

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TROMBOSİT SÜSPANSİYONLARINDA,
BAKTERİYEL KONTAMİNASYONUN OTOMATİZE
KAN KÜLTÜRÜ VE FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehtap BOLAT

**Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Enstitü Bilim Dalı : Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Köroğlu

OCAK-2020

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

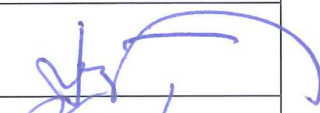
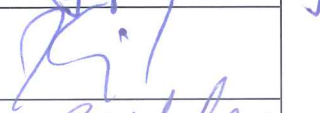
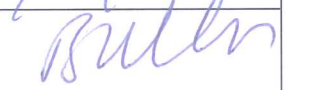
TROMBOSİT SÜSPANSİYONLARINDA, BAKTERİYEL
KONTAMİNASYONUN OTOMATİZE KAN KÜLTÜRÜ VE FLOW
SİTOMETRİ YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mehtap BOLAT

Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Enstitü Bilim Dalı : Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı

“Bu tez 22.01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

| JÜRİ ÜYESİ | KANAATI | İMZA |
|----------------------------|----------|---|
| Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ | Başarılı |  |
| Prof. Dr. Mehmet KOROĞLU | Başarılı |  |
| Prof. Dr. Birsen MUTLU | Başarılı |  |

BEYAN

Bu çalışma için T.C. Sakarya Üniversitesi Klinik Araştırmalar Girişimsel Olmayan Etik Kurulu ‘ndan 12/12/2018 tarihli toplantısında 233 karar numarası ile onay alınmıştır. Çalışmada kullanılan malzemeler öz kaynaklardan sağlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Mehtap BOLAT

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgisi, önerisi, desteği ve hoşgörüsü ile bana katkılarını sunan değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof.Dr.Mehmet KÖROĞLU'na,

Bilgiye verdiği önem ve bizlerin gelişimi için yoğun emek harcayarak düzenlediği toplantı ve faaliyetler için Prof.Dr.Mustafa ALTINDIŞ'e,

Tezimin zorlu süreçlerinde tüm sabırları ve yürekten yardımları ile her konuda desteklerini esirgemeyen Arş.Gör.Dr.Hüseyin HATİPOĞLU ve Uzm.Dr. Gülay ERMAN'a,

Güleryüzlü ve işbirlikçi yaklaşımları ile destek olan tüm mikrobiyoloji laboratuvarı ve kan merkezi çalışanlarına,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını ve anlayışlarını benden esirgemeyen Sorumlu Hemşire Pınar Tabakoğlu ve SEAH Doğumevi Kampüsü çocuk acil çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu süreçte ve hayatımın her alanında desteğini daima hissettiğim değerli eşim Kemal BOLAT ve varlıkları ile bana güç veren çocuklarım Muhammed Yekta ve Zehra BOLAT'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| BEYAN..... | i |
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| KISALTMA SİMGELER..... | v |
| TABLO LİSTESİ..... | vi |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | vii |
| ÖZET..... | viii |
| SUMMARY..... | ix |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1.KAN TRANSFÜZYONUNUN TARİHİ HAKKINDA BİLGİLENDİRME | 3 |
| 2.2.KAN BİLEŞENLERİ..... | 4 |
| 2.2.1. Tam Kan..... | 4 |
| 2.2.2. Eritrosit Süspansiyonu..... | 4 |
| 2.2.3. Taze Donmuş Plazma..... | 5 |
| 2.2.4.Granülosit..... | 5 |
| 2.2.5.Kriyopresipitat..... | 5 |
| 2.2.6.Trombosit Süspansiyonu..... | 6 |
| 2.3.KAN ÜRÜNLERİ İLE BULAŞAN ENFEKSİYONLAR..... | 8 |
| 2.3.1. Kan Nakli İle Bulaşan Virüsler..... | 9 |
| 2.3.2.Kan Nakli İle Bulaşan Bakteriyel Enfeksiyonlar..... | 12 |
| 3. MATERYAL VE METOD..... | 17 |
| 3.1.ÇALIŞMANIN AMACI..... | 17 |
| 3.2.ETİK KURUL ONAYI..... | 18 |
| 3.3.ÇALIŞMADA KULLANILAN MALZEMELER..... | 18 |
| 3.4. BacT/ALERT® KÜLTÜR ŞİŞESİ VE FLOW SİTOMETRİ İÇİN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI..... | 18 |
| 4.1. BAKTERİLERİN ÜREME KONTROL SONUÇLARI..... | 22 |
| 4.1.1 <i>Escherichia coli</i> suşlarının üreme kontrol sonuçları..... | 22 |
| 4.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının üreme kontrol sonuçları..... | 29 |
| 4.1.6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> için üreme kontrol sonuçları..... | 33 |

| | |
|----------------------------|----|
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 39 |
| KAYNAKLAR | 47 |
| EKLER..... | 53 |
| ÖZGEÇMİŞ | 54 |



KISALTMA SİMGELER

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | : <i>Escherichia coli</i> |
| <i>E.faecalis</i> | : <i>Enterococcus faecalis</i> |
| FCM | : Flow Sitometri |
| <i>P.aeruginosa</i> | : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PI | : Propidium iodide |
| <i>S.aureus</i> | : <i>Staphylococcus aureus</i> |
| FSC | : Forward scatter |
| SSC | : Side scatter |
| HBV | : Hepatit B virüsü |
| HCV | : Hepatit C virüsü |
| HIV | : İnsan yetmezlik virüsü |
| HDV | : Hepatit D virüsü |
| HAV | : Hepatit A virüsü |
| CMV | : Sitomegalovirüs |
| EBV | : Epstein-Barr Virüs |
| HHV6 | : İnsan Herpes Virüsü Tip 6 |
| TTV | : Transfüzyonla bulaşan virüs |
| RNA | : Ribo nükleik asit |
| DNA | : Deoksiribo nükleik asit |
| <i>S.epidermidis</i> | : <i>Staphylococcus epidermidis</i> |

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Transfüzyonun enfeksiyon komplikasyonları | 13 |
| Tablo 2. Spike örneklerin BacT/ALERT® BPA şişeleri ve flow sitometrik analiz sonuçları. | 35 |
| Tablo 3. Trombosit süspansiyonların bakteriyel kontaminasyonun araştırıldığı yöntemler ve karşılaştırmalı özellikleri..... | 44 |



ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Bakteriyel Kontaminasyonu Önleyici Basamaklar..... | 16 |
| Şekil 2. Spike örneklerin analiz süreçleri | 19 |
| Şekil 3. Bakteri dilüsyonlarının hazırlanması..... | 20 |
| Şekil 4. <i>E. coli</i> ATCC 25922 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 22 |
| Şekil 5. <i>E.coli</i> klinik izolat için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri.... | 23 |
| Şekil 6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 24 |
| Şekil 7. <i>Klebsiella pneumoniae</i> klinik izolatı için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 25 |
| Şekil 8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri | 27 |
| Şekil 9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinik izolat için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 28 |
| Şekil 10. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 29 |
| Şekil 11. <i>S. aureus</i> klinik izolat için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri | 30 |
| Şekil 12. <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 31 |
| Şekil 13. <i>E. faecalis</i> klinik izolatı için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 32 |
| Şekil 14. <i>S.epidermidis</i> klinik izolatı için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri..... | 34 |
| Şekil 15. Klinik örnekler için 1.gün dot blot görüntü grafikleri | 36 |
| Şekil 16. Klinik örneklerin 3. gün dot blot görüntü grafikleri..... | 37 |
| Şekil 17. Klinik örneklerin 5. gün dot blot görüntü grafikleri..... | 38 |

ÖZET

Giriş ve amaç: Bu çalışmada, aferez trombosit süspansiyonlarındaki bakteriyel kontaminasyon otomatize sisteme uyumlu özel trombosit kültür şişeleri ve flow sitometri yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Transfüzyon Merkezinde hazırlanan rutinde alınan 50 adet aferez trombosit süspansiyonu ile standart suşlar ve klinik izolatların kullanıldığı 33 aferez trombosit süspansiyonu bakteriyel kontaminasyon yönünden incelenmiştir. Beş farklı standart suş ve 6 farklı klinik izolat ile spike örnekler (10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/ml) hazırlandıktan sonra (1 ml bakteri süspansiyonu+1 ml trombosit süspansiyonu) BacT/ALERT® BPA şişelerine ekildi. Eşzamanlı olarak oda ısısında ve $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 16-18 saat inkübe edilen örnekler, flow sitometri cihazı ile analiz edildi. İnkübasyon sonrası sonra 3 kez dondurup çözme ile trombositler parçalandı ve 500rpm/3dk santrifüj işlemini takiben pelletten flow sitometrik analiz yapıldı. Rutinde alınan 50 adet aferez trombosit süspansiyonu alındığı gün özel trombosit kültür şişelerine ekilerek otomatize kan kültür sistemine konuldu ve aynı örnekler oda ısısında ve $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de tutularak flow sitometrik yöntemle 1, 3 ve 5. günlerde) analiz edildi.

Bulgular: Standart suşlar ve klinik izolatlarla hazırlanan spike örneklerin tümünde BacT/ALERT® BPA ile 12-18 saatte pozitiflik saptandı. Oda ısısında inkübe edilen örneklerden *S.aureus* (klinik ve standart suş), *E.fecalis* (standart suş) ve *P.aeruginosa* klinik izolatı kullanılan 12 örnekte (%36); etüvde inkübe edilen örneklerden 22'sinde (%66) flow sitometrik analizde bakteriyel kontaminasyon saptandı. Spike örneklerin 9'unda (%13) saptanmadı (*E.coli*, *S.epidermidis* ve *E.fecalis*). BacT/ALERT® BPA ile 50 aferez trombosit örneğinin 1'inde pozitiflik (*Bacillus simplex*) saptandı. Bu örneklerde flow sitometri ile pozitiflik saptanmadı.

Sonuç: Trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılan özel kan kültürü şişeleri ve flow sitometri yöntemi arasında yüksek oranda uyum gözlenmiştir. Ancak flow sitometri yönteminin bu alanda kullanımı çok yeni olduğundan daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: transfüzyon güvenliği, kan bileşeni, trombosit süspansiyonu, bakteriyel kontaminasyon, flow sitometri

SUMMARY

Introduction and aim: In this study, it is aimed to investigate bacterial contamination in apheresis platelet suspensions by automated system compatible blood culture bottles and flow cytometry method.

Material and Method: 50 apheresis platelet suspension and 33 apheresis platelet suspension using standard strains and clinical isolates were examined for bacterial contamination in the routine prepared at the Transfusion Center of Sakarya University Training and Research Hospital. Spike samples (10^0 , 10^1 , 10^2 CFU / ml) were prepared with 5 different standard strains and 6 different clinical isolates (1 ml of bacterial suspension + 1 ml of platelet suspension) and planted in BacT / ALERT® BPA bottles. Samples incubated simultaneously at room temperature and 35 ± 2 ° C for 16-18 hours were analyzed by flow cytometry device. After incubation, platelets were broken down by freezing and thawing 3 times and flow cytometric analysis was performed from the pellet following 500rpm / 3min centrifugation. On the day of taking 50 apheresis platelet suspension taken in routine, they were placed in special platelet culture bottles and placed in the automated blood culture system, and the same samples were kept at room temperature and 35 ± 2 ° C and analyzed by flow cytometric methods on days 1, 3 and 5).

Findings: All of the spike samples prepared with standard strains and clinical isolates were positive with BacT / ALERT® BPA in 12-18 hours. Of the samples incubated at room temperature, *S. aureus* (clinical and standard strain), *E.fecalis* (standard strain) and *P. aeruginosa* clinical isolate was used in 12 samples (36%); Bacterial contamination was detected in flow cytometric analysis in 22 (66%) of the incubated samples in the oven. It was not detected in nine of spike samples (13%) (*E.coli*, *S.epidermidis* and *E.fecalis*). Of the routine 50 apheresis platelets, BacT / ALERT® BPA showed only one positivity (*Bacillus simplex*). No positivity was detected in these samples by flow cytometry.

Conclusion: A high degree of compliance was observed between the special blood culture bottles and flow cytometry method used to determine bacterial contamination in platelet suspensions. However, since the flow cytometry method is very new to use in this field, larger and more comprehensive studies are needed.

Keywords: transfusion safety, blood component, platelet suspension, bacterial contamination, flow cytometry



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kan ve kan ürünleri ile tedavi hayat kurtarıcı olduğu kadar kan alıcılarında oluşturduğu enfeksiyon hastalıkları bakımından da önem taşımaktadır (Kaya, Alanoğlu, Polat ve Sipahi 2009). DSÖ güvenli kanın tanımını; verildiği kişide herhangi bir tehlike yada hastalık oluşturmayan, enfeksiyon etkenlerini veya zararlı yabancı maddeleri içermeyen kan olarak yapmaktadır (Kocazeybek 2003). Ancak günümüzde alınan tüm önlemlere rağmen birçok türde patojen bulaşı kan transfüzyonları ile olabilmektedir (Savaşçı ve Avcı 2016). Kan ürünleri tam kandan veya “aferez” yöntemiyle elde edilebilir (Özdemir ve Apak 2009).

Aferez yönteminin üstünlüğü tam kan toplama yöntemlerine göre daha fazla miktarda istenilen kan ürününü sağlamasıdır (Özdemir ve Apak 2009). Kan ürünlerinde taraması yapılan patojenler dışında farklı mikroorganizmalarla da bulaş olabilmektedir. Kan ve kan ürünlerinde bakteriler ile bulaşan sepsis nadir olmasına rağmen mortalite riski yüksek olduğundan büyük bir önem taşımaktadır (Tekin 2011). Kan toplama için etkili aseptik tekniklerin ortaya çıkmasıyla, daha sonra tam kanın toplanması ve kan bileşenlerine işlenmesi için steril kapalı sistemlerin uygulanması ve kırmızı kan hücresi (RBC) depolanması için etkin soğutma kullanılması daha önce gözlemlenen transfeksiyon ilişkili septik olayların görülme sıklığını azaltmıştır (Blajchman and Goldman 2001).

