri özelliğini taşımaktadır. Bu nedenle kan ve kan komponentlerinin alınma ve hazırlanma aşamalarında asepsi ve kapalı ortam koşullarına uyulması büyük önem taşımaktadır. Ancak yine de alınan tüm önlemlere rağmen bakteri bulaşı olabilmekte ve bu durum farkedilmez ise transfüzyon sonrası yaşamı tehdit eden ağır septik tablolar izlenebilmektedir. Kan komponentlerin güvenliğinde önemli ilerlemeler olmasına rağmen transfüzyonla birlikte bakteri infeksiyonun görülmesi hala çözümlenmemiş bir problem olarak görülmektedir (1). Kan komponentlerine bağlı olarak bakteriler farklı büyüme kinetiği gösterirler. Plateletler  $22^{\circ} C$  de oda ısısında saklandığı için eritrositlerden daha çok bakteri üremesi beklenir (1). Eritrositler normal koşullar altında  $+4$  derece ısıda saklandığı için bu ısı birçok bakterinin üremesi için uygun değildir. Ancak trombositlerin oda ısısında saklanması bakteriyel kontaminasyon varlığında üreme olasılığını arttırmaktadır. Bu nedenle trombosit transfüzyonlarından sonra septik olgulara eritrositlere göre daha sık rastlanmaktadır.

Trombosit süspansiyonlarında kontaminasyon oranı yaklaşık 1/500 olarak bildirilmekte ve 1/4000 oranında septik tablo rapor edilmektedir (2,3). Havuzlanan random bağış trombositlerinde bağışçı sayısı ve manüplasyon oranı yüksek olduğundan aferез trombositlerine göre daha sık kontaminasyonla karşılaşmaktadır (4,5). Trombosit saklama süresinin 4 günü aşması da riski önemli ölçüde arttırmaktadır (4,5).

Trombosit süspansiyonundaki bakteri varlığının belirlenmesi transfüzyon tıbbında hala problem olarak görülmektedir. Bakterinin belirlenmesi için birkaç teknoloji geliştirilmiştir.Scansystem<sup>TM</sup>, FACS ( fluorescenceactivated cell corting)ve NAT (Nucleid acid Amplification Technology) gibi hızlı belirleme metodları bakteri süspansiyonundaki bakteri varlığının belirlenmesi için bir fırsat sunar.Bu teknolojilerle bakteri varlığının belirlenmesi birkaç dakika veya saat kısaltılmaktadır (6).

Kan ürünlerindeki en önemli enfeksiyon riski bakteri ile kontaminasyondur.Özellikle trombositler 20-24<sup>0</sup> C de saklandığı için bu risk daha fazla artmaktadır.Ayrıca bakterilerin üremesi için büyüme ortamıdır.Trombosit transfüzyonundan sonraki septik reaksiyonların riski yaklaşık 1:15,000 ve 1:100,000 dir. %16-26,5 ise ölümcüldür.Trombosit süspansiyonlarında Staphylococcus epidermidis, S. Aureus, Bacillus cereus ve Propionibacteria gibi birçok bakteri tanımlanabilir (6).

Trombosit süspansiyonlarında renk değişikliği, pıhtılaşma, partikül varlığı gibi makroskopi bulgular bakteriyel kontaminasyon olasılığını düşündürmekle birlikte bir çok olguda bu bulgular izlenememektedir. Bu nedenle bakteriyel kontaminasyonun gösterilmesi için çeşitli otomatik kültür sistemleri (Bact/ALERT, Scansystem, vb.) kullanılmaktadır (7). Ek olarak gelişmiş ülkelerde riski en aza indirebilmek için tüm trombosit süspansiyonlarına fotokimyasal yöntemler yada ultraviole ışık yardımı ile sterilizasyon uygulamaları da yapılabilmektedir (8-10). Tüm bu yöntemler maliyet açısından pahalı olmaları yanında kültür yöntemlerinin zaman açısından da önemli dezavantajları olduğu açıktır.

Günümüzde akış sitometresi hematoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli kullanım alanları yanında akış sitometresi ile bakteri varlığının da gösterilmesi mümkündür. Pratik, hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması nedeni ile trombosit süspansiyonlarında akış sitometresi kullanılarak bakteri varlığının araştırılması yeni geliştirilmeye çalışılan bir yöntem olup bu konuda çok az sayıda yayın bulunmaktadır(11).

Akış sitometri kan bankacılığında yaygın olarak kullanılır. Trombosit süspansiyonlarında ve eritrositlerde lökositlerin değerlendirilmesinde, trombosit aktivasyon markırların ölçümünde ve trombosit süspansiyonlarında bakterinin ölçümü ve değerlendirilmesinde kullanılır (11).

Bu çalışmanın amacı random bağış trombositlerinde 24 saatlik 37 derecede inkübasyon sonrası erken dönemde akış sitometresi ile bakteri varlığını göstermeye çalışmak ve 5 günlük saklama sonrası otomatik kültür sistemleri ile korelasyonunu araştırmaktır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Trombositler

#### 2.1.1. Yapı

Trombositler megakaryositlerin fragmentasyonundan kaynaklanan 2-5 µm çapında, 0,5-1 µm kalınlığında, 5-7 µm<sup>3</sup> hacminde, nukleus içermeyen, bikonveks, yuvarlak yada hafif oval şeklinde olan hücrelerdir (12). Trombositler kemik iliğinin en büyük hücreleri olan megakaryositlerden meydana gelen ve periferik kandaki en küçük hücreler olduğu için kan pulcukları adı ile de anılan çok fonksiyonlu hücrelerdir (vasküler). Vücutta total 10<sup>12</sup> düzeyinde bulunmasına karşın dolaşan kandaki trombositler yaklaşık 7 mL kadar hacim oluşturmaktadırlar. Dolaşan trombositler total trombosit kitlesinin 2/3'ünü oluşturmakta olup olup, geri kalan 1/3'ü dalakta sekestre edilir ve her iki havuz denge halindedir (12). Dolaşan trombositlerin değişim oranı günde litrede 35x10<sup>9</sup> düzeyinde olup ortalama yaşam süreleri 7-10 gündür (13).

Trombositler içinde tüm aminoasitler bulunur. Trombositlerin nukleusu olamadığı halde bu aminoasitleri kullanarak protein sentezleyebilir. Protein sentezinin mitokondrial nukleik asitler sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Trombositlerin membranları sialik asidden zengindir. Bu trombosit yüzeyine (-) elektrik yük kazandırmaktadır.

Trombositler May Grünwald/Giemsa ile boyanan yaymalarda küçük, yuvarlak, bazen elonge, düzensiz parçacıklar olarak görülürler. Azurofilik mor granülasyon, yaklaşık 30 lekeden ibaret olarak mavi sitoplazmadan ayrımlanabilir. Aktivasyon başladıktan sonra granüller santralize olur ve sitoplazma homojen bir hal alır (13). Granüller elektron mikroskopunda yuvarlak şekilli, yaklaşık 300 nm boyutlarında, tek bir membranla çevrili birer yoğunluk olarak görülürler.

#### 2.1.1.1. Trombosit Granülleri

Alfa granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomlar olmak üzere 3 tip granül tanımlanmıştır. Bunların içerikleri ve işlevleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

**Alfa Granüller:** Alfa granüller trombositlerdeki azurofilik granüllerin yaklaşık %85'ini oluştururlar. Alfa granüllerin içerdiği çok sayıdaki substans iki grup halinde toplanabilir. İlk grup spesifik trombosit proteinlerini, ikinci grup ise plazma ya da doku moleküllerini içerir. Bunlar, ya prokoagülan etki göstererek, ya trombositlerin adezyon ve agregasyonlarını uyararak, ya da onarım süreçlerini hızlandırarak hemostaz aktivatörü işlevi gösterirler. Bu faktörler, salıverme fazı sırasında trombositlerden çevre ortama salınırlar (13). 'Grey trombosit syndrome' olarak bilinen, agregasyon yitimi ve hemorajik diyatezle sonuçlanan tabloda trombositlerde alfa granül eksikliği söz konusudur (14).

**Yoğun Granüller:** Tüm granüllerin %10'unu kapsar. Tipik olarak, veziküler membrandan belirgin bir halo ile ayrılan opak partiküller olarak görülürler. Merkezi

**Tablo2.1.** Trombosit granüllerinin içerikleri ve işlevleri

---

<b>ALFA GRANÜLLER</b>	
<b>1.Spesifik Proteinler</b>	
<b>PF-4</b>	heparinin nötralizasyonu adezyonun ve agregasyonun uyarılması bazofillerden histamin salıverilişinin uyarılması nötrofil, monosit ve fibroblastlar üzerine kemotaktik etki lökosit elastazın aktivasyonu kollejenaz inhibisyonu çeşitli glikozaminoglikanların fiksasyonu
<b>β-TG</b>	antiheparin etki fibroblastlar üzerine kemotaktik etki (PGI <sub>2</sub> sentez inhibisyonu)
<b>PDGF</b>	fibroblast ve düz kas hücrelerinin çoğalmasının uyarılması Nötrofil, monosit, fibroblast ve düz kas hücrelerine kemotaktik etki
<b>Trombospondin</b>	agregasyon ve fibrin oluşumu Hücre-hücre etkileşimi Hemaglutinasyon
<b>2.Plazma ya da Doku Molekülleri</b>	
<b>Fibrinojen</b>	agregasyon ve koagülasyon
<b>Faktör V</b>	koagülasyon
<b>VWF</b>	adezyon
<b>Fibronektin</b>	adezyon
<b>Trombospondin</b>	adezyon ve agregasyon
<b>Epinefrin</b>	vazokonstriksiyon ve agregasyon
<b>Plazminojen</b>	fibrinoliz
<b>HMWK</b>	yangı, koagülasyonun aktivasyonu

---

### **YOĞUN CİSİMCİKLER**

<b>ADP</b>	adezyon ve agregasyon
<b>ATP</b>	enerji deposu
<b>Kalsiyum</b>	şekil değişikliği, hareket, PG sentezinin aktivasyonu, koagülasyonu
<b>Serotonin</b>	vazokonstriksiyon, agregasyon
<b>Antiplazmin</b>	koagülasyon

### **LİZOZOMLAR**

**Asit hidrolazlar** sikatrizasyon sırasında hemostatik pıhtının ortadan kaldırılması

partiküldeki yoğunluğun, oldukça bol miktarda kalsiyumun bulunmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumdan başka yoğun cisimcikler adenzin difosfat (ADP), adenzin trifosfat (ATP) ve serotonin gibi release sırasında salınan çeşitli maddeleri

depoladığı gibi, katekolaminler, pirofosfat ve ortofosfatları da içerir (14). Yoğun cisimcikler, endojen ADP salımına sekonder agregasyonun olmayışı ile karakterize Hermansky Pudlak sendromunda eksiktir (14).