Trombositler süspansiyonlarının bakteri ile kontaminasyonu, tarama yapılmasına rağmen, kan transfüzyonunun başlıca mikrobiyolojik riskidir. Trombosit süspansiyonlarındaki bakterilerin taranması bulaş sıklığını önemli ölçüde azaltabilecektir. Oda sıcaklığında saklanması ve bakteriler için yeterli besin ürünü oluşturması açısından trombositler risk altındadır (Korte 2011). Trombositlerin depolandığı sıcaklık, 22°C'nin, en azından çoğu bakteri türü için bakteri üremesini kolaylaştırması daha muhtemeldir (Blajchman and Goldman 2001). Fransa’da transfüzyona bağlı olduğundan şüphelenilen 18 ölümden 10’unun sebebi olarak bakteriyel kontaminasyonlu trombositler gösterilmiştir. Bu nedenle, bu risk, tarama prosedürü uygulandıktan sonra kan nakli ile bulaşan virüsler için gözlemlenenden

önemli ölçüde daha büyüktür (Munksgaard, Albjerg, Lillevang, Gahrn-Hansen and Georgsen 2004).

Trombositlerin transfüzyonu ile bulaşan enfeksiyonlarının oranı 1:20.000 ile 1:100.000 olarak hesaplanmıştır (Vollmer 2012). Trombositlerin saklama gün süreleri ülkeler arası farklılık göstermekle birlikte bu değerli ürünün depolanma süresinin 7 güne çıkartılabilmesi aynı zamanda güvenliliğin sağlanması yönünde çalışmalar yaygınlaşmaktadır (Caram-Deelder, Kreuger, Jacobse, Van Der Bom and Middelburg 2016). Bunlardan birisi; bu ürünlerde bakteriyel kontaminasyonun araştırılmasıdır. Bakteriyel kontaminasyon olmadığı gösterilen trombosit süspansiyonlarının kullanım ömrü 7 gün olmaktadır (Munksgaard et al. 2004)).

BacT/ALERT® ve Becton Dickinson® (Biomerieux, Fransa ve Becton Dickinson, ABD) otomatize kan kültür sistemi ve özel trombosit kültür şişeleri ABD'de FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır. Bu şişeler ve sistemler kullanılarak trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun taranması yakın zamanda kullanıma girmiş olup, giderek yaygınlaşmaktadır. Bazı yayınlarda bakteriyel kontaminasyonun taranmasının transfüzyonla alakalı bakteriyel enfeksiyon insidansını azalttığı vurgulanmaktadır (Munksgaard et al.2004).

Aynı zamanda bazı çalışmalarla flow sitometri yöntemi ile de bakteriyel bulaş tespitinin yapılabileceği böylece enfeksiyon oranının azaltılıp raf süresinin uzatılabileceği yönünde de çalışmalar da mevcuttur (Vollmer, Engemann, Kleesiek and Dreier 2011).

Bu tez çalışmasında; otomatize kan kültür sistemine uyumlu kan kültür şişeleri ve flow sitometri yöntemi kullanılarak aferez trombosit süspansiyonlarındaki bakteriyel kontaminasyonun araştırılması ve böylece trombosit süspansiyonlarının raf ömrünün 5 günden 7 güne çıkarılabilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. KAN TRANSFÜZYONUNUN TARİHİ HAKKINDA BİLGİLENDİRME

Transfüzyonun konu edildiği ilk tarihi kaynak 15.yüzyılda Stefano Infessura tarafından yazılmıştır. Ölmek üzere olan Papa VIII. Innocent 1492 yılında üç çocuğun kanını para karşılığında alarak içmiştir. Ancak gerek Papa gerekse çocukların ölümü ile sonlanan bu denemeden sonra geçen yıllar içinde 17. Yüzyılda insan kan dolaşım sistemini W.Harwey'in tariflemesi üzerine hayvan deneyleri başlatılmıştır. Bu denemeler sonrasında kayıtlara geçen ilk insana yapılan transfüzyon Fransa'da bir hekim tarafından genç bir hastaya kuzu kanı nakledilerek yapılmış ve başarılı olmuştur. Ancak daha sonra ki denemeler ölümle neticelenince yaklaşık iki asır boyunca transfüzyon denemelerine ara verilmiştir (Özdemir ve Apak 2009).

19. yüzyıla geldiği zamanlarda İngiliz hekim James Blundell tarafından tasarlanan ve İmpellor adı verilen bir cihaz geliştirilip transfüzyonlar başarı ile gerçekleştirilir. 1901 yılında kan gruplarının tanımlanması ile de bu alanda büyük gelişmeler birbirini takip eder.

Ülkemizde ise 1938 yılında Cerrahpaşa tıp fakültesi doktorlarından Burhanettin Toker tarafından ilk transfüzyon gerçekleştirilmiş olup daha sonrasında kan bankaları kurulması adına önemli adımlar atılmıştır.

Günümüzde de kan transfüzyonunun güvenliğinin artırılmasına yönelik tarama testleri, hemovijilans çalışmaları, yayınlanan rehberler aracılığı ile kan bankacılığı ve transfüzyon tıbbındaki gelişmeler tüm hızıyla devam etmektedir (XXI.Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Temel Kurs Kitabı 2018).

2.2.KAN BİLEŞENLERİ

Kan bileşenleri kan komponentlerini içerdiği gibi plazma fraksiyon ürünlerini de içinde bulundurur. Kan komponentleri eritrosit, lökosit, trombosit süspansiyonları, plazma ve kriyopresipitattır. Bu komponentleri tam kandan ayırma işlemi, komponentlerin kendilerine özel graviteleri dikkate alınarak belirli bir hız ve sürede santrifüj edilme prensibine dayanır. Kan bileşenleri aynı zamanda aferez yöntemiyle de hazırlanabilir (Hemşireler İçin Mikrobiyoloji 2010, Doğu, Sarı, Ertürk, Hacıoğlu ve Keskin 2015).

Ortalama olarak bir insanda 70 ml/kg kan bulunmaktadır. Kanın, %50-%60'ı sıvı iken kalan kısım hücrelerden oluşmaktadır. Kanın sıvı kısmına plazma denmektedir ve plazmanın %90'a yakını sudan oluşur. Bunun dışındaki kısmı ise glukoz, aminoasitler, iyonlar, proteinler ve hormonlardır. Plazmadan fibrinojen ve pıhtılaşma faktörlerini uzaklaştırdığımızda ise geriye serum kısmı kalır (Gün R. 2019).

2.2.1. Tam Kan

Başışçıdan alındıktan sonra herhangi bir ayırıştırma işlemi yapılmadan sadece antikoagülan eklenerek hazırlanan ürüne “tam kan” adı verilmektedir. Kan alma işlemi yeni tamamlandığı sırada tam kanın içinde eritrosit, trombosit, lökosit, plazma proteinleri ve pıhtılaşma faktörleri bulunur. Tam kan alındıktan sonra 24 saat içinde trombosit işlevleri bozulur, koagülasyon faktörleri (özellikle faktör V ve VIII) azalır. Transfüzyon tıbbında tam kanın kullanım alanı çok sık değildir. Sağlıklı bağışçıdan alınan bir ünite tam kan yaklaşık olarak 450 ml kan içerir ve kan saklama torbalarında, buzdolabında 1-6°C arasında 24 saate kadar muhafaza edilir. Bu şekilde hazırlanan kana “taze tam kan “denir (Özdemir ve Apak 2009). Hastalara transfüzyondan önce ABO ve Rh uygunluğu ile çapraz karşılaştırma yapılarak test edilmesi gerekir (Fasano and Luban 2008).

2.2.2. Eritrosit Süspansiyonu

Eritrosit süspansiyonları tam kanda bulunan kırmızı kan hücrelerini ve plazmanın da 1/4'ünü içerir. Buzdolabında 2-6°C ısıda saklanır. Kan saklama torbasına eklenen koruyucu solüsyonun özelliğine göre eritrosit süspansiyonları 42 güne kadar muhafaza edilebilir. Eritrosit süspansiyonları kullanılırken immün sistemi zayıf

hastalar için ışınlama, bakteriyel kontaminasyonu azaltmak amacıyla lökosit filtrasyonu ya da alerjik reaksiyonlar açısından önlem almak adına yıkama işlemi yapılabilir. Ancak SF ile yıkama işlemi uygulanan eritrositler 24 saat içinde kullanılmalıdır (Çavuşoğlu, Bora Güneş, Pars 2014, Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Rehberi 2016).

2.2.3. Taze Donmuş Plazma

Bağışçıdan alındıktan sonra ayrışma işlemi uygulanmasından en geç 8 saat sonrasında -18 derecede dondurulur. İçerisinde kan plazma ürünlerini fibrinojen de dahil bulundurur. Saklama derecesine göre depolanma günü değişir (-18-25 °C arasında 3 ay -25°C'nin altında 3 yıl saklanabilir). Çözdürme işlemi 36-38°C'de gerçekleşir ve çözüldükten sonra bakteriyel kontaminasyonu engellemek için hızlı bir şekilde transfüzyonu gerçekleştirilmelidir (Çavuşoğlu ve ark. 2014, Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Rehberi 2016).

2.2.4. Granülosit

Bağışçılardan aferez yöntemi ile alınarak hazırlanan bu ürün 200-300 ml plazma ile karıştırılarak uygulamaya hazır hale getirilir. Hazırlanmasının yüksek maliyete sahip oluşu, yüksek dozda kullanımının gerekliliği ve önemli yan etkilerinin varlığı sebebi ile kullanım alanı sınırlıdır.

Granülositlerin transfüzyonu için optimize edilmiş bir süre veya doz kriteri bulunmamaktadır ve klinik yararının gösterilmesi için 4-7 gün transfüzyon devam ettirilmelidir. 20-24°C'de saklanmalı ve mümkün olabilecek en kısa sürede alıcıya transfüze edilmelidir. Saklama süresi bileşen hazırlandıktan sonra 8 saati geçmemelidir (Öztürk 2005, Gezer 2015).

2.2.5. Kriyopresipitat

Taze donmuş plazmanın yüksek devirde santrifüj edilmesiyle elde edilir. Faktör VIII, XIII ve faktör VIII von Willebrand faktör ve fibrinojen içerir. Derin dondurucuda -18°C'de 3 ay süreyle saklanabilir. Kriyopresipitat da taze donmuş plazmalar gibi eritildikten sonra hemen kullanılmalıdır. Hastaya transfüze edilmeden ABO uygunluğu açısından bakılmalıdır (Çavuşoğlu ve ark. 2014).

2.2.6.Trombosit Süspansiyonu

Trombosit süspansiyonları tam kan ya da aferez yöntemi olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanabilmektedir. Ancak trombosit sayısı açısından aralarında fark vardır (5-6 ünite random trombosit süspansiyonunun 1 ünite aferez trombosit süspansiyonuna denk gelir).

Kullanım açısından dikkat edilmesi gereken hususlar; kan bankasından alınmış süspansiyonun 30 dakikada transfüzyonunun gerçekleştirilmesi, soğukta kalması durumunda trombositler bozulacağından asla buzdolabına konmaması şeklinde sıralanabilir (Gezer 2015).

Trombosit süspansiyonlarının transfüzyon kararı için gerekebilecek koşullar şu şekilde sıralanabilir (T.C Sağlık Bakanlığı Ulusal Kan ve Kan Ürünleri Rehberi, 2011-2014):

1.Trombosit fonksiyon bozuklukları

- Kardiyak by-pass ameliyatları
- Böbrek ve karaciğer yetmezlikleri
- Konjenital trombosit fonksiyon bozukluğu
- Asetilsalisilik asit, tiklodipin, klopidogrel gibi ilaçların kullanımı

2.Trombositopeni durumları

- Platelet sayısının $10^5/\mu\text{l}$ 'nin altında olduğu durumlar
- Platelet sayısı $20.000/\mu\text{l}$ 'nin altında ve eş zamanlı ateş, enfeksiyon, pıhtılaşma bozukluğu, lökositoz gibi durumların olması
- Akut platelet yapım bozukluğu olan hastalardaki mevcut kanama
- Sepsis ve yaygın damar içi pıhtılaşma (Disseminated Intravascular Coagulation-DIC) tablosundaki bir hastada kanamanın varlığı
- Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP) ve Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS)'da tüm tedavilere rağmen kanamanın devam etmesi

Tam kandan hazırlanan trombosit süspansiyonunda iki farklı yolla edilir. Aralarındaki fark içerdikleri eritrosit lökosit ve trombosit içeriğinden kaynaklanmaktadır.

- 1) Trombositten Zengin Plazma'dan Trombosit Süspansiyonu; tam kandan elde edilen trombosit zengin plazmanın yeniden santrifüj edilmesiyle elde edilen süspansiyondur. Yaklaşık olarak 0.55×10^{11} içermektedir.
- 2) Buffy Coat'tan Trombosit Süspansiyonu; Top&bottom (alt-üst) bağlantılı torbalar kullanılarak elde edilen eritrosit ve plazmanın uzaklaştırılmasıyla, geriye kalan buffy coat kısmına 50-70ml plazma eklenerek hazırlanan süspansiyon düşük hızda santrifüj edilir ve optik ekstraktörlerle plazma ve trombosit tabakası buffy coattan ayrılarak hazırlanır (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kurs Kitabı 2018).

Aferez tekniği ile hazırlanan ürünler hücre ayırıcı cihazlar tarafından gerçekleştirilir. Aferez kelime anlamı olarak ayırma/uzaklaştırma anlamına gelmektedir. Aferez tekniğinde kan bağışçından ya da hastadan alınarak hücre ayırıcı cihaz ile ayrılır ve geri kalan kısım hastaya ya da bağışçıya geri verilir. İki farklı amaçla aferez uygulaması yapılmaktadır.

A. Terapötik aferez; hasta bireyleri tedavi etmek amacıyla yapılan afereze denir.

B. Bağışçı aferezi; kan bağışçılarından bileşen elde etmek maksadıyla yapılan afereze denir.

Aferez sisteminde hedef bileşen, bu işleme özel hazırlanmış tek kullanımlık setler ve bu setlerle uyumlu cihazlarla 3 teknik prensibinde çalışılarak elde edilir.

1. santrifügasyon tekniği

2. filtrasyon tekniği

3. adsorbsiyon tekniği

En çok kullanılan teknik santrifügasyondur. Bağışçı aferezlerinde kullanılan cihazlarda özellikle santrifügasyon tekniği tercih edilmektedir. Bu teknikle istenilen ürün uygun torbaya aktarılırken kalan bileşenlerin bağışçıya geri verilmesi

sağlanabilmektedir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.2.6.1.Havuz Trombosit Süspansiyonu

Tek ünite olarak tam kandan hazırlanan trombosit süspansiyonunun 4-8'li olarak steril bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşan üründür. Bu şekilde hazırlanan süspansiyon bir terapötik doza karşılık gelmektedir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.2.6.2.Aferez Trombosit Süspansiyonu

Tek bir bağışçıdan hücre ayırıcı cihazlar yardımıyla aferez yöntemiyle elde edilen bileşendir. En çok yapılan bağışçı aferez türüne örnektir. Ortalama olarak $2-8 \times 10^{11}$ arasında trombosit verimi alınabilmektedir. İşlem 1.5-2.5 saat arasında değişmektedir. Bir ünite aferez trombosit yaklaşık olarak 6-8 random bağışçı trombosit süspansiyonuna denk gelmektedir. Aynı zamanda tek bağışçıdan ürünün hazırlanması enfeksiyonu azaltmada önemli rol oynamaktadır (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.KAN ÜRÜNLERİ İLE BULAŞAN ENFEKSİYONLAR

Kan nakli ile bulaşan enfeksiyonlar ülkemizde ve dünyada alınan tüm güvenlik önlemlerine rağmen transfüzyon tıbbi için halen önemini korumakta olan sorundur. İnsan İmmün Yetmezlik Virüsünün riski ve önemi anlaşıldıktan sonra, kan nakli ile bulaşabilecek diğer etkenlere karşıda farkındalık artmıştır. Bakteri, virüs, mantar, parazit ve prionlar olmak üzere bulaşta etken olabilecek farklı mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Bu patojenlerin önemli özelliklerinden biri kan ve kan ürünlerinde özelliklerini koruyabilmeleri ve dolaşımda uzun süre kalabilmeleridir. Bu da enfeksiyonların bulaşını kolaylaştıran bir faktör olmaktadır. Bu etkenlerden arındırılmış kan ürünleri hazırlayabilmek için rehberlerle standartize edilmiş yöntemler kullanılmaktadır. Ülkelere göre değişkenlik göstermekle birlikte, donör sorgulama formu, tarama testleri ve ürün güvenliğini sağlama da bakteri tespit ve azaltma yöntemleri kullanılarak kan ürünlerinin alıcıda hiçbir bulaşa sebep olmadan transfüzyonun sağlanması tüm dünyada ve ülkemizde amaçlanmaktadır (Ulusal Kan

ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Rehberi 2016, Hemovijilans Hemşireliği Ve Transfüzyon Güvenliği, 2019).

2.3.1. Kan Nakli İle Bulaşan Virüsler

Transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar grubuna tüm mikroorganizmalar dahil olsa da en fazla sorunu oluşturan mikroorganizmalar virüslerdir. Transfüzyonla geçen viral enfeksiyonların ortak özellikleri kuluçka sürelerinin uzun olması, pencere dönemine sahip olmaları, etkenin kan ve kan ürünlerinin saklama koşullarında canlılıklarını sürdürebilmeleri, asemptomatik seyirli olmaları sayılabilmektedir. Transfüzyon tıbbında karşımıza çıkan en önemli sorun ise serolojik negatiflik dönemde, virüsün pencere döneminde olması ama bulaş riskinin ortaya çıkmasıdır. Çok duyarlı testlerin mevcut olmasına rağmen viral göstergelerin negatif olduğu dönem halen mevcuttur (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

Transfüzyonla en fazla bulaş görülmüş virüsler; Hepatit B Virüsü (HBV), Hepatit C Virüsü (HCV), İnsan Yetmezlik Virüsü Tip ½ (HIV ½)'dir. Bu virüslere ek olarak coğrafik bölgelere göre önem arz eden İnsan T Hücreli Lenfotropik Virüsü I/II (HTLV-I/II) de bulaş riski taşımaktadır. Bu virüslerden daha az sıklıkta görülse bile, Hepatit A Virüsü (HAV), Hepatit D Virüsü (HDV), Hepatit G Virüsü (HGV), Transfüzyonla Bulaşan Virüs (TTV), İnsan Parvovirüs B19 (HPV B19), Sitomegalovirüs (CMV), Epstein-Barr Virüs (EBV), İnsan Herpes Virüsü Tip 6 (HHV-6), İnsan Herpes Virüsü Tip 8 (HHV-8)'dir. Bu yazılanların dışında da bazı etkenlerden bulaş bildirilmiştir. Örneğin Kuzey Amerika'dan Batı Nil Virüsü'nün transfüzyonla bulaşı bildirilmiştir (Tekin 2011, Savaşçı ve Avcı 2016, XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.1.1. HIV

AIDS'e uzanan bir tablo ile sonuçlanan HIV virüsü transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Zaman içinde transfüzyonla bulaşı geliştirilmiş ileri testlerle engellenmesine rağmen halen daha transfüzyonla bulaş vakaları gelişmiş ülkelerde dahi mevcuttur. HIV virüsünün cinsel yolla, damar içi uyuşturucu kullananlarda, doğum ve emzirme ile anneden bebeğe, kan ve kan ürünleri nakli ile bulaşı dışında da bulaş sebebi belli olmayan olgularda tespit edilmiştir (Babayiğit ve Bakır 2004). Kan nakli ile bulaşı engellemede yapılan rutin

testler negatif olduğu dönemde dahi bağışçı enfekte ve bulaştırıcı olabilir. Çoğunlukla enfekte bireyler hastalıklarının farkında değildirler. Klinik bulgu görülmediğinden dolayı risk grubunda görülen (intravenöz ilaç kullanan, eşcinseller, fazla cinsel partneri olanlar) şüphelenilen bireylerden kan bağıışı kabul edilmemelidir (Blood Banking and Transfusion Medicine, 2nd Edition, 2007, XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.1.2.HBV

Transfüzyon sonrası bulaş oluşturma riski yüksek bir viral enfeksiyon olan HBV, 1970 yılların sonundan itibaren taranması zorunlu hale geldiği için, aynı zamanda duyarlı testlerin artması, bireylerin aşılama programlarının alınması gibi stratejilerin olması sayesinde giderek azalan bir orana sahip olmuştur. Büyük çoğunluğunun engellenmesine rağmen günümüzde halen hepatit B bulaşı görülebilmektedir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018). Taraması zorunlu testin sadece HbsAg'ye özgü olması bulaş riski açısından risk olmaktadır. Yapılan araştırmalarda anti-Hbc'nin pozitif bulunduğu erken dönemlerde çoğunlukla HbsAg'de pozitif bulunmuştur (Adverse Effect of Transfussion 2013). Ancak Hepatit B prevalansı yüksek olan ülkelerde Anti-HBc pozitif bireyleri bağışçı olarak kabul etmemek ciddi oranda bağışçı kaybına sebep olacağından ve Anti-HBc pozitif bireylerin çok küçük bir kısmında bulaş riski olacağından daha duyarlı olan HBV DNA ile HBV taranması daha uygun ve güvenilir olacaktır. Tüm bu çalışmalarda sıkıntılar göz önüne alındığında flebotomi öncesi bağışçılar sarılık yönünden sorgulanmalıdır. Sarılık öyküsü bulunan bağışçılardan kan bağıışı kabul edilmemelidir. Farklı bir önlem olarak sık transfüzyon yapılacak bireylere HBV aşısının yapılması uygundur (Douglas and Taswel 1991, XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018). Ayrıca, herhangi bir nedenle HBsAg pozitif bir kan veya kan ürünü bir alıcıya verilmişse mümkünse ilk 24 saatte, değilse en geç 72 saat içerisinde, bu da mümkün değilse yedi gün içerisinde Hepatit B hiperimmünglobulini (HBIG) uygulanmalıdır (Avcı, Turhan ve Çınar 2000).

2.3.1.3.HDV

HDV eksik bir virüstür ve alıcıda bir enfeksiyon oluşturabilmesi için HBsAg'ninde varlığına gerek duyulur. Bu sebepten dolayı kan bağışçılarında HBsAg taramasının

yapılması, HDV'nin bulaşı açısından da koruma sağlar (Adverse Effect of Transfusion 2013).

2.3.1.4. HCV

Tanımlanan hepatit virüslerinin arasında kronikleşme oranı en yüksek olan HCV'dir. Ne yazık ki halen hepatit C virüsü için aşı ya da antiserum bulunamamıştır. HCV'nin pencere dönemi de diğer enfeksiyonlara göre daha uzundur. HCV'de transfüzyon öncesi rutin taranan testler arasındadır. Pencere döneminin uzunluğu sebebiyle talasemi ve diyaliz hastalarında hepatit C prevalansı yüksektir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018). Son zamanlarda transfüzyon öncesi HCV Ag ve HCV RNA testlerinin uygulamaya başlanması pencere dönemini oldukça kısaltmış ve bulaş riskinin azalmasını sağlamıştır (Avcı İY ve ark. 2000).

2.3.1.5. CMV

CMV (sitomegalovirüs), sağlıklı bireylerde semptom vermeden geçirebileceği gibi hafif ateşin eşlik ettiği hafif bir hastalık tablosu da oluşturabilmektedir. Kan bileşenlerinin transfüzyonu ile ömür boyu bulaş söz konusu olabilmektedir. CMV için bulaşa ciddi risk grupları arasında, immunsuprese alıcılar, yenidoğanlar, fetüsler ve transplantasyon hastaları sayılabilir. Bu hastalarda bu virüs mortal seyredebilmektedir. Bu sebepten dolayı özel grup alıcılar için CMV negatif kan ürünleri tercih edilmelidir (Blood Banking and Transfusion Medicine, 2nd Edition, 2007). Ülkemizde CMV negatif bağışçı oranı oldukça düşük olduğundan ve bu enfeksiyon lökositler aracılığı ile bulaştığından risk grubundaki alıcılar için kan ve kan ürünü tranfüze edilmeden önce lökosit filtresi kullanmak bulaş oranını düşürmede etkin bir yol olmaktadır. Öte yandan risk grubunda ki alıcılar için antiviral ilaç ve/veya immunglobulin ile de profilaksi başlanarak bulaş riski azaltılabilir. Kan ürünlerinin ışınlanması da bu enfeksiyonun bulaştırıcılığını engellememektedir. Ancak donmuş ve degliserolize eritrositlerde CMV bulaşı olmamaktadır. Yıkanmış süspansiyonlarda ise bu risk devam etmektedir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.1.6.HTLV-I ve HTLV-II

Yıllar içerisinde tarama testlerindeki gelişmelere paralel olarak bulaş oranının 10 kata yakın azaldığı bilinen bir virüstür. Dünyanın bazı bölgelerinde endemik olan virüsün ülkemizdeki durumu tam olarak bilinmemektedir. Türkiye’de ege bölgesinde yapılan bir çalışmada 50.000 donör taranmış 2 adet doğrulanmış pozitiflik saptanmıştır. Fransa için ise 1/5.000.000 oranında bulaş olduğu saptanmıştır. Bu virüsler için rutinde tarama testi ABD ve Japonya’nın da içinde bulunduğu bazı ülkelerde uygulanmaktadır. Ülkemizde rutinde bu test uygulanmamaktadır (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.1.7.Hepatit A Virüsü

Hepatit A virüsü bulaştığında hasta da semptom genellikle görülmez ve bu virüs kanda 2 hafta kalır daha sonra virüse karşı antikorlar oluşur ve ömür boyu koruyuculuk sağlar. Transfüzyonla bulaş nadir görülmektedir. Ülkemizde aşılama prosedürünün varlığı ve çocukluk çağında çoğu kişinin hastalığı geçirmiş olması sebebiyle kanda antikor pozitifliğinin varlığı bulaşın nadir olmasında etkindir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.1.8. Transfüzyonla Bulaşan Diğer Virüsler

Epstein-Barr virüsü, Human Herpes virüs 6 ve 8 gibi virüsler de transfüzyonla bulaşabilir. Lökosit filtresi kullanımı bu viral enfeksiyonları büyük oranda önlemektedir. Hepatit G virüsü (HGV), Transfüzyonla Bulaşan virüs (TTV) de transfüzyonla bulaşabilir. Ayrıca burada adı geçmeyen ve hastalık sırasında kanda bulunabilen başka viral ajanlar [MSRV (multiple sclerosis-associated retrovirus), SEN-V, Enterovirus vb.] da transfüzyonla bulaşabilir (Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd RY, Brander C. 2007, XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

2.3.2.Kan Nakli İle Bulaşan Bakteriyel Enfeksiyonlar

Kan bileşenleri ile bakteriyel bulaş nadir olmakla birlikte bulaş görüldüğünde sonuç daha ölümcül olabilmektedir. Transfüzyon esnasında bulaş görüldüğünde dakikalar içinde sepsis ve septik şok gelişebilmektedir. Bakteriyel bulaş nadir olsa da virüs ve parazitlerden daha sık görülür. Bakteriyel kontaminasyonun nadir görülmesinin

sebepleri arasında; kan saklama torbasının içerisinde sitrat bulunması, kanın +4°C'de buzdolabında saklanması, kanın içerisinde antikorların, lökositlerin de bulunması sayılabilir. Bakteri bulaşı riskini etkileyen diğer faktörlerde alıcının immün durumu, bulaşan bakteri sayısı, alıcının antibiyotik kullanma hali olarak söylenebilir (Brecher ME and Hay SN 2005 XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

Kan ürünlerinin kontamine olma sebepleri ürün hazırlarken olabildiği gibi tamamen bağışçı kaynaklıda olabilmektedir.