**Lizozomlar:** Daha az sayıda olup yalnızca asit fosfotaz, aril sülfataz gibi sindirici enzimlerden birinin varlığında gösterilebilir. Skatrizasyon sırasında hemostatik tıkaçın eliminasyonunda rolleri vardır.(14).

## 2.2. İşlev

Trombositlerin en önemli işlevi damarlarda zedelenme meydana geldiği zaman mekanik bir tıkaç oluşumunu sağlamaktır. Bunu adezyon, sekresyon, agregasyon ve progkoagülan özellikleri ile gerçekleştirirler.

### 2.2.1. Trombosit Adezyonu

Kan damarlarında oluşan hasar sonucu subendotelyal bağ dokusunun açığa çıkması ile trombositler bu bölgeye yapışırlar (adezyon). Trombositler ile damar duvarı arasında oluşan etkileşim sırasında birçok adezyon molekülü rol alır. Von Willebrand faktör (vWF) bir yandan subendotelyal mikrofiller ile bağlanırken diğer yandan trombosit membranındaki glikoprotein Ib (GPIb) ile bağlanır. GP IIB/IIIa reseptör kompleksi de trombositlerin vWF aracılığı ile damar duvarına yapışmalarını sağlayan ikinci bir bağlanma noktasını oluşturur. Subendotelyal bölgedeki kollajen moleküllerine yapışma ise GPIa aracılığı ile olmaktadır. Trombosit adezyonu sonrası oluşan bir dizi metabolik reaksiyon ile trombositlerde salıverme, şekil değişikliği ve agregasyon oluşumu başlamaktadır. Trombositler daha küresel bir şekil almaktadırlar ve uzun pseudopodlar oluşturarak trombosit-trombosit ve trombosit-damar etkileşimlerini arttırmaktadır (15,16).

### 2.2.2. Trombosit Salıverme (Release) Reaksiyonu

Trombositlerin kollojen ile karşılaşmaları ve/veya trombin etkisi ile granüllerde bulunan ADP, serotonin, fibrinojen, lizozomal enzimler, beta tromboglobulin ( $\beta$  TG), trombosit faktör-4 (PF4) gibi maddeler salıverirler.

Alfa granül glikoproteinleri ve bu proteinlerin salıverilişi, trombosit aktivasyonu için son derece duyarlı bir gösterge olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu substanslar yoğun granüllerin salıverilişi için gerekli uyarıdan daha düşük uyarı ile salıverilebilirler.

Ayrıca kollajen ve trombinin etkisi ile trombosit prostoglandin sentezi artar. Protein kinaz C aracılığı ile protein fosforilasyonunu aktive eden diaçilgliserol ve intrasellüler kalsiyum iyonlarının salınımına yol açan inosital trifosfat salıverilmesi oluşur. Ayrıca tromboksan A<sub>2</sub> (TX A<sub>2</sub>), cAMP düzeylerini düşürerek salıverme reaksiyonunu artırır (15,16).

### 2.2.3. Trombosit Agregasyonu

Ortama salınan ADP ve tromboksan A<sub>2</sub> ile hasarlı bölgede daha fazla sayıda trombositlerin agregasyonu gerçekleşir. Yeni katılan trombositler de aktive olarak daha fazla salıverme reaksiyonuna yol açarlar ve oluşan bu pozitif geri beslenme sayesinde hasarlı endotelial alanda yeterince büyük bir plak oluşumu sağlanır (15,16).

#### **2.2.4. Prokoagülan Aktivite**

Trombositlerin salıverme reaksiyonu ve agregasyonu takiben açığa çıkan trombosit faktör-3 koagülasyonun iki önemli basamağında rol oynamaktadır. Aktive faktör IX ve VIII ile birlikte faktör X aktivasyonunda rol alan trombosit faktör-3, aynı zamanda aktive faktör X ve V ile birlikte protrombinin trombine dönüştürülmesi basamaklarında yer almaktadır (15,16).

### **2.3. Trombosit Süspansiyonları**

Trombosit süspansiyonları hazırlanma şekillerine göre random bağış trombosit süspansiyonu ve aferez trombosit süspansiyonu olarak adlandırılmaktadır(17).

Transfüzyon amacıyla hazırlanan trombosit süspansiyonları ya rutin tam kan verildikten sonra ya da aferez sistemleri kullanılarak elde edilirler. Rutin tam kandan trombosit hazırlanması için ABD’de önce trombosit zengin plazma elde edilip bu ürünü santrifüj edilmesi yöntemi kullanılırken, Avrupa’da ise büyük ölçüde önce buffy coat elde edilmesi ve bunun resüspanse edildikten sonra santrifüj edilmesi yöntemi tercih edilmektedir. Bunlardan ilkinde ‘trombosit zengin plazma trombosit konsantresi’, ikincisine ise ‘buffy coat trombosit konsantresi’ denilmektedir. Bu iki tür ürüne ortak olarak yaygın bir şekilde ‘random bağış trombosit konsantresi’ denilmektedir. Hangi yöntemle hazırlanırsa hazırlansın bir ünite tam kandan elde edilen trombosit süspansiyonu ortalama bir erişkinde gerekli trombosit sayısı artışı için yeterli sayıda trombosit içermediği için bunların 4-6’sının bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bu şekilde birleştirilmiş random donör trombositlerine ‘havuzlanmış trombositler’ denilmektedir. Aferez sistemleri ile elde edilen trombosit konsantreleri ise tek bir vericiden elde edilmekte ve yaklaşık olarak havuzlanmış trombosit ürünündeki kadar trombosit içermektedir. Bu ürüne ‘aferez trombosit konsantresi’ veya ‘tek donör trombosit konsantresi’ adı verilir (tablo 2.2).



**Tablo 2.2.** Trombosit Süspansiyonları ve İçerikleri

<b>İçerdiği Ürünler</b>	<b>Aferez</b>	<b>Tek Ünite</b>	<b>Havuz -6 Ünite-</b>
Trombosit			
En az	3.0x10 <sup>11</sup>	0.55x10 <sup>11</sup>	3.3x10 <sup>11</sup>
Ortalama	4.2x10 <sup>11</sup>	0.70x10 <sup>11</sup>	4.2x10 <sup>11</sup>
Lökosit	1x10 <sup>6-7</sup>	7.5x 10 <sup>7</sup>	5x10 <sup>8</sup>
Eritrosit	Nadir	Değişken	<5 ml
Volüm (ml)	200-300	50-70	300
HLA uygunluğu	Evet	Evet	Hayır

Trombosit süspansiyonlarının transfüzyonunda belirleyici özellikler; hastanın trombosit sayısı, klinik tablosu, kanama varlığı ve hastanın kendi trombositlerinin fonksiyonel durumudur. Transfüzyon; kanama varlığında terapötik amaçla veya profilaksi amacı ile yapılabilir. Trombosit sayısının 20.000/μl'nin üstünde olduğu durumlarda ciddi derecede spontan kanama riski düşüktür. Ciddi düzeyde kanamalar genellikle trombosit sayısının 10.000/μl'nin altında, fatal kanamalar ise trombositler 5.000/μl'nin altında ise görülmektedir (17).

Trombosit süspansiyonu hazırlandıktan sonra iki yöntemle saklanır; ajitasyon (çalkalama) ve dondurma. Ajitasyon en sık kullanılan yöntemdir. Trombosit süspansiyonları 20-24<sup>0</sup> C'de, ikinci kuşak gaz geçirgen torbalarda sürekli çalkalanarak saklanır. Bu şekilde hem agregatlar önlenir, hem de trombositlerin plazma ile sürekli karışması sağlanır. Saklama süresi 5 gündür. Ajitasyon özel cihazlarla yapılmalıdır. Trombositler beşinci günün sonunda %20-25 oranında canlılığını kaybederler. Trombosit süspansiyonları bir miktar da plazma içerir. FV ve FVIII'de orta derecede azalma hariç, koagülasyon faktörleri aktivitesi iyi korunur; fakat pH azalır. Dondurma için kriyoprotektif olarak dimetilsulfoksit (DMSO) kullanılır. Hızlı eritmeden sonra trombositlerin canlılık oranı %50'ye düşer. Pahalı ve etkinliği az olan ve yaygın kullanılmayan bir yöntemdir (18).

### **2.3.1. Random Bağış Trombosit Konsantresi**

Gönüllü bağışçılardan alınan tam kan santrifügasyon yöntemi ile eritrosit, plazma ve trombosit komponentlerine ayrılır. Bu şekilde elde edilen trombosit 'random bağış trombosit' adı verilir. Bir üniteden elde edilen trombosit sayısı düşük olduğu için 6-8 tanesi havuzlanarak kullanılmaktadır.

Random bağış trombosit süspansiyonları bir ünite tam kandan santrifüjleme yöntemi ile hazırlanır. Bir ünitenin hacmi 50-70 ml olup içerisinde en az 5.5x10<sup>10</sup> trombosit bulunur. Random bağış trombosit süspansiyonları KİT hastalarında kullanılmadan önce sıklıkla lökositlerden arındırılır ve havuzlanırlar. Eğer havuzlanmışlarsa 4 saat içerisinde transfüze edilmelidirler. Random bağış trombosit süspansiyonu transfüzyonunda terapötik doz genel olarak her 10 kg için bir ünite random bağış trombosit süspansiyonu olarak belirlenir (normal bir erişkinde ortalama 5-7 ünite). 70 kg ağırlığında bir erişkinde bir ünite random bağış trombosit süspansiyonu trombosit sayısını 5.000/μl kadar artırır (18).