Ürün hazırlarken; kan torbalarının hazırlanması sırasında, üretim aşaması, nakil aşaması gibi durumlarda ki uygunsuz koşullara bağlı olarak olabileceği gibi, bağışçının flebotomi bölgesindeki lezyonlara ya da kan alımı sırasında antisepsiye uyulmaması hallerinde de görülebilir. Aynı zamanda kanın bileşenlerine ayrılması, hazırlanması, ısıtılması, transportu, kanın takılması durumlarında da bulaş görülebilmektedir (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).

Tablo 1. Transfüzyonun enfeksiyon komplikasyonları (Hemovijilans Hemşireliği ve Transfüzyon Güvenliği Kitabı 2019).

| TRANSFÜZYONUN ENFEKSİYON KOMPLİKASYONLARI | | | | |
|---|----------------|----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Bakteriyel | Viral | Paraziter | Fungal | Prionlar |
| Sepsis ve septik şok | HIV ½ | Sıtma | Candida türleri | Creutzfeld Jacob Hast (CJH) |
| Staphylococcus spp. (KNS) | HBV | Toksoplazmoz | Aspergillus sp. | Variant CJH (BSE) |
| Spiroketler (T.pallidum, B. burgdorferi) | HCV | Babezyoz | Penicillium sp. | Diğer insan prion hast. |
| Yersinia enterocolitica | HAV | Chagas Hastalığı | Diğer | |
| Pseudomonas sp. | CMV | Filariasis | | |
| Serratia sp. | HTLV ½ | Leismaniazis (Kala-Azar) | | |
| Brucella sp. | Parvovirus | Diğer kan-doku parazitleri | | |
| Rickettsia sp | B19 | | | |
| Legionella sp | Bati Nil | | | |
| Chlamydia sp. | Virüsü | | | |
| Streptococcus spp. | EBV | | | |
| Mikrococcus spp | HHV 6/8 | | | |
| Bacillus spp | TTV | | | |
| Difteroidler | HGV | | | |
| Listerioz | Diğer virüsler | | | |
| Achromobacter spp. | | | | |
| E. coli | | | | |
| Enterobacter agglomerans | | | | |
| Salmonelloz | | | | |
| Citrobacter freundii | | | | |

2.3.2.1. Bakteriyeel Kontaminasyon Tespit Yöntemleri

Bakteriyeel enfeksiyonlar genellikle transfüzyonun bitimini takiben 4 saat içinde yüksek ateş, 120/dk üzeri nabız ile tansiyon düzensizliklerini de içeren bir tablo ile belirti vermektedir. Alıcıya verilen kan bileşeni ile alıcı kanındaki kültürde aynı bakterinin varlığının tespiti ile bakteriyeel kontaminasyon tespit edilmiş olur (The Clinical Use of Blood Handbook 2001).

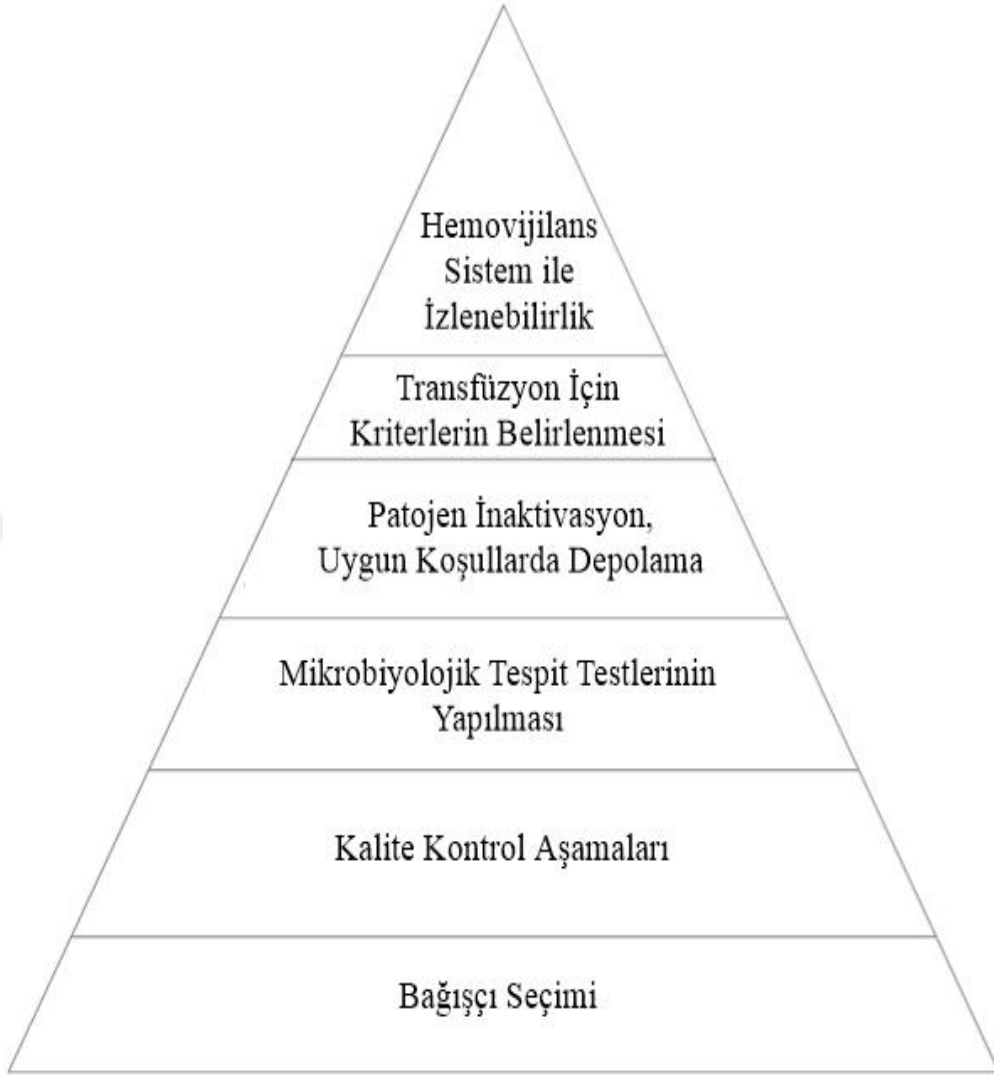
- 1) Bakteriyeel kontaminasyonun tespitinde aynı zamanda görsel inceleme yapılmasında basit ve önleyici tedbirler arasındadır. Kontaminasyon kontrolü açısından bileşen renk, bulanıklık, pıhtı varlığı açısından gözlenebilir. Ancak akılda tutulması gereken nokta belirli bir düzeyin altında (10^6 CFU/ml ve altı) bulaş durumunda bu belirtiler gözlenemeyebilir.
- 2) Bir diğere yöntem bakterilerinin varlığında tüketimin artmasına bağılı pO_2 azalması olacağında pO_2 ölçümünün yapılmasıdır.
- 3) Kullanım açısından pratik olmamasına rağmen uygulanabilecek yöntemler arasında gram veya akridin oranj ile boyama, fluoresan mikroskopi teknikleri sayılabilir.
- 4) Oda ısısında saklama koşuluna sahip olduğundan risk oluşturan trombosit süspansiyonları içinse görsel bir test olan “swirling” , ya da “girdap fenomeni” denen uygulama yapılabilir. Saklama torbasında ($10^6 - 10^8$ CFU/ml üzeri) bakteri ürediyse pH düşeceğinden trombosit torbası dik konumda tutulduğunda girdap hareketi yaparak torbanın altına doğru akması beklenen trombositlerde bu hareket görülmez. Kontaminasyon olmadığı durumlarda da bu hareket görülmeyebilir ancak maliyetinin olmaması açısından kolaylıkla uygulanabilecek bir yöntemdir.
- 5) Biyokimyasal yöntemlerde bulaş gösterebilir ancak bu yöntemde de bakteri sayısının ($10^6 - 10^8$ CFU/ml üzeri) belirli bir düzeyin üstünde olması gerekmektedir.
- 6) Bakteri miktarının 10-100 CFU/ml gibi olduğu durumlarda dahi saptamanın mümkün olduğu otomatize kültür sistemleri geliştirilmiş olmasına rağmen pahalı oluşu, standartize edilmemiş oluşu açısından dezavantajlara sahip bir

tespit yöntemidir. Ancak ülkemizde de kalite kontrolü açısından trombosit süspansiyonu üreten merkezlerde, kullanıma sunulan trombosit süspansiyonlarının %5'inde, trombosit süspansiyonu üretilmiyorsa tüm kan bağış sayısının %1'i kültür yapılması zorunluluğu getirilmiştir.

- 7) Moleküler biyolojik tekniklerde bulaşı saptamada kullanılabilir. Bakteri DNA ve RNA'sının tespitine yönelik yüksek duyarlılığa sahip olmasına rağmen maliyeti yüksek bir yöntem olduğundan dezavantaja sahip bir test sayılmaktadır (XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı 2018).
- 8) Lateral flow yöntemi (Verax PGD) de bakteriyel kontaminasyon tespitinde kullanılmaktadır (Jacobs MR, Smith D, Heaton WA, Zantek ND and Good CA 2011).

2.3.2.2. Bakteriyel Kontaminasyonun Önlenmesi

Bakteriyel kontaminasyonun ciddi mortaliteye sahip oluşu alınacak tedbirlerin de nedeni önemli olduğu fikrine bizi götürmektedir. Alınacak tedbirler Şekil 1'de görülmektedir. Bakteri kontaminasyonunu önlemek için patojen inaktivasyon yöntemleri de uygulanabilir. Amatosalen ve riboflavin yöntemi en çok kullanılan patojen inaktivasyon yöntemleridir. Ancak maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle dünya genelinde yaygın kullanılmamaktadır (Rutter ve Synder 2019, Hemovijilans Hemşireliği ve Transfüzyon Güvenliği Kitabı 2019)



Şekil 1. Bakteriyel Kontaminasyonu Önleyici Basamaklar (Bihl et al. 2007'den uyarlanmıştır).

3. MATERYAL VE METOD

3.1.ÇALIŞMANIN AMACI

Transfüzyon tıbbı açısından önemli bir kan bileşeni olan trombosit süspansiyonları, oda ısısında 22-24°C'de saklanmaları sebebiyle hem bakteriyel kontaminasyon riski oluşturmakta hem de 5 gün gibi kısa bir sürede kullanılmadıkları takdirde imha edilmektedirler. Son yıllarda bakteriyel kontaminasyonun hızlı bir şekilde saptanması amaçlanmaktadır. Herhangi bir yöntemle bakteriyel kontaminasyonun araştırılması durumunda trombosit süspansiyonlarının saklama süresi de 7 güne çıkmaktadır. Mevcut durumda; BacT/ALERT® ve Becton Dickinson® (Biomérieux, Fransa ve Becton Dickinson, ABD) otomatize kan kültür sistemi ve özel trombosit kültür şişeleri çok yaygın olmasa da kullanılmaya başlanmıştır. Söz konusu trombosit süspansiyonlarına özel iki kan kültürü şişesinden otomatik kan kültürü cihazında 5 gün inkübasyonun sonunda pozitif sinyal alınmadığı takdirde negatif kabul edilmektedir. İki sistem de buna göre valide edilmiştir. Bu şişelerden önce normal kan kültür şişeleri aynı amaçla kullanılmakta idi. Ancak daha kısa sürede sonuç veren PCR ve lateral flow gibi yöntemlere ilaveten flow sitometri yöntemi de az sayıda yayında kullanılmıştır (Vollmer 2011-2012, Müller et al. 2014). Ülkemizde flow sitometri yöntemi kullanılarak trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında; otomatize kan kültür sistemine uyumlu kan kültür şişeleri ve flow sitometri yöntemi kullanılarak aferez trombosit süspansiyonlarındaki bakteriyel kontaminasyonun araştırılması ve böylece trombosit süspansiyonlarının raf ömrünün 5 günden 7 güne çıkarabilmesi amaçlanmıştır.