Bir ünite tam kandan hazırlanan trombosit konsantresi yaklaşık 50-70 ml plazma içerir. Modern tekniklerle trombosit sayısı  $0.8 \times 10^{11}$  çıkarılabilmektedir (19). ABD'de Food Drug Administration (FDA), test edilen ünitelerin %75'inde trombosit sayısının en az  $0.55 \times 10^{11}$  olmasını şart koymaktadır (20).

Random bağış trombosit konsantresi ikinci jenerasyon torbalarda 5 güne kadar saklanabilir. Trombositlerin saklanabilmesi için gaz geçirgen özel torbalara alınmış olması, saklama boyunca ajitatör veya rotator gibi hareketli ortamda ve normal oda ısısında ( $20-24^{\circ}C$ ) bulunması gerekmektedir.

### **2.3.2. Aferez Trombosit Konsantresi**

Aferez trombosit süspansiyonlarına tek bağışçı trombosit süspansiyonlarında denilir ve bir bağışçıdan sitaferez prosedürü ile toplanan bu kan ürünü en az  $3 \times 10^{11}$  trombosit içerir. Bu sayı 6 ünite random bağış trombosit süspansiyonunun içerdiği trombosit sayısı kadardır. Komponent içinde 200 ml kadar plazma bulunur. Aferez trombosit süspansiyonunda bulunan lökosit ve trombosit miktarı kullanılan aferez tekniğine bağlıdır (21). Yeni tekniklerle toplanan bazı tek bağışçı trombosit süspansiyonları lökositten son derece fakirdirler. Bir ünite tek bağışçı trombosit süspansiyonu 70 kg erişkin bir hastada trombosit sayısını ortalama olarak 30.000/ $\mu$ l arttırır.

Gönüllü bağışçılardan trombosit özel cihazlar yardımı ile periferik kandan ayrıştırılmakta ve tek bir bağışçıdan terapötik sayıda (minimum  $3 \times 10^{11}$ ) trombosit toplanabilmektedir. Bir ünite aferez trombosit konsantresi 200-300 ml plazma içinde  $3.0 \times 10^{11}$  ila  $6.5 \times 10^{11}$  trombosit içermektedir (20). FDA standartlarına göre test edilen örneklerin %75'inde aferez trombosit konsantrelerinin en az  $3 \times 10^{11}$  trombosit içermesi gerekmektedir (20).

Bir aferez trombosit ünitesi yaklaşık olarak tam kandan hazırlanan 6 üniteye eşdeğer miktarda trombosit içermektedir. İyi bir ürün elde edildiğinde orijinal aferez ünitesi ikiye ayrılabilir. Bu durumda her bir ünitenin bağımsız olarak minimum standartları karşılaması gerekir (22).

Aferez trombosit konsantresi kullanılan setin özelliğine göre 3 veya 5 gün saklanabilir (23).

### **2.3.3. Trombosit Süspansiyonunda Kalite Kontrol**

Taze ve oda ısısında ajitatörde beklemekte olan trombosit süspansiyonlarından alınan örneklerde canlılık, ışık mikroskobu veya elektron mikroskop altında morfoloji çalışmaları, sitokin miktarları, trombosit fonksiyonları çalışılabilir.

Tam kandan açık sistemle hazırlanan trombosit süspansiyonlarının 24 saat içinde kullanılması gerekirken, kapalı sistemde hazırlanan ürünler plastik ve gaz geçirgen torbalarda oda sıcaklığında ( $20-24^{\circ}C$ ) hafif ajitasyon altında 5 gün saklanabilir.

Trombosit süspansiyonlarında eritrosit ve lökosit bulunması, alloimmünizasyon, enfeksiyon bulaşı, nonspesifik immün süpresyon, febril non hemolitik reaksiyonlara yol açabilir. Trombosit süspansiyonlarına karışmış lökositleri arındırma işlemi cihazın kendi özellikleri arasında bulunabilir. Ayrıca aferez işleminden hemen sonra kan bankasında lökosit filtreleri kullanılabilir veya hasta başında lökosit filtrasyonu yapılabilir. Bu metodlarla lökositle beraber %4-18 oranında trombosit kaybı da oluşur. Ürünün ışınlanmasında bir lökodepleksiyon metodudur. Avrupa Topluluğu lökodepleksiyon kriterlerine göre elde edilen ürünlerin %75'inde her  $3 \times 10^{11}$  trombosit miktarı için karışması en fazla  $5.0 \times 10^6$  olmalıdır(24).

#### **2.3.4. Trombosit Süspansiyonunda Kontaminasyon**

Virüsler başta olmak üzere bakteriler, parazitler, riketsiyalar ve funguslarda az da olsa transfüzyonla bulaşır (25).1998-2000 yılları arasında Amerikan Association of Blood Banks (AABB) ve Control of Disease Centre (CDC) ortak çalışmalarında tek donör trombosit yöntemiyle elde edilen trombositlerin transfüzyonu ile 9.98 (olgu/milyon ünite), random bağış trombosit yöntemiyle elde edilen trombositlerin transfüzyonuyla 10,64 (olgu/milyon ünite), eritrositlerin transfüzyonu ile 0,21 (olgu/milyon ünite) olguda bakteriyemi saptanmıştır (26).%0,2-0,5 oranında olan kan ve kan ürünleriyle bakteriyel bulaş, bağışçıda asemptomatik enfeksiyon sonucu (brucelloz, salmonellaz, spiroket enfeksiyonları gibi) veya geçici bakteriyemi sonucunda (stafilokok, streptokok, pseudomonas spp., citrobakter spp. gibi ) gelişebilir (27).

Kanda bakteriyel kontaminasyonun kaynağı her zaman kolaylıkla tanımlanamamıştır. Kaynak bazen septik bölümde tanımlanan, vericinin kolundan veya kan toplama torbasının yüzeyinde bulunan organizmanın tesadüfı olarak bulaşı gösterilebilir. Bakteriyel kontaminasyonun kaynağına deri, kan, tek kullanımlık malzemeler ve çevresel etkenler dahil edilir.

Trombosit konsantrelerinin saklama koşullarından dolayı bakterinin geniş çeşitlilikte büyümesini sağlar. Trombosit süspansiyonlarındaki kontaminasyonun %4-72 olduğu rapor edilmiştir (27).

Bakteriyel etkenlerden Trepanoma pallidum'un buzdolabında 72 saati geçen kanlarda infektivitesini kaybettiği kabul edilir; ancak spiroket miktarı kanda fazla ise 6 güne kadar canlı kaldıkları ileri sürülmüştür (28).

##### **2.3.4.1. Trombosit Süspansiyonunda Bakteriyel Kontaminasyon**

Kan komponentlerinde bakteriyel kontaminasyonuna verici bakteriyemi, tam kan toplanması sırasındaki kontaminasyon, kan toplama torbasının kontaminasyonu ve kan komponentlerini ayırma sırasındaki kontaminasyon neden olur.

Bakteri içeren kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu sonucu ortaya çıkan sepsis, nadir olan bir olay olmasına karşın ölüm riski taşıması önemini arttırmaktadır. Bakteriler virüs ve parazitlere göre kan ve kan ürünlerini daha çok kontamine ederler. Kan ürünlerinin bakterilerle kontaminasyon riski yaklaşık %0,2-0,5'tir. Büyük kısmında bakteri sayısı az olduğu için klinik bulgu ortaya çıkmayabilir. Fransa'da

trombositopeni nedeniyle trombosit süspansiyonu verilenlerde risk diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur (29).

Kan toplanması sırasındaki kontaminasyon trombosit süspansiyonlarında bakteri kontaminasyonun en büyük nedenidir. Kontaminasyon ya ürünün hazırlanması aşamasında veya bağışçıda bakteriyemi sonucunda oluşabilir. Kan torbalarının, antikoagülan-koruyucu sıvıların veya kan alım setlerinin kontaminasyonu sonucu ortaya çıkabilir. Yetersiz deri antisepsisi nedeniyle bağışçının deri florası veya flebotomi bölgesindeki biele cilt lezyonundan kaynaklanan kontaminasyondanda kaynaklanabilir. Ayrıca bileşen hazırlanması sırasında kanın santrifüjlenmesi, bileşenlere ayrılması veya saklanması sırasında laboratuarda kontaminasyon oluşabilir. Başlıca asemptomatik enfeksiyon, küçük cerrahi girişimler, diş çekimi, apse drenajı, endeskopi gibi olaylar sonucu bağışçıda bakteriyemi oluşabilir. Diş enfeksiyonları, küçük apseler, diyare gibi olaylara bağlı olarak bağışçı kanında bakteriyemi oluşur ve bağışçıdan alınan kan kontamine olabilir. En riskli ürün trombosit süspansiyonudur. Kontaminasyon hazırlanma sırasında oluşabilir ve kontamine ürün oda ısısında saklandığından dolayı kolayca üreyebilir. Genel kontaminasyon oranı %5 dolaylarındadır.

Trombosit süspansiyonuna bulaşmış *Staphylococcus* spp. (%42), *Escheriche coli* (%9), *Bacillus* spp. (%9), *Salmonella* spp. (%9), *Streptococcus* spp. (%12), *Serratia* spp. (%8), *Enterobacter* spp. (%7-0) ve diğer organizmalar (%4) dahil organizmalar tanımlanmıştır. Yaklaşık olarak organizmaların %56'sı gram pozitif ve çoğu aerob olarak tanımlanmıştır (30).

Trombosit süspansiyonları alıcıya bakterinin geçişinden sorumludurlar. Daha önce yapılan çalışmalar İngiliz kan komponentlerinde Ulusal Bakteriyoloji Laboratuvarı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel kontaminasyon oranı havuzlanmış random trombosit süspansiyonunda (191'de bir) %0,5 ve aferez trombosit süspansiyonunda (436'da bir) %0,2 olarak bulunmuştur (31).

Kan ve kan ürünlerinin saklanma süresi uzadıkça kontaminasyon riskide artmaktadır. Bu nedenle ABD'de trombosit süspansiyonlarının saklama süresi 1986'da 7 günden 5 güne indirilmiştir.(kurs) 1980'li yıllarında trombosit süspansiyonları 7.gün sonuna kadar saklanmaktaydı. Bununla beraber FDA sepsis ve bakteriyel kontaminasyon sıklığının artmasından dolayı 5 gün saklanmasını uygun görmüştür.

### **2.3.5. Stafilokoklar**

Gram-pozitif kok morfolojisindeki bakterilerin önemli bir bölümü içinde bulunduran *Micrococcaceae* familyasında *Micrococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus* ve *Syomatococcus* cinsleri yer alır. Stafilokoklar katalaz pozitif, gram pozitif koklar içinde primer olarak klinik öneme sahip olan genus içindedirler. *S. aureus* stafilokoklar içinde en viralan turdur. Koagulaz negatif stafilokoklardan da insanda en fazla enfeksiyona neden olanlar *S. Epidermidis*, *S. Haemolyticus*, *S. Saprophyticus* ve *S. Lugdunensis*'dir (32).

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. 1880 yılında Ogston tarafından 'mikrokoklar, aktiviteleri düşük ve yayılma alanları sınırlı olduğunda yüzeysel supuratif inflamasyona yol açan, ancak etkinlikleri daha fazla olursa ve yayılma olanağı bulurlarsa septisemi ve pyemi oluşturan mikroorganizmalardır' şeklinde patojen olduğu söylenmiştir. Bu tanımın üzereinden geçen yıllara ve bilimdeki gelişmeler rağmen S. aureus halen tehlikeli bir patojen olma özelliğini göstermektedir. Hastane ve toplum kökenli S. aureus infeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmaktadır. Çoklu ilaç dirençlerinden dolayı tedavisi güçleşmektedir (33).

Stafilokoklar deri ve mukozal yüzeylerin normal florasında bulunmaktadır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık olarak %15'i devamlı olarak S. Aureus taşıyıcısıdır. Bu oran hastanede yatan hastalarda, sağlık çalışanlarında, diabet, egzema ve ilaç bağımlılığı gibi durumlarda daha yüksektir. Toplumun %60'ı ise belirli aralıklarla burunlarında S. aureus taşırlar (34,35).

Stafilokoklar 0,5-1,5 µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, katı besiyerinde birbirine bakan iki dik yüzeyde bölünerek üreyen ve yavru hücrelerin birbirinden ayrılması sonucu üzüm salkımına benzeyen, sıvı besiyerinde diplokoklar veya kısa zincirler halinde görülen mikroorganizmadır (32,36).

Stafilokokların üreme ısı aralığı oldukça geniştir (6.5°C-45°C).Optimal üreme ısıları 30°C-37°C'dir. pH:7-7,5 arasında iyi ürerler. Aerop ve fakültatif anaerob bakterilerdir.Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün yüzeyli, 1-4 mm çapında, hafif konveks S koloniler yaparlar. S. aureus kanlı agarda β-hemoliz yapar. Çukulata agarda da benzer şekilde ürerler (36).

#### **2.3.5.1. Staphylococcus Aureus**

Staphylococcus aureus, insan sağlığı için önemli bir patojendir. Ciddi ve hayatı tehdit edici enfeksiyonlar başta olmak üzere, birçok vücut bölgesindeki bakteriyel yangılardan sıklıkla soyutlanmasının yanında antibiyotik seçimi ve kullanımında bu mikroorganizmadaki yüksek ve geniş spektrumlu direnç nedeniyle sorunlar yaşanmaktadır (34).

Staphylococcus aureus sepsislerinde pulmoner tutulum yüksektir. Staphylococcus aureus enfeksiyonlarında klinik tablo aniden değişebilmekte ve hızla ilerleyerek komplikasyonlara yol açabilmektedir. Staphylococcus aureus pnömonilerinin %42'si 1 yaşın altındadır. 1 yaş altındaki pnömonilerde ise en sık patojen ajan staphylococcus aureustur (37).

S. aureus konak hücre morfoloji ve fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekzoenzim, membran-aktif protein (hemolizin ve lokosidinler), toksin üretme yeteneğine sahiptir. Bu toksinler sayesinde konak dokuda yayılım, invazyon, süperantijen özellikleriyle de toksik etki sağlar (36).

Staphylococcus aureus infeksiyonlarında en büyük risk faktörü bakterinin burundaki kolonizasyonu olmasına rağmen, S. aureus taşıyıcılığını belirleyen

faktörler tam olarak bilinmemektedir. S. aureus hem hastane hem de hastane dışında gelişen enfeksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. En sık deri enfeksiyonlarına neden olmakla beraber solunum sistemi enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit gibi değişik enfeksiyonlarda da rol oynamaktadır. Enfeksiyon oluşturma potansiyeli ve epidemiyoloji yapma riskleri nedeniyle taşıyıcılık halk sağlığı yönünden önemlidir. Antibiyotiklere kısa sürede direnç geliştirmesi tedavide önemli sorunlara yol açmaktadır (34-35).

S. aureus, değişik antibiyotiklere karşı farklı yollardan dirençli hale gelebilir. Genetik olarak çok yönlü olmaları, bu direncin altyapısının oluşmasında önemli rol oynar(34). Yüksek antibiyotik direnci, tedavi başarısını azaltırken, hastaların mortalite, morbidite ve hastanede yatış sürelerinin artışına neden olmaktadır (38).

S. aureus'a bağlı kan-dolaşımı enfeksiyonu insidansı giderek artış göstermektedir. Hastanede kazanılmış bakteriyemi ve toplumdan kazanılmış bakteriyemi olarak iki grupta incelenebilir. Hastaneden kazanılmış bakteriyemi, hastaneye yatıştan 2 günden sonra kazanılan bakteriyemidir. Toplumdan kazanılmış bakteriyemi, hastaneye yatışın ilk 2 gününde veya başvuru esnasında saptanan bakteriyemidir. Bu iki bakteriyemi birbiriyle giderek örtüşmeye başlamıştır. Bu yüzden 'toplum başlangıçlı bakteriyemi' olarak adlandırılabilir (36).

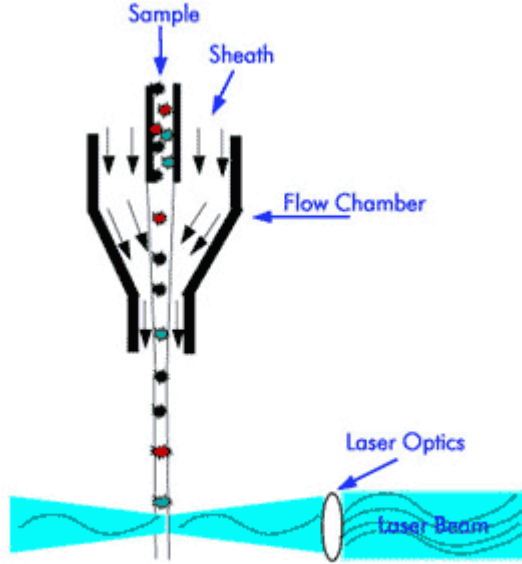
### **2.3.6. Akış Sitometrisi**

Akış sitometrisi, temel olarak hücrelerin büyüklüğüne, vizkozitesine ve granülaritesine bağlı olarak tek hücre seviyesinde araştırma imkanı sağlamaktadır (39). İlk olarak kan hücrelerin sayımı 1934'te Moldovan tarafından fotoelektrik alıcının geliştirilmesi ile başlamıştır. Modern akım sitometri, bilgisayar teknolojisi, optik ve elektronik alandaki teknik gelişmeler, monoklonal antikorların üretimi, sitokimyasal boyamalar ve florokrom kimyasındaki gelişmelerin birarada uygulaması sonucu ortaya çıkmıştır (39).

Akış sitometrisi birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), ışık kaynağı (lazer kaynağı), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik sinyal ve elektrik sinyalleri), bilgisayar (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizması (cell sorting) dir (40).

Akış sitometrisi ile bir örneğin analizinde hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve hücrelerin florokrom boyalarla konjuge edilmiş monoklonal antikorlar ile işaretlenmesi ana kuraldır (şekil-1). Süspansiyon halindeki işaretli hücreler ve partiküller (mikroorganizmalar, kromozomlar ve hücreler) hava basıncı ile Sheath fluid içinden geçirilir. Sheath fluid içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturur ve bu basınç ile hücreler cam veya quartzdan yapılmış akış kabini (flow chamber) ne gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı, hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlamaktadır ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığından geçerek görünür hale gelirler. Bu geçiş esnasında hücreye bağlı florokrom aktiflenir ve bu enerjiyle ışın yayar (şekil-2.1). Bu yayılan ışının yoğunluğuna göre hücre boyutu iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir. Aktiflenme sonucu ortaya çıkan floresan fotodiodlarla

toplanır, Foto Multiplier Tüpler (Photo Multiply Tubes PMT's) ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara iletilir (41).



Şekil-2.1: Akış Sitometrisinin Şeması

Akış sitometrisinde lazer kaynağı olarak; argon iyonu, crypton, helium-cadmium, helium-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. İşaretlemede kullanılan proplar (floresan bağlı monoklonal antikor veya kromofor) lazer ışığı ile aktive olduklarından ışın yayarlar ve bu sayede dedekte edilebilirler. Genellikle lazer kaynağı olarak argon iyonu kullanılır ve fluorescein isothiocyanate (FITC), propidium-iodide (PI), ethidium-bromide, acridine orange, phycoerytrin (PE)'in 488 nm'de aktivasyonu sağlanır. Bu propların emisyonları farklıdır. 2 renkli immünfloresan boyamalarda genellikle yeşil floresan veren FITC ve kırmızı floresan veren PE kullanılmaktadır (42). FITC, FL1 (Floresan Işın- Fluorescent Light) filtre tarafından emilirken PE' de FL2 filtre tarafından emilmektedir (tablo2.3).