3.2.ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'undan 12.2.2018 tarih ve 233 sayılı onay alınmıştır. Çalışma Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Kampüsü Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

3.3.ÇALIŞMADA KULLANILAN MALZEMELER

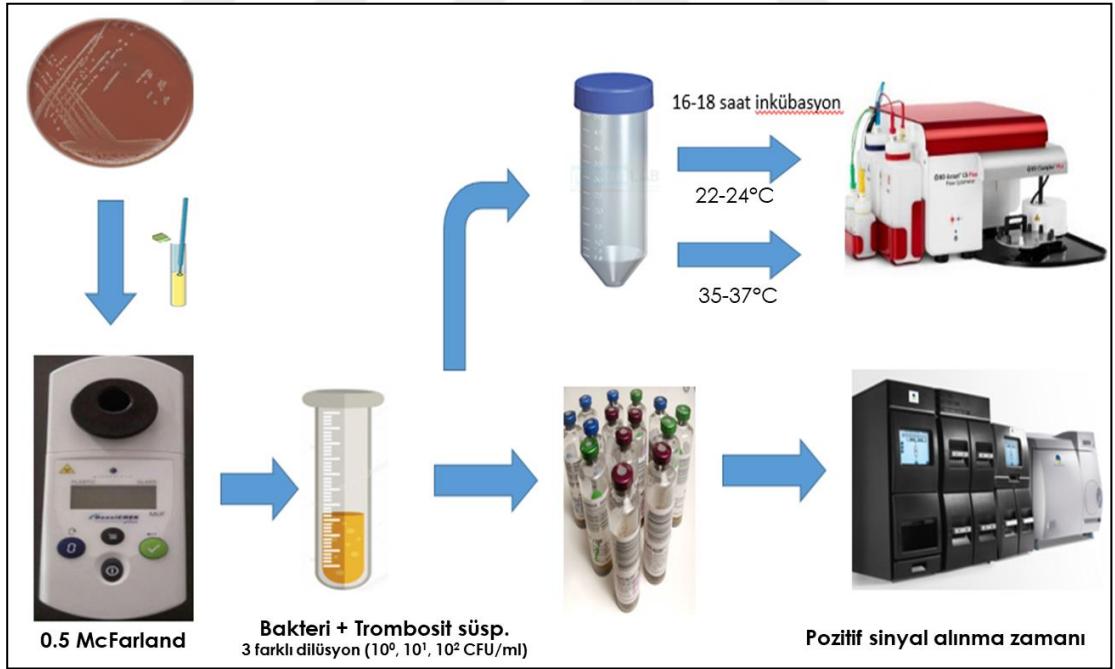
- Koyun Kanlı Agar (Fırat Medikal, İstanbul, Türkiye)
- Mikropipet ve mikropipet ucu (sarı, beyaz)
- 12ml steril polipropilen tüp
- 5ml steril cam tüp
- 1.5ml ependorf tüp
- Etüv (EN 500, Nüve, Ankara, Türkiye)
- Aferez trombosit süspansiyonlarının örnek torba kısmındaki trombositler
- 5 cc'lik enjektör
- Propidium iyodür boyası
- Syto 9 boyası
- Accuri c6 Becton Dickinson flow sitometri cihazı
- BacT/ALERT® BPA kan kültür şişesi
- BacT/ALERT® otomatize kültür cihazı

3.4. BacT/ALERT® KÜLTÜR ŞİŞESİ VE FLOW SİTOMETRİ İÇİN ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI

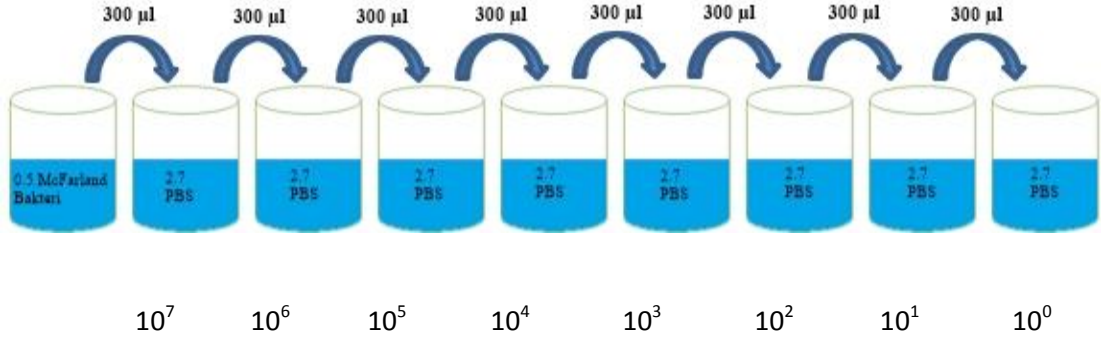
Çalışmada 33 adet spike örnek ve 50 adet klinik örnek incelendi. Simülasyon çalışmalarında laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan standart bakteri suşlarından, *Escherichia coli* ATCC 25922™, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853™, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213™ ve aynı bakterilerin klinik izolatları

kullanıldı. Bunlara ilaveten *Staphylococcus epidermidis* klinik izolatu da simülasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Tüm bakteri suşları %5 koyun kanlı agar plaklarına ekildi ve 35-37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. Her bakteri için fotometrik yöntem kullanılarak (DensiCHEK plus, bioMérieux, Fransa) 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandı.

Seri dilüsyonlar yapılarak son konsantrasyonda 10^0 , 10^1 , 10^2 CFU/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bakteri süspansiyonlarından 1 ml alınarak 1 ml trombosit üzerine eklendi. Hazırlanan bu trombosit+bakteri süspansiyonları steril tüplere alınarak oda ısısında ve etüvde 16-18 saat inkübe edildikten sonra örnekler flow sitometri yöntemiyle analiz edildi. Eş zamanlı olarak trombosit+bakteri süspansiyonu örneği de BacT/ALERT® BPA kültür şişesine (bioMérieux, Fransa) ekilerek otomatik kan kültür cihazına (BacT/ALERT®, bioMérieux, Fransa) yüklendi. Kültür şişelerinin pozitif sinyal verme süreleri kayıt altına alındı.



Şekil 2. Spike örneklerin analiz süreçleri



Şekil 3. Bakteri dilüsyonlarının hazırlanması

Çalışmanın diğer kısmında ise hastanemiz Transfüzyon Merkezinde rutin alınan aferez trombosit süspansiyonu örnekleri bakteriyel kontaminasyon yönünden BacT/ALERT® BPA kültür şişesine (bioMérieux, Fransa) ekilerek otomatik kan kültür cihazında (BacT/ALERT®, bioMérieux, Fransa) ve flow sitometrik yöntemle incelendi. Aferez trombosit süspansiyonu torbasının numune alma kısmından 5 ml örnek alınarak kültür şişesine ekim yapıldı ve otomatize kan kültür sistemine yerleştirildi. Kan kültürü cihazında beş gün süre ile inkübe edilen ve pozitif sinyal alınmayan örnekler üreticinin önerileri doğrultusunda negatif kabul edildi. Aynı aferez trombosit süspansiyonundan 1 ml örnek etüvde, 1 ml örnek de oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Örnekler 1, 3 ve 5. günlerde flow sitometri yöntemiyle analiz edildi.

Flow sitometrik yöntemle analiz edilecek tüm örneklerden (spike örnekler ve rutin aferez trombosit süspansiyonları) 1ml alındı ve 3 defa dondurup çözülerek trombositlerin lizisi sağlandı. Daha sonra 500rpm'de 3dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım atıldı. Geriye kalan pelletten 100µl alınarak 900µl fosfat tamponu ile karıştırıldı. Bu süspansiyondan 100µl alınarak 20µl Syto+20µl PI ile boyanarak 15 dakika karanlıkta bekletildikten sonra flow sitometri cihazında (Accuri C6, Becton Dickinson, ABD) okutuldu. Her bir örnek için pozitif kontrol ve negatif kontrol kuyucuğun dot blot görüntüsü kaydedildi. Her bir bakteri+trombosit süspansiyonu ile rutin aferez trombosit süspansiyonu örneklerinin dot blot görüntüsü pozitif ve negatif kontrolün dot blot görüntüsü ile karşılaştırıldı.

Flow sitometri çalışmalarında için her bir örnek değerlendirilmeden önce çalışılacak olan her bir bakteri 10⁶ olacak şekilde dilüe edildi. Bu dilüsyondan 100 µl alınarak

20µl Syto+20µl PI ile boyanarak 15 dakika karanlıkta bekletildi. Pozitif kontrol olarak flow cihazında okutuldu. Negatif kontrol olarak da daha önce negatif olduğu bilinen trombosit süspansiyonu örnekleri kullanıldı.

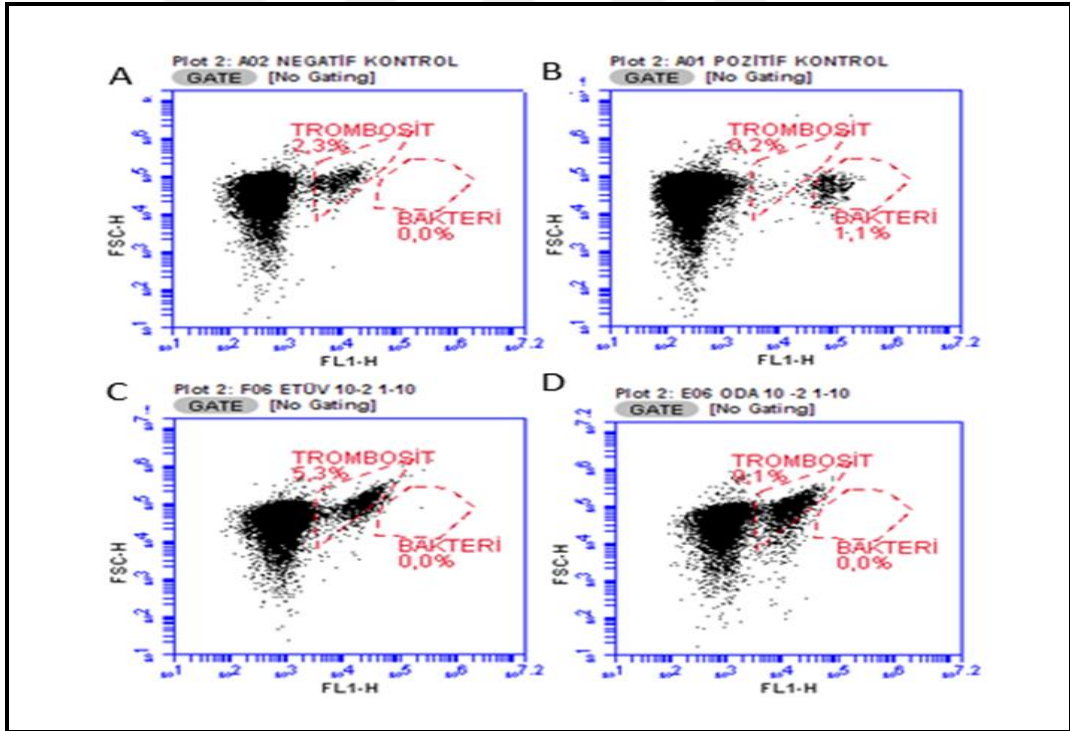


4. BULGULAR

4.1. BAKTERİLERİN ÜREME KONTROL SONUÇLARI

4.1.1 *Escherichia coli* suşlarının üreme kontrol sonuçları

Escherichia coli ATCC 25922 suşu için flow sitometrik yöntem ve BacT/ALERT® otomatize kan kültür sistemi arasında uyum saptanmamıştır. BacT/ALERT® otomatize kan kültür yöntemi ile tüm dilüsyonlarda (10^0 , 10^1 , 10^2) 16-18 saat içinde üreme saptanırken eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemelerde pozitiflik görülmemiştir. Şekil 4'de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



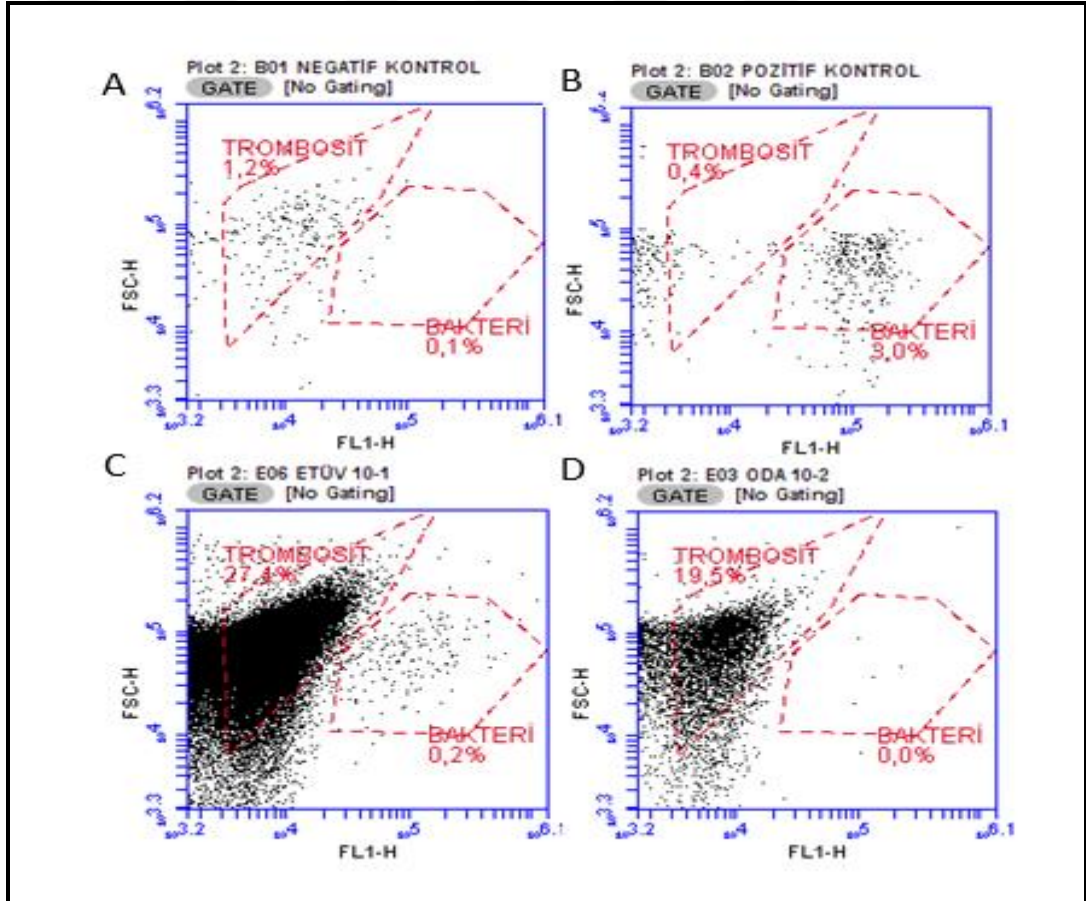
Şekil 4. *E. coli* ATCC 25922 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- Escherichia coli* ATCC 25922 suşu için dot blot görüntüsü

C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü

D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

E.coli klinik izolatu için hazırlanan örneklerde BacT/ALERT® otomatize kültür sistemde tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16-18 saat içinde üreme saptanırken, eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemede etüvde bir gece inkübe edilen örneklerden 10^1 ve 10^2 bakteri ile kontamine edilenlerde üreme saptandı. Diğer örneklerde üreme saptanamamıştır. Şekil 5’de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