Tablo 2.3. Florokromların saçılım ve emilim değerleri (nm)

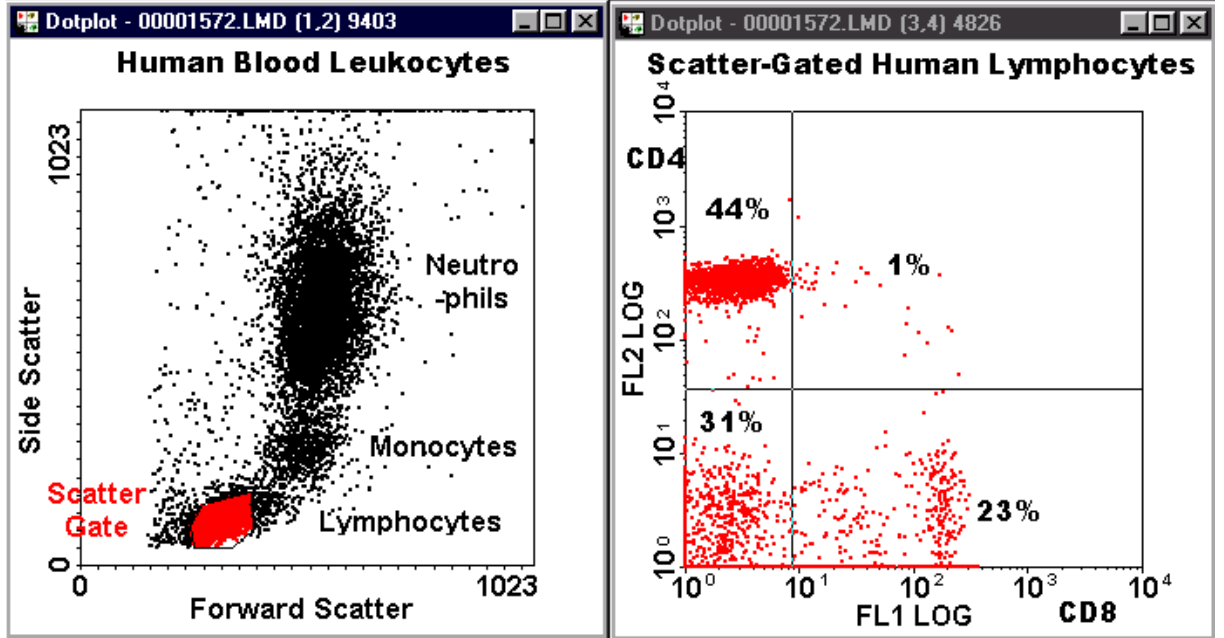
Florokrom	Saçılım	Emilim
FITC	468-505	504-541
PE	486-575	568-590

Akış sitometrisinde 4 fotodedektör vardır; Forward Angle Light Scatter (FALS), Right Angle Light Scatter (RALS), yeşil floresan ve kırmızı floresan. Forward Scatter (FS,FALS) önden saçılımı sağlar ve hücre boyutunu yani büyüklüğünü gösterir.Side Scatter (SS,RALS) ise yandan saçılımı sağlar ve iç yapıyı yani granülariteyi gösterir. Bu bilgiler, bilgisayar yardımı ile histogramlar şeklinde

kolere edilerek incelenebilmektedir. Hücreler tek sıra halinde alıcıların önünden geçtiği için, çok kısa bir süre içinde binlerce hücrenin her birinin özellikleri tek tek kaydedilmektedir. Histogramlar üzerinde büyüklük ve granülitelerine (FALS/RALS) göre değişik alanlarda toplanan hücre popülasyonlarını seçerken kapılama işlemi için Gate veya Bitmap kullanılır. Gate ile ilgili popülasyon monitörde rectilinear şekilde işaretlenirken Bitmap ile oval veya poligonal şekilde işaretlenir (42).

Floresan ile bağlanmış monoklonal antikorlar kullanılarak incelenen hücrelerin üzerindeki antijenik yapılar tanınabilmektedir. Böylece hücre yüzey işaretleri saptanarak normal veya patolojik hücrelerin tiplendirilmesi yapılabilmekte ve hastalık durumlarında tedavilere verdikleri yanıtlar monitörize edilebilmektedir. Akış sitometrisi ile süspansiyon haline getirilebilen her hücre popülasyonu üzerinde çalışma yapmak olasıdır.

FALS/RALS histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Örneğin periferik kanda lenfositler büyüklük bakımından küçüktür ve az granülarite gösterirler, monositler orta büyüklükte ve orta granülarite gösterirken, granülositler ise hem büyük hem de granülarite açısından diğerlerinden daha büyük ve daha fazla granülariteye sahiptirler (şekil-2.2)



Şekil-2.2 : FALS/RALS histogramında periferik kan hücre dağılımı



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kan Bankası ve Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kan bankasına gelen gönüllü bağışçılardan alınan tam kan, santrifügasyon yöntemiyle komponentlerine ayrılarak random trombosit süspansiyonları elde edilmiştir. Elde edilen random trombositlerin 4 tanesi havuzlandıktan sonra bu çalışmada havuzlanmış 100 adet random bağış trombosit kullanılmıştır. Bağışçılardan elde edilen trombosit süspansiyonları sadece çalışma için kullanılmıştır. Herhangi bir şekilde hastalara transfüze edilmemiştir. Trombosit süspansiyonlarının bakteri ile kontaminasyonu Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümüne sağlanan bakteriler ile gerçekleştirilmiştir. Analiz için Merkez Laboratuvarı Akış Sitometri Ünitesi'nde bulunan akış sitometri cihazı kullanılmıştır.

### 3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

#### Cihazlar

- Akış sitometresi (BD FacsCalibur)
- Bactec otomatik kültür cihazı
- Trombosit saklama dolabı
- İnkübatör
- Vorteks
- Etüv

#### Malzemeler

- Thiazole orange
- Aerob kan kültür şişeleri
- Hücre eritici (lysing ) solusyon
- Akış sitometri analiz tüpü
- Transfer torba

### 3.3. Yöntem

Gönüllü bağışçılardan alınan kan santrifügasyon yöntemi ile komponentlerine ayrılarak random bağış trombositleri hazırlandı ve bunların 4 tanesi havuzlanarak havuzlanmış random trombositler elde edildi. Hazırlanan havuzlanmış random bağış trombositleri kapalı ortam koşullarında (steril birleştirici) 2 eşit torbaya (A ve B torbaları ) bölündü. Her iki grup torbalarının bakteri kontaminasyonu için *Staphylococcus aureus* kullanıldı. 0,5 Mcfarland bulanıklığında *S. aureus* süspansiyonu hazırlandı. Logaritmik dilüsyon yapılarak 0,5 Mcfarland bulanıklığında  $10^2$  ve  $10^6$  *S. aureus* süspansiyonu elde edildi. Hazırlanan random bağış trombositlerden 50 şer torbaya (A1-50 ve B1-50)  $10^2$ , diğer 50 şer torbaya (A51-100 ve B51-100) ise  $10^6$  *S. aureus* inokule edildi. A torbası normal koşullar altında (oda ısısı+ajitasyon) 1 gün, B torbası ise 5 gün süreyle saklandı. A torbalarında 1.gün ve B torbalarında 5. gün sonunda akış sitometri ile bakteri varlığı arandı ve örneklerde eş zamanlı aerob kan kültür şişelerinde kültür yapıldı.

Ayrıca pozitif kan kültürü örneklerinde kanlı besi yerine pasaj yapılarak bakteri boyaması yapıldı ve üreyen patojen ajanın cinsi belirlendi.

### **3.4. Akış Sitometrik Analiz**

A ve B torbalarından alınan örnekler BDFACS Calibur akış sitometrisinde tanımlanan 'lyse and wash' yöntemine göre hazırlandı. Trombositler bu yöntemde kullanılan lysing solusyonu ile parçalandılar. Bakteri varlığını göstermek içinde bakteri DNA'larını boyayan thiazole orange boyası kullanıldı. SSC versus FL1 histogramı ile seçili pozitif alanda (gating) bakteri varlığı tespit edildi.

A torbasının 24 saat ve B torbasının 5. gün sonunda alınan örnekten akış sitometri analiz için kullanılan çalışma tüplerine 50 µL konuldu. Üzerine 500 µL thiazole orange antikor ekendi. Örnekler 30 dk oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı. Takiben üzerine 1mL lysing solusyonu eklenerek 15 dk tekrar oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda inkübe edildi.

Akış sitometri ile bakteri varlığının tespiti için side scatter ve FL-1 (thiazole orange) histogramı kullanıldı. Bakteri içermeyen 20 örnek kullanılarak pozitif analiz alanı belirlendi. (şekil 3.1).



### **3.5. İstatistik**

İstatistik analizler SPSS hazır istatistik paket programı (SPSS for Windows, Version 15.0, SPSS Inc., U.S.A ) kullanılarak gerçekleştirildi. Değişik zaman dilimlerinde alınan örneklerde (sıfırncı gün, birinci gün ve beşinci gün sonunda ) akış sitometri cihazında trombositlerde bakteriyel kontaminasyonun analizinde ve bactec cihazında kan kültürlerinin sonuçlarının değerlendirilmesinde normal dağılıma uygunlukları değerlendirildi. Normal dağılımın sağlanamadığı durumlarda non-parametrik 'Mann Whitney U Test' kullanıldı. 0.05 den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### 4.1.Hazırlanan havuzlanmış trombosit süspansiyonlarının bakteri inokülasyonundan önceki akış sitometri ve Bactec kültür sonuçları

Çalışma için hazırlanan 100 adet havuzlanmış random bağış trombosit A ve B torbalarına kapalı koşullar altında ayrıldıktan hemen sonra alınan örneklerin tümünde akış sitometresi ile bakteri varlığı çalışıldı ve hiçbir örnekte bakteri varlığını gösteren pozitif analiz bölgesinde % 1 in üzerinde floresans yoğunluğu izlenmedi. Eş zamanlı Bactec kan kültür cihazında inkübasyon yapılan A ve B torbalarından 20 şer tanesinde herhangi bir üreme saptanmadı (Tablo 4.1 ve 4.2).

### 4.2. A torbalarının bakteri inokülasyonundan sonraki 1.gün akış sitometri ve Bactec kültür sonuçları

$10^2$  bakteri inoküle edilen torbaların (A1-50) hepsinde de 1.gün sonunda akış sitometresi ile pozitif analiz alanı içinde bakteri varlığı saptandı (Tablo 4.3). Bu örneklerde eş zamanlı yapılan Bactec kültürlerinin hepsinde üreme oldu. Üreyen mikroorganizmalardan hazırlanan pasajlarda bakterilerin S. Aureus olduğu saptandı.

**Tablo 4.3.**  $10^2$  bakteri inoküle edilen torbaların (A1-50) 1. gün değerleri

	ortalama n=50 %	ortanca n=50 %	std hata n=50 %	std. sapma n=50 %	minumum n=50 %	maksimum n=50 %
A(1-50)	12.16	11.50	0.55	3.89	5	22

$10^6$  bakteri inoküle edilen torbaların (A51-100) hepsinde de 1.gün sonunda akış sitometresi ile pozitif analiz alanı içinde bakteri varlığı saptandı (Tablo 4.4). Bu örneklerde eş zamanlı yapılan Bactec kültürlerinin hepsinde üreme oldu. Üreyen mikroorganizmalardan hazırlanan pasajlarda bakterilerin S. Aureus olduğu saptandı.

**Tablo 4.4.**  $10^6$  bakteri inoküle edilen torbaların (A11-100) 1. gün değerleri

	ortalama n=50 %	ortanca n=50 %	std hata n=50 %	std. sapma n=50 %	minumum n=50 %	maksimum n=50 %
A(51-100)	25.40	23.00	1.80	12.77	10	80

$10^6$  bakteri inoküle edilen torbaların bakteri oranlarının (median (min-max) % 23 (10-80))  $10^2$  bakteri inoküle edilen torbalardan (median (min-max) % 12 (5-22)) anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0.0001$ ).

#### 4.3. B torbalarının bakteri inokülasyonundan sonraki 5.gün akış sitometri ve Bactec kültür sonuçları

$10^2$  bakteri inoküle edilen torbaların (B1-50) hepsinde de 5.gün sonunda akış sitometresi ile pozitif analiz alanı içinde bakteri varlığı saptandı (Tablo 4.5). Bu örneklerde eş zamanlı yapılan Bactec kültürlerinin hepsinde üreme oldu. Üreyen mikroorganizmalardan hazırlanan pasajlarda bakterilerin S. Aureus olduğu saptandı.

**Tablo 4.5.**  $10^2$  bakteri inoküle edilen torbaların (B1-50) 5. gün değerleri

	ortalama n=50 %	ortanca n=50 %	std hata n=50 %	std. sapma n=50 %	minumum n=50 %	maksimum n=50 %
B(1-50)	43.06	43.00	1.46	10.34	19	58

$10^6$  bakteri inoküle edilen torbaların (B51-100) hepsinde de 5.gün sonunda akış sitometresi ile pozitif analiz alanı içinde bakteri varlığı saptandı (Tablo 4.6). Bu örneklerde eş zamanlı yapılan Bactec kültürlerinin hepsinde üreme oldu. Üreyen mikroorganizmalardan hazırlanan pasajlarda bakterilerin S. Aureus olduğu saptandı.

**Tablo 4.6.**  $10^6$  bakteri inoküle edilen torbaların (B1-50) 5. gün değerleri

	ortalama n=50 %	ortanca n=50 %	std hata n=50 %	std. sapma n=50 %	minumum n=50 %	maksimum n=50 %
B(51-100)	57.36	53.50	2.57	18.18	28	94

$10^6$  bakteri inoküle edilen torbaların bakteri oranlarının (median (min-max) % 54 (28-94))  $10^2$  bakteri inoküle edilen torbalardan (median (min-max) % 43 (19-58)) anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0.0001$ ).

#### 4.4. A ve B torbalarının bakteri inokülasyonundan sonraki 1. ve 5.gün akış sitometri sonuçları

$10^6$  bakteri inoküle edilen B torbaların (B51-100) 5.gün bakteri oranlarının (median (min-max) % 54 (28-94))  $10^6$  bakteri inoküle edilen A torbalarının (A51-100) 1. gün değerlerinden (median (min-max) % 43 (19-58)) anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0.0001$ )(tablo4.7).

$10^2$  bakteri inoküle edilen B torbalarının (B1-50) 5.gün bakteri oranlarının (median (min-max) % 54 (28-94))  $10^6$  bakteri inoküle edilen A torbalarının (A1-50) 1. gün değerlerinden (median (min-max) % 43 (19-58)) anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ( $p<0.0001$ )(tablo4.7).

**Tablo 4.7.**  $10^2$  ve  $10^6$  S. aureus inoküle edilen A ve B torbalarının akış sitometri değerleri

	$10^2$		$10^6$	
	A(1-50)	B(1-50)	A(51-100)	B(51-100)
<b>ortalama</b>	12,16	43,06	25.40	53.36
<b>ortanca</b>	11,5	43,00	23.00	53.50
<b>std. Sapma</b>	3.88	10.34	12.76	18.17
<b>std. Hata</b>	0.55	1.46	1.80	2.57
<b>minimum</b>	5	19	10	28
<b>maksimum</b>	22	58	80	94

**Tablo 4.1.**  $10^2$  S. aureus inoküle edilen random bağış trombositlerin akış sitometri ve bactec kan kültür sonuçları

sıra	İnokülasyon öncesi		İnokülasyon sonrası 1. gün		sıra	İnokülasyon öncesi		İnokülasyon sonrası 5. gün	
	Akış Sitometri (%)	Bactec	Akış Sitometri (%)	Bactec		Akış Sitometri (%)	Bactec	Akış Sitometri (%)	Bactec
<b>A1</b>	0.14	negatif	9	pozitif	<b>B1</b>	0.11	negatif	38	Pozitif
<b>A2</b>	0.13	negatif	10	pozitif	<b>B2</b>	0.12	negatif	49	Pozitif
<b>A3</b>	0.12	negatif	15	pozitif	<b>B3</b>	0.13	negatif	44	Pozitif
<b>A4</b>	0.13	negatif	17	pozitif	<b>B4</b>	0.12	negatif	33	Pozitif
<b>A5</b>	0.05	negatif	6	pozitif	<b>B5</b>	0.05	negatif	19	Pozitif
<b>A6</b>	0.11	negatif	5	pozitif	<b>B6</b>	0.11	negatif	40	Pozitif
<b>A7</b>	0.17	negatif	8	pozitif	<b>B7</b>	0.15	negatif	53	Pozitif
<b>A8</b>	0.5	negatif	13	pozitif	<b>B8</b>	0.40	negatif	27	Pozitif
<b>A9</b>	0.55	negatif	12	pozitif	<b>B9</b>	0.51	negatif	43	Pozitif
<b>A10</b>	0.55	negatif	10	pozitif	<b>B10</b>	0.63	negatif	45	Pozitif
<b>A11</b>	0.32		11	pozitif	<b>B11</b>	0.35		40	Pozitif
<b>A12</b>	0.68		9	pozitif	<b>B12</b>	0.60		38	Pozitif
<b>A13</b>	0.85		12	pozitif	<b>B13</b>	0.76		42	Pozitif
<b>A14</b>	0.47		18	pozitif	<b>B14</b>	0.40		30	Pozitif
<b>A15</b>	0.03		13	pozitif	<b>B15</b>	0.05		50	Pozitif
<b>A16</b>	0.99		12	pozitif	<b>B16</b>	0.90		40	Pozitif
<b>A17</b>	0.13		8	pozitif	<b>B17</b>	0.14		30	Pozitif
<b>A18</b>	0.39		10	pozitif	<b>B18</b>	0.37		56	Pozitif
<b>A19</b>	0.15		12	pozitif	<b>B19</b>	0.13		45	Pozitif
<b>A20</b>	0.58		6	pozitif	<b>B20</b>	0.54		33	Pozitif
<b>A21</b>	0.20		10	pozitif	<b>B21</b>	0.20		24	Pozitif

A22	0.38		11	pozitif	B22	0.35		43	Pozitif
A23	0.28		15	pozitif	B23	0.25		57	Pozitif
A24	0.31		17	pozitif	B24	0.29		58	Pozitif
A25	0.67		6	pozitif	B25	0.59		33	Pozitif
A26	0.83		22	pozitif	B26	0.79		38	Pozitif
A27	0.06		14	pozitif	B27	0.09		55	Pozitif
A28	0.54		12	pozitif	B28	0.50		27	Pozitif
A29	0.05		18	pozitif	B29	0.08		56	Pozitif
A30	0.29		10	pozitif	B30	0.25		45	Pozitif
A31	0.55		9	pozitif	B31	0.52		40	Pozitif
A32	0.13		10	pozitif	B32	0.15		53	Pozitif
A33	0.19		16	pozitif	B33	0.17		35	Pozitif
A34	0.35		17	pozitif	B34	0.31		56	Pozitif
A35	0.34		15	pozitif	B35	0.37		45	Pozitif
A36	0.53		10	pozitif	B36	0.52		36	Pozitif
A37	0.17		11	pozitif	B37	0.15		43	Pozitif
A38	0.18		10	pozitif	B38	0.19		57	Pozitif
A39	0.45		11	pozitif	B39	0.49		58	Pozitif
A40	0.80		9	pozitif	B40	0.79		39	Pozitif
A41	0.35	negatif	13	pozitif	B41	0.39	negatif	55	Pozitif
A42	0.32	negatif	20	pozitif	B42	0.38	negatif	41	Pozitif
A43	0.23	negatif	15	pozitif	B43	0.27	negatif	58	Pozitif
A44	0.43	negatif	18	pozitif	B44	0.48	negatif	50	Pozitif
A45	0.23	negatif	13	pozitif	B45	0.28	negatif	31	Pozitif
A46	0.13	negatif	9	pozitif	B46	0.15	negatif	48	Pozitif
A47	0.12	negatif	10	pozitif	B47	0.15	negatif	58	Pozitif
A48	0.34	negatif	15	pozitif	B48	0.38	negatif	53	Pozitif
A49	0.24	negatif	18	pozitif	B49	0.28	negatif	34	Pozitif
A50	0.25	negatif	8	pozitif	B50	0.30	negatif	32	Pozitif