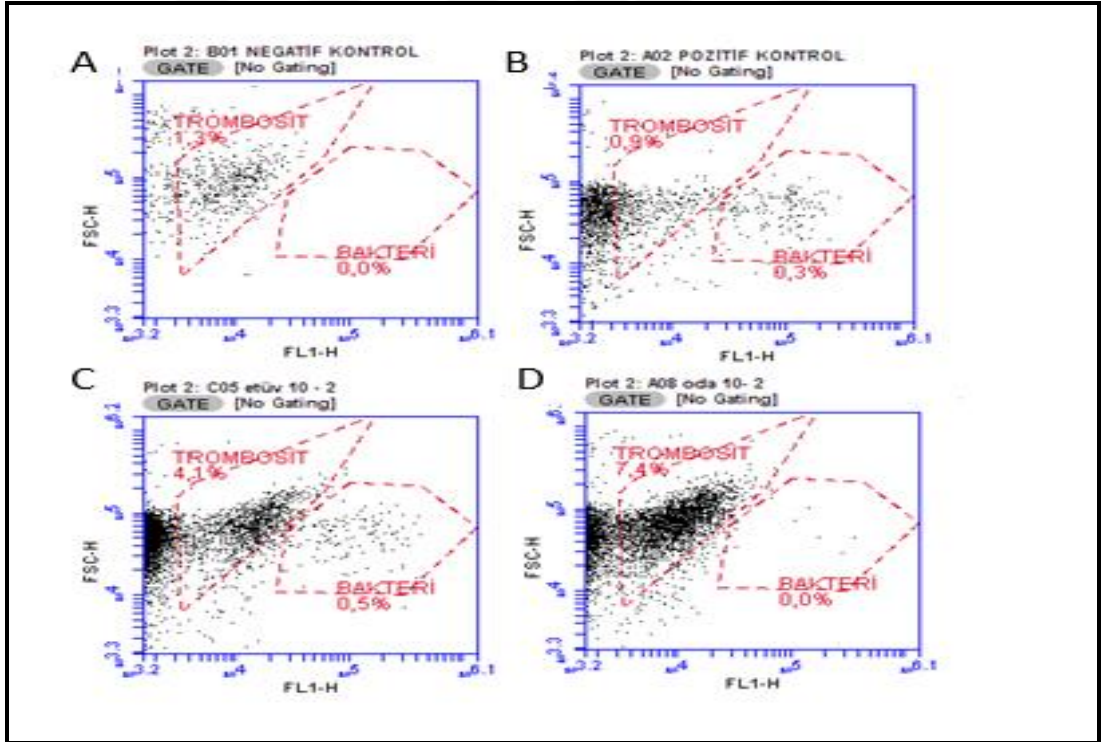
Şekil 5. *E.coli* klinik izolat için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü

- B. *E.coli* klinik izolat için dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^1 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

4.1.2. *Klebsiella pneumoniae* suşlarının üreme kontrol sonuçları

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 suşu için BacT/ALERT® otomatize kan kültür yöntemi ve etüvde inkübe edilen örneklerin flow sitometrik yöntem ile incelenmesinde %100 uyum saptanmıştır. BacT/ALERT® otomatize kan kültür yöntemi ile tüm dilüsyonlarda (10^0 , 10^1 , 10^2) 12-18 saat içinde üreme saptanırken eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemelerde de etüvde inkübe edilen örneklerde üreme saptanmıştır. Ancak oda ısısında inkübe edilen örneklerde flow sitometrik yöntem ile üreme saptanamadı. Şekil 6'da flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.

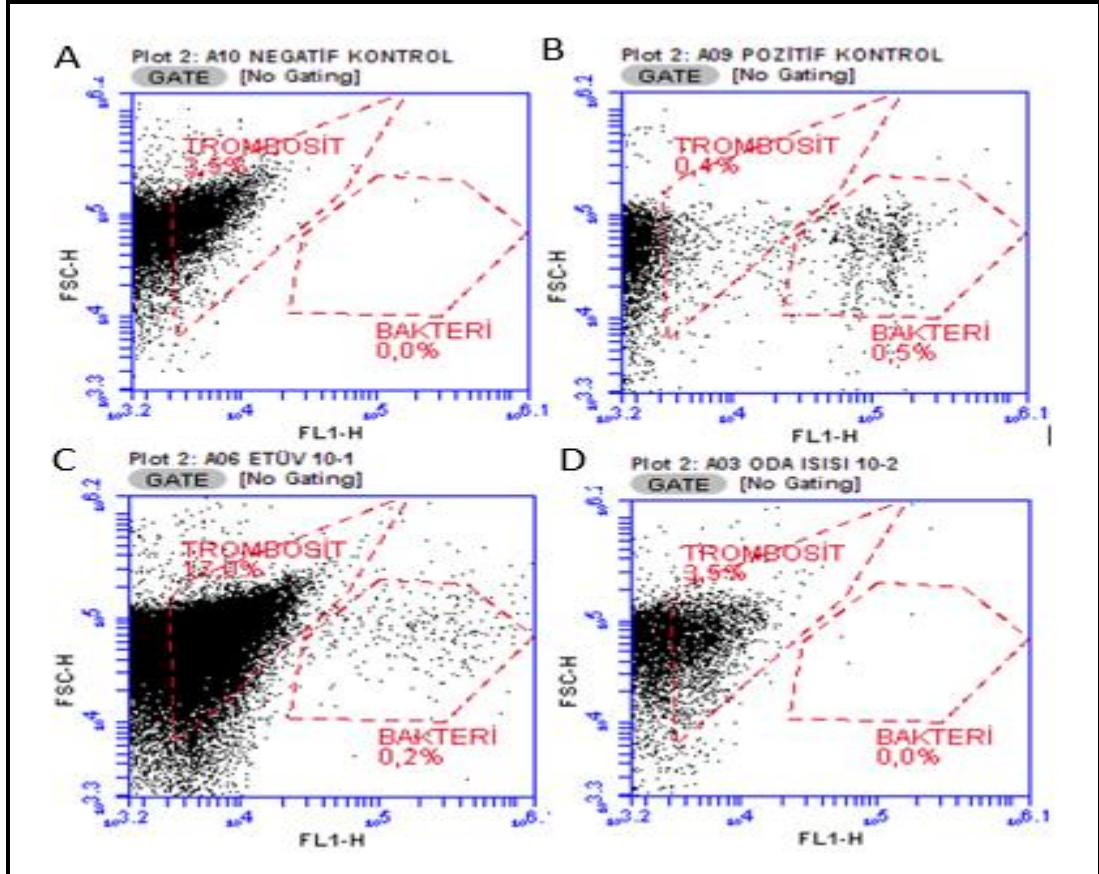


Şekil 6. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü

- B. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 suşu için dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

Klebsiella pneumoniae klinik izolat için hazırlanan örneklerde BacT/ALERT® otomatize kültür sistemde tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 12 -18 saat içinde üreme saptandı. Eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemede etüvde inkübe edilen örnekler için 10^1 ve 10^2 bakteri ile kontamine edilen örnekler için üreme saptanırken diğer örnekler için üreme saptanamamıştır. Şekil 7 'de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



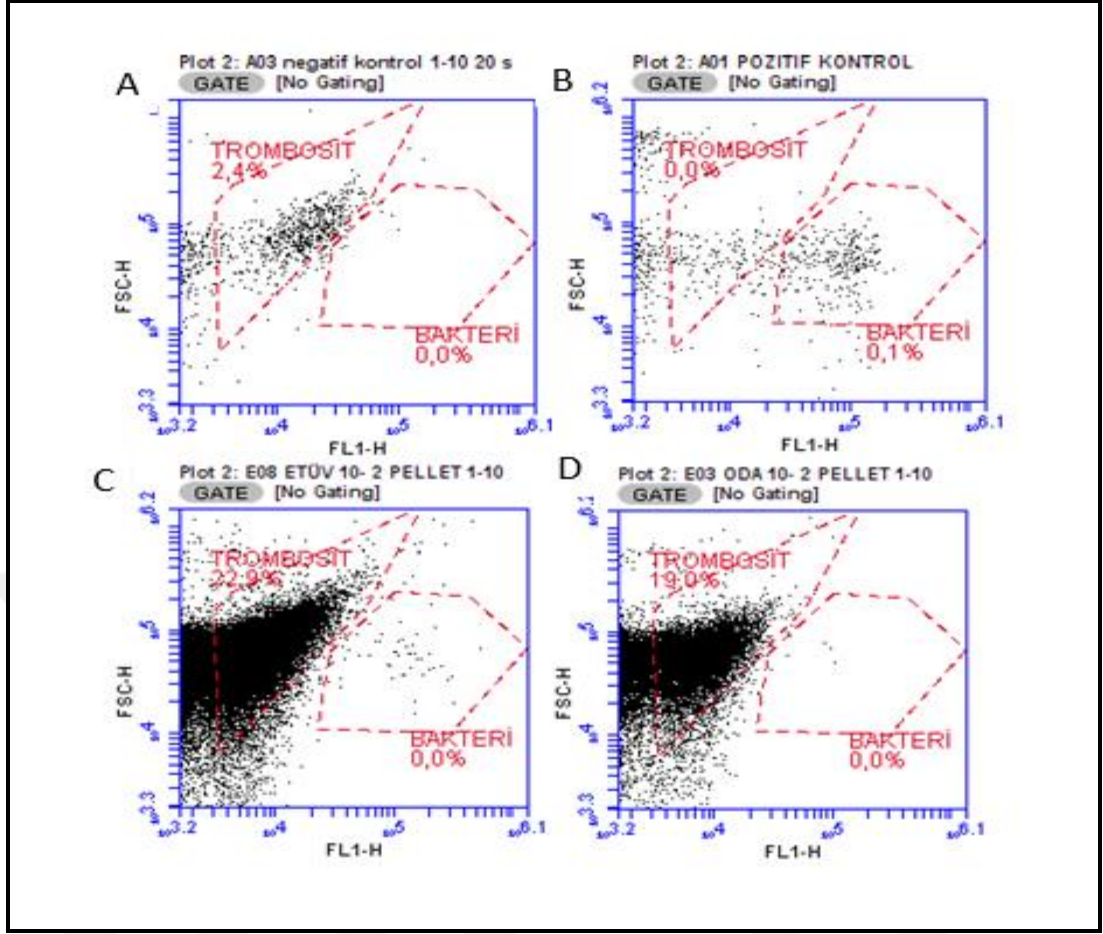
Şekil 7. *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatı için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü

- B. *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatu için dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^1 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

4.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının üreme kontrol sonuçları

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 suşu için üreme kontrol sonuçları incelendiğinde flow sitometrik yöntem ve BacT/ALERT® otomatize kan kültür sistemi arasında etüvde inkübe edilen örnekler için yüksek oranda uyum saptanmıştır. BacT/ALERT® otomatize kan kültür yöntemi ile tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16 -18 saat içinde üreme saptandı. Etüvde inkübe edilen 10^0 dışındaki dilüsyonlarda (10^1 , 10^2) üreme saptandı. Ancak oda ısısında inkübe edilen örnekler için flow sitometrik yöntemle üreme saptanamamıştır. Şekil 8'de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.

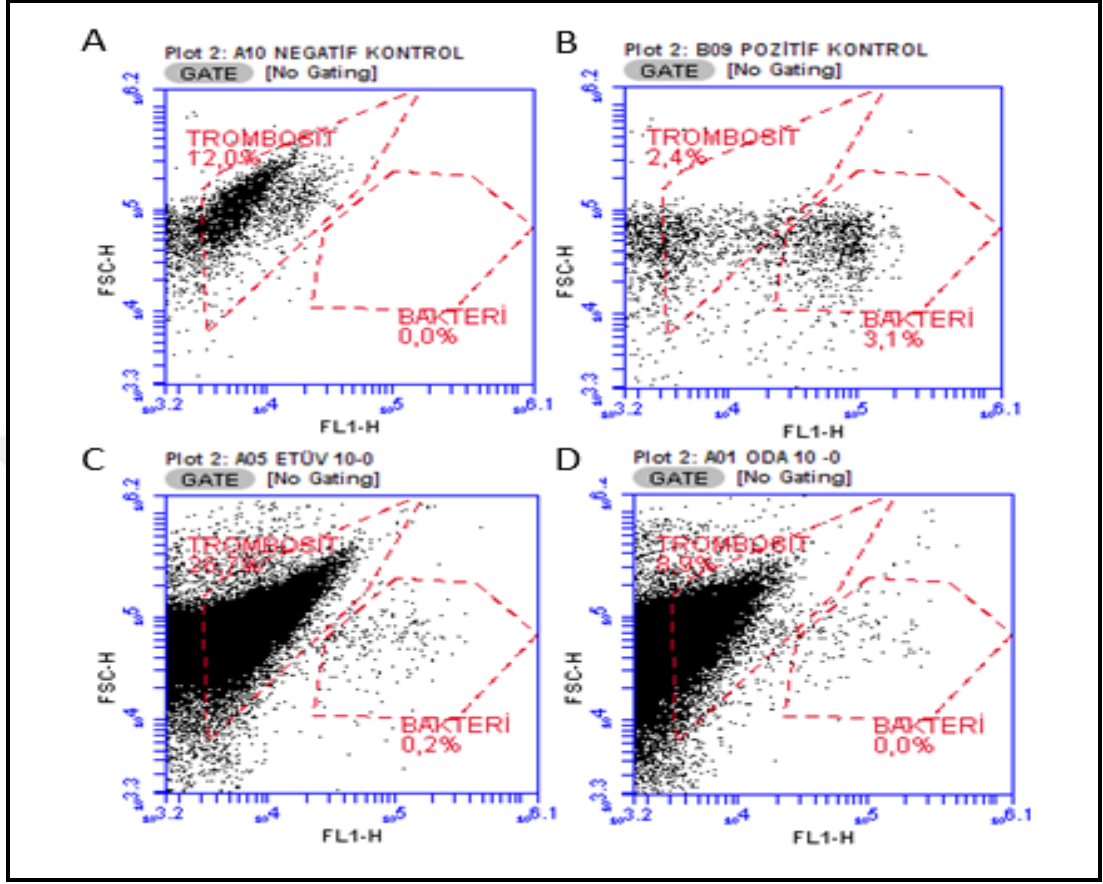


Şekil 8. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- B. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu için dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

Pseudomonas aeruginosa klinik izolatu için hazırlanan örneklerde BacT/ALERT® otomatize kan kültürü sisteminde tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16 -18 saat içinde üreme saptandı. Eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemede etüvde ve oda

ısısında 16-18 inkübe edilen örneklerin tümü için de üreme saptanmıştır. Şekil 9'da flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.