**Tablo 4.2.** 10<sup>6</sup> S. aureus inokule edilen random bağış trombositlerin akış sitometri ve bactec kan kültür sonuçları

sıra	İnokülasyon öncesi		İnokülasyon sonrası 1. gün		sıra	İnokülasyon öncesi		İnokülasyon sonrası 5. gün	
	Akış Sitometri (%)	Bactec	Akış Sitometri (%)	Bactec		Akış Sitometri (%)	Bactec	Akış Sitometri (%)	Bactec
A51	0.18	negatif	24	pozitif	B51	0.15	negatif	40	pozitif
A52	0.19	negatif	25	pozitif	B52	0.23	negatif	55	pozitif
A53	0.23	negatif	16	pozitif	B53	0.24	negatif	38	pozitif
A54	0.27	negatif	18	pozitif	B54	0.29	negatif	43	pozitif
A55	0.19	negatif	22	pozitif	B55	0.18	negatif	45	pozitif
A56	0.18	negatif	22	pozitif	B56	0.19	negatif	54	pozitif
A57	0.18	negatif	23	pozitif	B57	0.23	negatif	46	pozitif
A58	0.27	negatif	13	pozitif	B58	0.32	negatif	28	pozitif
A59	0.18	negatif	17	pozitif	B59	0.19	negatif	44	pozitif
A60	0.18	negatif	29	pozitif	B60	0.17	negatif	50	pozitif



<b>A61</b>	0.38		23	pozitif	<b>B61</b>	0.38		30	pozitif
<b>A62</b>	0.1		27	pozitif	<b>B62</b>	0.13		93	pozitif
<b>A63</b>	0.63		80	pozitif	<b>B63</b>	0.58		94	pozitif
<b>A64</b>	0.98		16	pozitif	<b>B64</b>	0.89		51	pozitif
<b>A65</b>	0.34		41	pozitif	<b>B65</b>	0.39		77	pozitif
<b>A66</b>	0.16		17	pozitif	<b>B66</b>	0.18		64	pozitif
<b>A67</b>	0.23		51	pozitif	<b>B67</b>	0.25		88	pozitif
<b>A68</b>	0.17		30	pozitif	<b>B68</b>	0.19		43	pozitif
<b>A69</b>	0.04		19	pozitif	<b>B69</b>	0.11		43	pozitif
<b>A70</b>	0.05		22	pozitif	<b>B70</b>	0.04		34	pozitif
<b>A71</b>	0.14		24	pozitif	<b>B71</b>	0.17		40	pozitif
<b>A72</b>	0.50		25	pozitif	<b>B72</b>	0.51		43	pozitif
<b>A73</b>	0.14		43	pozitif	<b>B73</b>	0.15		75	pozitif
<b>A74</b>	0.11		41	pozitif	<b>B74</b>	0.13		53	pozitif
<b>A75</b>	0.06		32	pozitif	<b>B75</b>	0.07		57	pozitif
<b>A76</b>	0.05		33	pozitif	<b>B76</b>	0.06		60	pozitif
<b>A77</b>	0.04		45	pozitif	<b>B77</b>	0.06		88	pozitif
<b>A78</b>	0.04		22	pozitif	<b>B78</b>	0.09		40	pozitif
<b>A79</b>	0.69		23	pozitif	<b>B79</b>	0.71		65	pozitif
<b>A80</b>	0.11		41	pozitif	<b>B80</b>	0.14		68	pozitif
<b>A81</b>	0.07		16	pozitif	<b>B81</b>	0.13		47	pozitif
<b>A82</b>	0.17		41	pozitif	<b>B82</b>	0.17		93	pozitif
<b>A83</b>	0.09		25	pozitif	<b>B83</b>	0.11		94	pozitif
<b>A84</b>	0.17		24	pozitif	<b>B84</b>	0.18		58	pozitif
<b>A85</b>	0.57		25	pozitif	<b>B85</b>	0.58		78	pozitif
<b>A86</b>	0.03		19	pozitif	<b>B86</b>	0.04		47	pozitif
<b>A87</b>	0.22		41	pozitif	<b>B87</b>	0.23		46	pozitif
<b>A88</b>	0.10		12	pozitif	<b>B88</b>	0.11		67	pozitif
<b>A89</b>	0.31		13	pozitif	<b>B89</b>	0.32		39	pozitif
<b>A90</b>	0.33		15	pozitif	<b>B90</b>	0.34		85	pozitif
<b>A91</b>	0.20	negatif	11	pozitif	<b>B91</b>	0.21	negatif	60	pozitif
<b>A92</b>	0.33	negatif	13	pozitif	<b>B92</b>	0.34	negatif	61	pozitif
<b>A93</b>	0.81	negatif	28	pozitif	<b>B93</b>	0.79	negatif	73	pozitif
<b>A94</b>	0.11	negatif	18	pozitif	<b>B94</b>	0.12	negatif	56	pozitif
<b>A95</b>	0.11	negatif	19	pozitif	<b>B95</b>	0.13	negatif	48	pozitif
<b>A96</b>	0.02	negatif	14	pozitif	<b>B96</b>	0.05	negatif	73	pozitif
<b>A97</b>	0.12	negatif	16	pozitif	<b>B97</b>	0.13	negatif	38	pozitif
<b>A98</b>	0.02	negatif	14	pozitif	<b>B98</b>	0.05	negatif	66	pozitif
<b>A99</b>	0.15	negatif	32	pozitif	<b>B99</b>	0.16	negatif	44	pozitif
<b>A100</b>	0.59	negatif	10	pozitif	<b>B100</b>	0.60	negatif	46	pozitif

Akış sitometri ile random bağış trombositlerinde *S. aureus* üremesinin belirlenmesinde birinci ve beşinci gün arasında farklılar gözlemlendi. Ayrıca  $10^2$  *S. aureus* inokule edilen ve  $10^6$  *S. aureus* inokule random bağış trombosit torbaları arasında anlamlı olarak fark gözlemlendi. Akış sitometri cihazında bakteri sayısı arttıkça random bağış trombositlerinde bakteri üremesi daha hızlı ve çabuk gözlemlenmesi arttı. Random bağış trombosit torbalarının *S. aureus* ile inkübasyon süresi uzadıkça akış sitometri ile analiz daha kolay gerçekleşti. Akış sitometri cihazı ile random bağış trombosit torbalarında daha kısa sürede bakteri belirlendi.

Bactec kan kültür cihazı ile random bağış trombositlerinde *S. aureus* belirlendi. *S. aureus* eklenmeden yapılan sıfırıncı gün sayımda aerob kan kültür şişesi 7 gün süre ile inkübasyon edildi. 7 gün sonrasında cihaz alarm vermedi ve sonuç negatif olarak belirlendi. *S. aureus* eklendikten sonra birinci günün ve beşinci günün sonunda yapılan analizde ise aerob kan kültür şişesi bir gün bekletildi. 24 saat sonra pozitif alarm verdi. Aerob kan kültür şişesinden alınan örnek ile kan kültür besiyerine pasaj yapıldı. Bir gün boyunca etüvde bekletildi. Kan kültür besiyerinde üreyen bakteri kolonisinden lama yayma yapıldı, gram boyama yapılarak mikroskop altında *S. aureus* türü belirlendi.

Bactec kan kültür cihazı ve akış sitometri cihazı ile random bağış trombosit torbalarında sıfırıncı günde bakteri üremesi negatif olarak bulundu. *S. aureus* eklendikten sonra ise bactec kan kültür cihazı 24 saatte pozitif sonuç verdi. Akış sitometri cihazı ise *S. aureus* üremesini yüzde olarak kısa sürede verdi. *S. aureus* sayısını arttırdığımızda akış sitometri cihazında *S. aureus* bakteri artışını görebiliyoruz.

## TARTIŞMA

Trombosit süspansiyonlarında renk değişikliği, pıhtılaşma, partikül varlığı gibi makroskopi bulgular bakteriyel kontaminasyon olasılığını düşündürmekle birlikte bir çok olguda bu bulgular izlenememektedir. Bu nedenle bakteriyel kontaminasyonun gösterilmesi için çeşitli otomatik kültür sistemleri (Bact/ALERT, Scansystem, vb.) kullanılmaktadır (7). Ek olarak gelişmiş ülkelerde riski en aza indirebilmek için tüm trombosit süspansiyonlarına fotokimyasal yöntemler yada ultraviyole ışık yardımı ile sterilizasyon uygulamaları da yapılabilmektedir (8-10). Tüm bu yöntemler maliyet açısından pahalı olmaları yanında kültür yöntemlerinin zaman açısından da önemli dezavantajları olduğu açıktır.

Günümüzde akış sitometresi hematoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli kullanım alanları yanında akış sitometresi ile bakteri varlığının da gösterilmesi mümkündür. Pratik, hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması nedeni ile trombosit süspansiyonlarında akış sitometresi kullanılarak bakteri varlığının araştırılması yeni geliştirilmeye çalışılan bir yöntem olup bu konuda çok az sayıda yayın bulunmaktadır(11).

Kan kültürü, sepsis ve bakteremilere yol açan mikroorganizmaların izole edilmesi amacıyla kullanılan önemli bir tanı yöntemidir(43). Çoğu zaman pozitif bir kan kültürü sonucu, klinisyeni doğrudan tanıya yöneltebilmektedir. Özellikle ampirik sağaltıma yol gösterici olması açısından, bakteremilere yol açan etkenlerin dağılımının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi önemlidir.

Bakteremi ve sepsis, yüksek mortalite ve morbiditeyle seyreden, erken tanı konulup tedavi edildiğinde mortalite oranlarının önemli ölçüde azaldığı bir klinik tablodur. Kan kültürü, bakteriyemi ve sepsise yol açan mikroorganizmaların soyutlanması amacı ile yaygın olarak kullanılan önemli bir tanı yöntemidir. Bakteriyemiye neden olan mikroorganizmaların dağılımında, zaman içinde değişiklikler gözlenmiştir. Hastanelerde endemik olarak bulunan mikroorganizmalar ve bunların antibiyotiklere duyarlılıklarının değişmesi bu değişikliklerin en önemli nedenlerindedir. Kan kültürünün değerlendirilmesinde çeşitli yöntemlerin kullanılması ile birlikte, pratik, zaman kazandırıcı olması ve kontaminasyon oranını en aza indiren otomatize sistemler, son yıllarda en iyi yöntemlerden biri olarak kan kültürlerinin değerlendirilmesinde oldukça sık kullanılmaktadır.