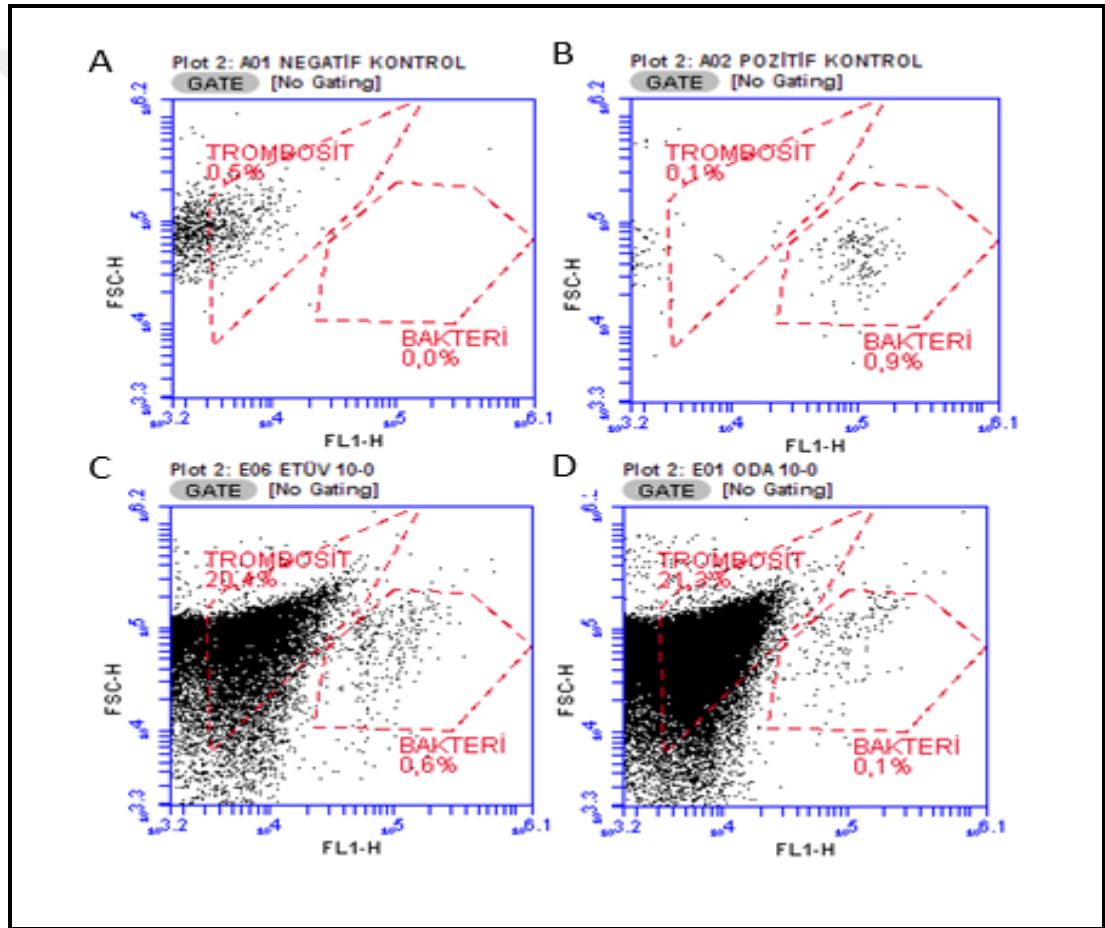


Şekil 9. *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolat için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- Pseudomonas aeruginosa* klinik izolat için dot blot görüntüsü
- Etüvde bir gece inkübe edilen, 10⁰ bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10⁰ bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

4.1.4. *Staphylococcus aureus* suşlarının üreme kontrol sonuçları

Staphylococcus aureus ATCC 29213 suşu için üreme kontrol sonuçları incelendiğinde flow sitometrik yöntem ve BacT/ALERT® otomatize kan kültür sistemi arasında etüvde ve oda ısısında inkübe edilen örneklerin tüm dilüsyonları için %100 oranda uyum saptanmıştır. BacT/ALERT® otomatize kan kültür yöntemi ile tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16 -18 saat içinde üreme saptandı. Eş zamanlı olarak flow sitometrik inceleme yapılmıştır. Şekil 10'da flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.

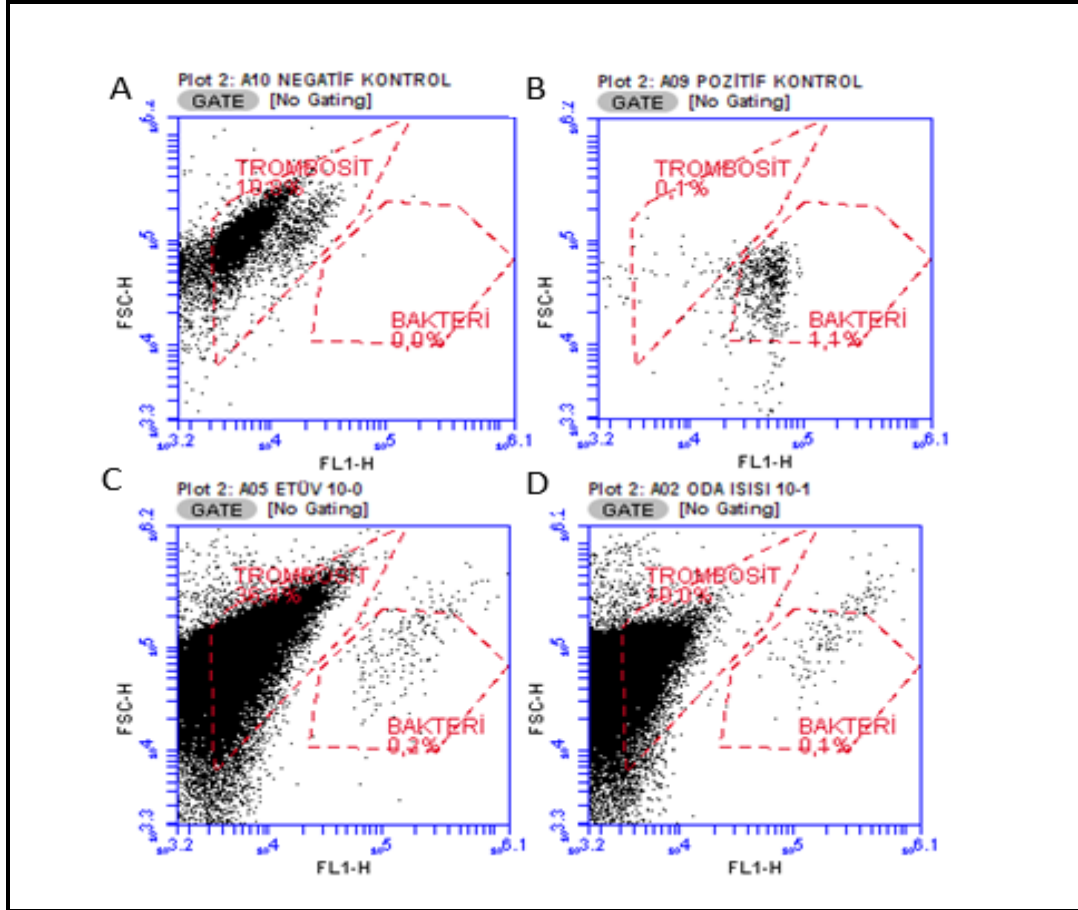


Şekil 10. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- B. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu için dot blot görüntüsü

- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^0 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^0 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

S.aureus klinik izolat için hazırlanan örneklerde BacT/ALERT® otomatize kültür sistemde tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16 -18 saat içinde üreme saptandı. Eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemede etüvde ve oda ısısında inkübe edilen örneklerin tümü için üreme saptanmıştır. Şekil 11'de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



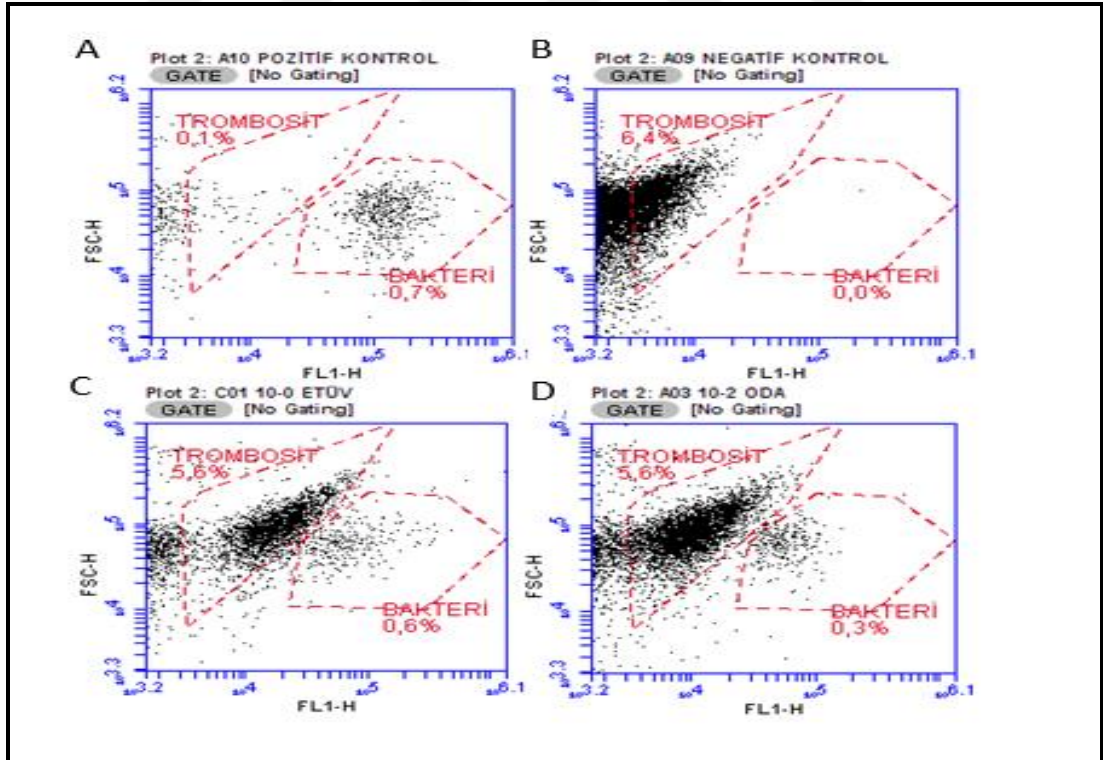
Şekil 11. *S. aureus* klinik izolat için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- B. *S. aureus* klinik izolat için dot blot görüntüsü

- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^0 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^1 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

4.1.5 *Enterococcus spp.* suşlarının üreme kontrol sonuçları

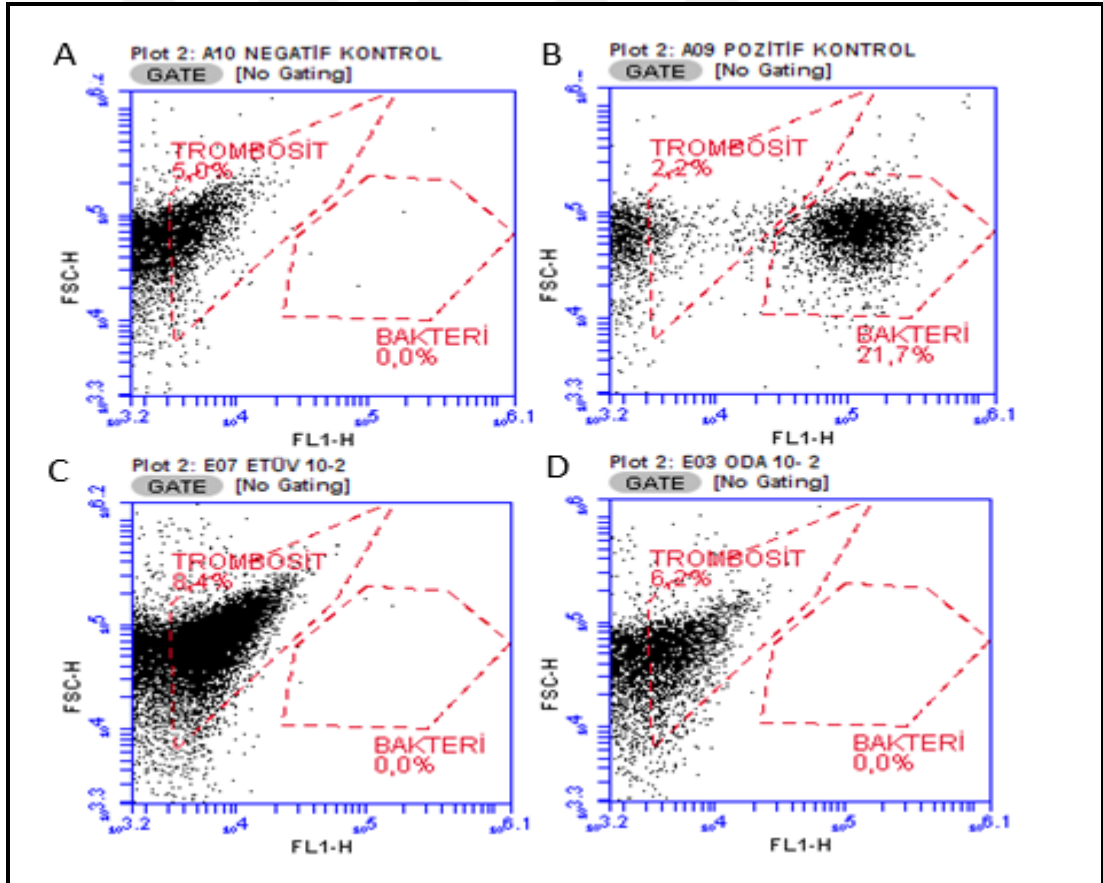
Enterococcus faecalis ATCC 29212 suşu için üreme kontrol sonuçları incelendiğinde flow sitometrik yöntem ve BacT/ALERT® otomatize kan kültür sistemi arasında etüvde ve oda ısısında inkübe edilen örnekler için %100 oranda uyum saptanmıştır. BacT/ALERT® otomatize kan kültür yöntemi ile tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16 -18 saat içinde üreme saptanmıştır. Eş zamanlı olarak flow sitometrik inceleme yapılmıştır. Şekil 12’de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 12. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu için dot blot görüntüsü
- B. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^0 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

E. faecalis klinik izolat için hazırlanan örneklerde BacT/ALERT® otomatize kültür sistemde tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16 -18 saat içinde üreme saptandı. Eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemede etüvde ve oda ısısında inkübe edilen örneklerin hiçbirinde üreme saptanamamıştır. Şekil 13'de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.