Trombosit süspansiyonları kan bankalarında oda ısısında saklanması gereken bileşenler olduğu için bir bulaş durumunda içinde bakteri üreme riski +4 derecede saklanan eritrositlerle kıyaslandığı zaman daha yüksektir. Günümüzde kullanımı giderek artan trombosit bileşenlerinde bakteriyel kontaminasyon riski büyük önem taşımakta ve bu bileşenin özellikle immünsistemi baskılanmış kişilerde sık kullanımı ise olayın ciddiyetini daha da arttırmaktadır.

Trombosit bileşenlerinde bakteri varlığının araştırılması için kültür yöntemleri kullanılabilir ancak günler sonra sonuç alınabilir olması bu yöntemin en büyük dezavantajını oluşturmaktadır. Bu nedenle kısa süre içerisinde sonuç verebilen akış sitometri yöntemi bu açıdan avantajlı gözükmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada da akış sitometrik yöntem ile bakteri inoküle edilen tüm ürünlerde 1. ve 5. günün sonunda bakteri varlığı saptanabilmiştir.

Sonuç olarak; akış sitometri ve bactec kan kültür cihazı random bağış trombositlerinde bakteriyel kontaminasyonun belirlenmesinde önemli bir yöntemlerdir. Ancak akış sitometri cihazı ile daha hızlı ve pratik şekilde bakteriyel kontaminasyon belirlenebilmesi önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

## SONUÇLAR

Bizim çalışmamızda random bağış trombositlerinde bakteriyel kontaminasyonun akış sitometri ile gösterilmesi çalışılmıştır. Bactec kan kültür cihazı ile karşılaştırma yapılmıştır.

Hazırlanan random bağış trombositlerine inoküle edilen *S. aureus*, 24. saat sonunda ve beşinci gün sonunda akış sitometri ve bactec kan kültür cihazı ile analiz edilmiştir. Akış sitometri ile analizde bakteri sayısı arttıkça bakteri miktarı daha iyi gösterilebilmektedir. Random bağış trombosit torbalarında bakteri inkübasyon süresi arttıkça da akış sitometri ile bakteri daha kolay ve kısa sürede belirlenebilmektedir.

Akış sitometri cihazı ile random bağış trombositlerinde bakteriyel kontaminasyon hızlı ve pratik bir şekilde gerçekleşmektedir. Bacrec kan kültür cihazı ise daha çok zaman isteyen bir yöntem olduğu söylenebilmektedir.

Akış sitometri ve bactec kan kültür cihazı random bağış trombositlerinde bakteriyel kontaminasyonun belirlenmesinde önemli bir yöntemlerdir. Ancak akış sitometri cihazı ile daha hızlı ve pratik şekilde bakteriyel kontaminasyon belirlenebilmesi önemli bir avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. M.Störmer, U. Cassens, K. Kleesiek & J. Dreier . Detection of bacteria in platelet concentrates prepared from spiked single donations using cultural and molecular genetic methods. *Transfusion Medicine*, 2007, 17, 61-70 .
2. Yomtovian, R, Lazarus, HM, Goodnough, LT, et al. A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets. *Transfusion* 1993; 33:902.
3. Morrow, JF, Braine, HG, Kichler, TS, et al. Septic reactions to platelet transfusions. A persistent problem. *JAMA* 1991; 266:555.
4. Dumont, LJ, AuBuchon, JP, Whitley, P, et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study. *Transfusion* 2002; 42:847.
5. Rock, G, Neurath, D, Cober, N, et al. Seven-day storage of random donor PLT concentrates. *Transfusion* 2003; 43:1374.
6. M. Schmidt, M.K. Hourfar, S.-B. Nicol, H.-P. Spengler, T. Montag & Erhard Seifried. *Transfusion Medicine*, 2006,16,355-361.
7. AuBuchon, JP, Cooper, LK, Leach, MF, et al. Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. *Transfusion* 2002; 42:855.
8. Picker, SM, Speer, R, Gathof, BS. Functional characteristics of buffy-coat PLTs photochemically treated with amotosalen-HCl for pathogen inactivation. *Transfusion* 2004; 44:320.
9. McCullough, J, Vesole, DH, Benjamin, RJ, et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004; 104:1534.
10. Van Rhenen, D, Gulliksson, H, Cazenave, JP, Pamphilon, D. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 2003; 101:2426.

11. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates. *Transfusion* 2006; 46:41-49
12. Maurice M, Pardonge-Lavenne E, Scheiff JM, et al. Blood Platelets, In: Hemostasis, Thrombosis and Atherosclerosis: Morphology, Physiology, Physiopathology and Pharmacology. Hologramme, 1998, pp 13-48
13. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, et al. Platelets and megakaryocytes, In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Ninth edition. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1993, pp 511-39.
14. Gogstad GO, Hagen I, Korsmo R, et al. Evidence for release of soluble, but not of membrane-integrated, proteins from human platelet alpha-granules. *Biochim Biophys Acta* 1982; 702:81-9
15. Knoll MH, Schafer AI. Biochemical mechanism of platelet activation. *Blood* 1989;74:1181-95.
16. Siess W. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;69:58-178.
17. R J. Benjamin, P. Rojas, S. Christmas, J. Neal, S. Broughton, C. Burgio, B. Barrett and W.H. Churchill. Plateletheresis efficiency: a comparison of the Spectra LRS and AMICUS separators. *Transfusion* 1999;39:895-899
18. British committee for standards in Hematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. *British Journal of Haematology* 2003;122:10-23.
19. Murphy Scott: Preservation and clinical use of platelet. In: *Williams Hematology*, Ed. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, McGraw-Hill Medical Publishing Division New York 2002 p.1905-16
20. Price HT. Provision of single-donor platelet transfusion: Patient and producer perspectives. In: *Apheresis Principles and practice of apheresis*, Ed. Mcleod BC, AABB press Bethesda 1997 p. 161-70.
21. Component collection by apheresis, In: *Technical Manual 13th Edition*, Ed. Vengelen-Tyler V, American Association of Blood Banks Bethesda 1999 p. 131-132.
22. Larry J. Dumont and Tania Vanden Broeke. Seven-day storage of apheresis platelets : report of an in vitro study. *Transfusion* 2003;43:143-150.
23. Logan LC. Chapter 16, Hemostasis, In: Mazza JJ ed., *Manuel of Clinical Hematology*, Second edition. Little, Brown and Company, USA, 1995, pp. 349-79

24. British committee for standards in Haematology. Guidelines for the use of platelet transfusions. *British Journal of Haematology* 2003;122:10-23.
25. Van der Poel, Noel L, Barbara J, Dodd R. ISBT Working party on transmissible disease: Report on the workshop. *Infectious-disease testing and quality control. VOX Sang* 1996; 70:53-60
26. Kuehner MJ, Roth VR, Haley NR et al. Transfusion transmitted bacterial infections in the United States 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41: 1493-9
27. Girolamo A Ortolano, Lawrence F. Freundlich, Stein Holme, Rosalind L. Russel, Mary Anne Cortus, Karen Wilkins, Hiromi Nomura, Chiyong Chong, Raleigh Carmen, Anthony Capetandes, and Barry Wenz. Detection of bacteria in WBC-reduced PLT concentrates using percent oxygen as a marker for bacteria growth. *Transfusion* 2003; 43:1276-1284
28. Kocazeybek B. Infections Transmitted by Blood Products: Routine Screening Tests and Molecular Diagnostic Methods. *Cerrahpaşa J Med* 2003; 34: 158-163
29. Schramm W(ed) *Blood safety in Europe community: An initiative for optimal use. European Commission* 1999.
30. S. J. Wagner. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions *Vox Sanguinis* (2004) 86, 157-163
31. C.P. McDonald, A. Rogers, M. Cox, R. Smith, A. Roy, S. Robbins, S. Hartley, J. A.J. Barbara, S. Rothenberg, L. Stutzman and G. Widders. Evaluation of the BD BacT/Alert automated culture system for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. *Transfusion Medicine*, 2002, 12, 303-309.
32. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology* 11th edition 2002 by Mosby, Inc.
33. Tunger A. *Staphylococcus aureus: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. Önemli ve sorunlu gram-pozitif bakteri infeksiyonları* 2004;9-22.
34. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA: *Medical Microbiology*. P 202, 4th ed., Mosby, St Louis (2002)
35. Topçu AW, Söyletir G , Doğanay M: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. s. 165, s. 1507, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (2002)
36. Moreillon P , Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxing Shock)*. Mandell, Douglas nad Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases* 6th edition Volume 2, Elsevier Inc 2005; 2321-2352.



37. Dr. Oya Uncu İmamoğlu, Dr. İlgaz Dođusay, Dr. Tamer Okay, Dr. Serap ŐimŐek, Dr. Erhan Tuncay. Staphylococcus Aureus Pnömonilerinde Gelişen Cerrahi Komplikasyonlar. Türk Göđüs Damar Cer Derg 2001; 9:97-100
38. Ball P. Emergent resistance to ciprofloxacin amongst Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus: clinical significance and therapeutic approaches. J Antimicrob Chemother 1990; 26: 165-179.
39. Alice L. Givan. Flow cytometry protocols, methods in molecular biology, 2004; 1-28.
40. Riley RS, Mahin EJ. Flow cytometry clinical Applications ASCP National Meeting Fall, Washington D.C. 3, 1989.
41. Doyen Nguyen, Lawrence W. Diomand, Raul C Brayland. Approach to flow cytometry, flow cytometry in hematopathology, 2003;1-8.
42. Günnur Deniz, M. Temel Yılmaz, Gaye Yıllar. Flow Sitometri ve Tıpta Kullanımı İstanbul 2004.
43. Ağuş N, Okan G, Çađlan FC, Sarıca A, Akkoçlu G, Őahinođlu L, Dađdeviren Uç H: Erişkin yaş grubunda kan költürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobiklere duyarlılıkları, ANKEM Derg 1999; 13(2):116

## ÖZGEÇMİŞ

Hediye SOLTEKİN 1981 yılında Muğla'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Muğla'da tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında biyolog olarak mezun oldu. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na bağlı İmmünohematoloji yüksek lisans programındaki eğitimine başladı, halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Özel Hematoloji Bölümünde biyolog olarak çalışmaktadır.