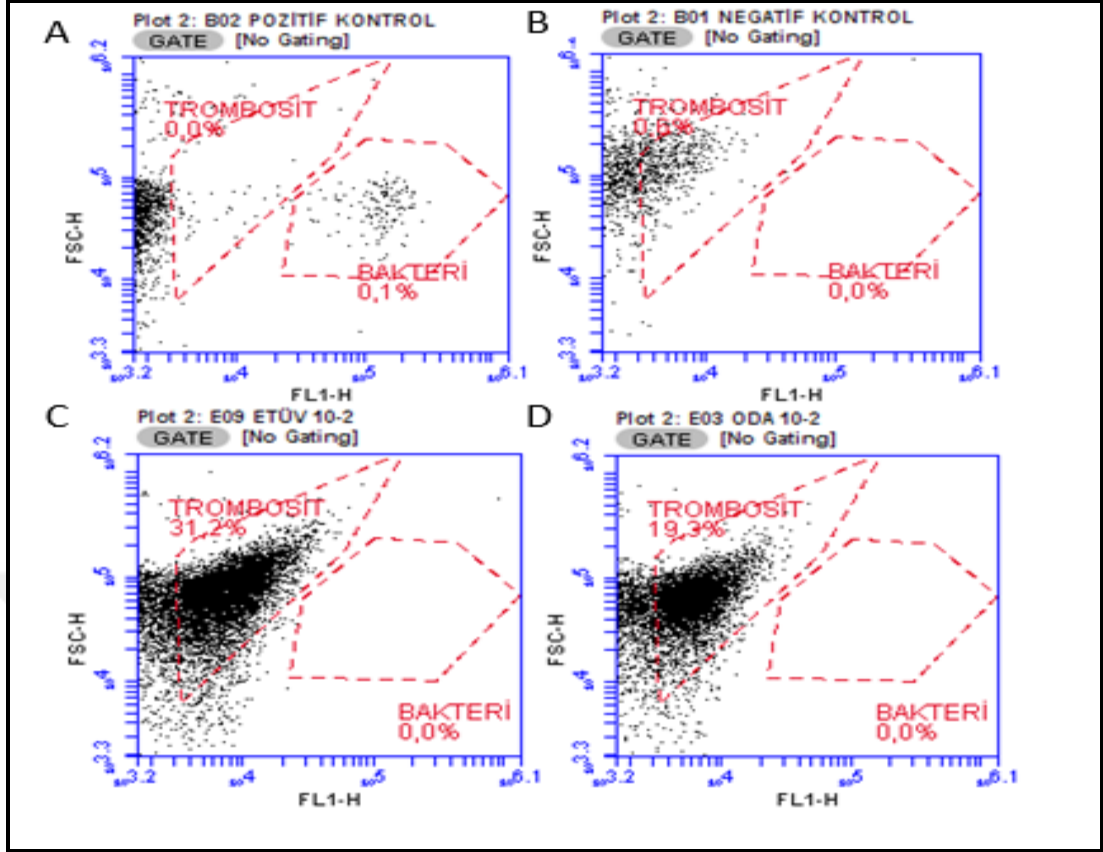


Şekil 13. *E. faecalis* klinik izolatı için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- B. *E. faecalis* klinik izolatu için dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

4.1.6. *Staphylococcus epidermidis* için üreme kontrol sonuçları

Staphylococcus epidermidis klinik izolat için hazırlanan örneklerde BacT/ALERT® otomatize kültür sistemde tüm dilüsyonlar (10^0 , 10^1 , 10^2) için 16-18 saat içinde üreme saptandı. Eş zamanlı yapılan flow sitometrik incelemede etüvde ve oda ısısında inkübe edilen örneklerin hiçbirinde üreme saptanamamıştır. Flow sitometrik incelemeler için kontroller tekrarlanmasına karşın sonuçta değişiklik görülmedi. Şekil 14'de flow sitometrik yöntemle elde edilen dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 14. *S.epidermidis* klinik izolatu için bir gece inkübasyon sonrası dot blot görüntüleri

- A. *S.epidermidis* klinik izolatu için dot blot görüntüsü
- B. Bakteri ile kontamine edilmeyen trombositlerin dot blot görüntüsü
- C. Etüvde bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilmiş örneğin dot blot görüntüsü
- D. Oda ısısında bir gece inkübe edilen, 10^2 bakteri ile kontamine edilen örneğin dot blot görüntüsü

Tablo 2. Spike örneklerin BacT/ALERT® BPA şişeleri ve flow sitometrik analiz sonuçları.

| SUŞLAR | ODA ISISI (22-24°C) | | | ETÜV (35-37°C) | | | BacT/ALERT® BPA | | |
|--|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ⁰ | 10 ¹ | 10 ² | 10 ⁰ | 10 ¹ | 10 ² | 10 ⁰ | 10 ¹ | 10 ² |
| <i>E.coli</i> ATCC 25922™ | negatif | negatif | negatif | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | pozitif |
| <i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603™ | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853™ | negatif | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif |
| <i>E.faecalis</i> ATCC 29212™ | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>S.aureus</i> ATCC 29213™ | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>K.pneumoniae</i> Klinik izolat | negatif | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>P.aeruginosa</i> Klinik izolat | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>S.aureus</i> Klinik izolat | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>E.faecalis</i> Klinik izolat | negatif | negatif | negatif | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>E.coli</i> Klinik izolat | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | pozitif | Pozitif |
| <i>S.epidermidis</i> Klinik izolat | negatif | negatif | negatif | negatif | negatif | negatif | pozitif | pozitif | Pozitif |

BacT/ALERT® BPA trombosit süspansiyonuna özel kan kültür şişeleri ile tüm spike örneklerde (n=33, standart suşlar ve klinik izolatlar dahil) ve tüm dilüsyonlarda (10⁰, 10¹, 10²) üreme saptandı (Tablo 2). Bu deneysel çalışmada BacT/ALERT® BPA yönteminin %100 duyarlı olduğu saptandı.

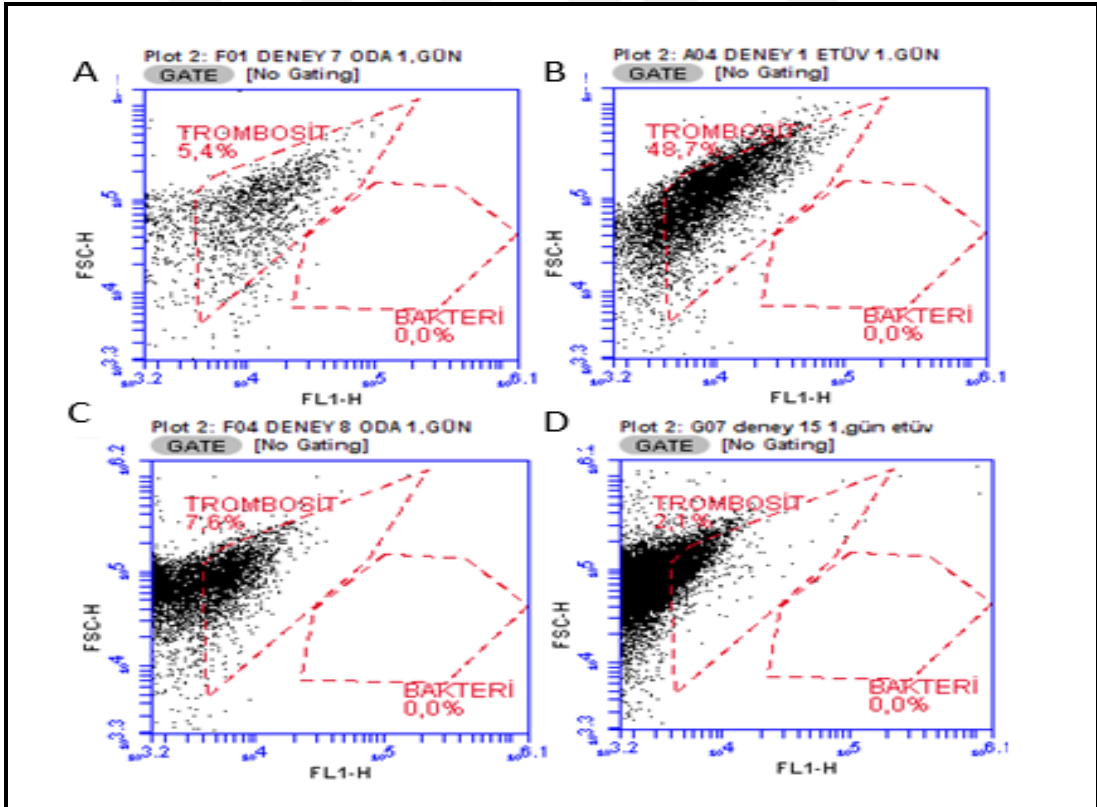
Standart suşlarla hazırlanan spike örneklerin flow sitometrik analizinde; *E.coli* standart suşu için oda ısısında ve etüvde, *K.pneumoniae* standart suşu için oda ısısında, *P.aeruginosa* standart suşu için oda ısısında tüm dilüsyonlarda ve etüvde inkübe (16-18 saat) edilen örneklerin 10⁰ CFU/ml konsantrasyonunda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edilemedi. Bunu dışındaki tüm örnekler ve tüm dilüsyonlarda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edildi (Tablo 2).

Klinik izolatlarla hazırlanan spike örneklerin flow sitometrik analizinde; *S.epidermidis* ve *E.faecalis* için tüm dilüsyonlarda oda ısısı ve etüvde 16-18 saat

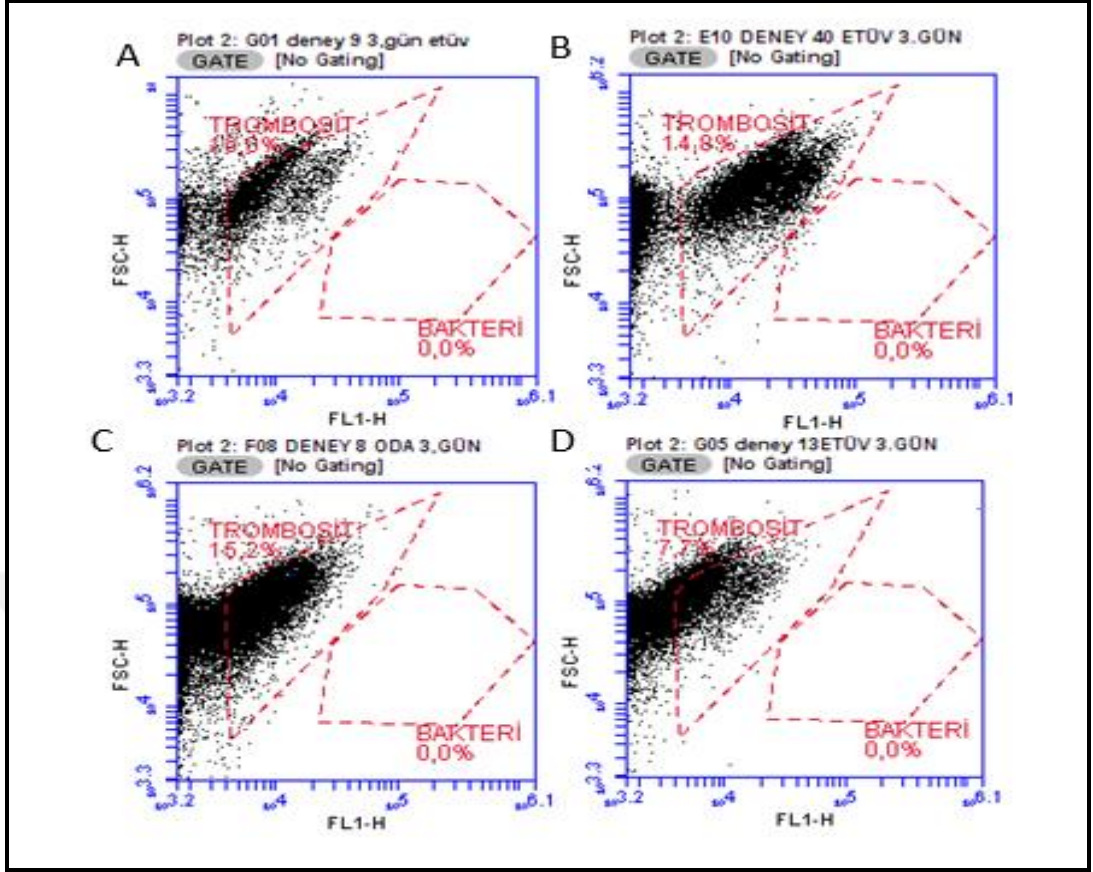
inkübasyon sonrası trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edilemedi. *E. coli* klinik izolatu için oda ısısında, *K.pneumoniae* klinik izolatu için oda ısısında tüm dilüsyonlarda ve etüvde inkübe (16-18 saat) edilen örneklerin 10^0 CFU/ml konsantrasyonunda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edilemedi. Bunu dışındaki tüm örnekler ve tüm dilüsyonlarda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edildi (Tablo 2).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz rutinde alınan 50 adet aferez trombosit süspansiyonu örneğinin sadece birinde (%2) BacT/ALERT® otomatize kan kültürü sisteminde pozitif sinyal alındı. Bu örnekte üreyen bakteri VITEK MS sistemi ile *Bacillus simplex* olarak tanımlandı. Flow sitometrik incelemede bu örnek de dahil tüm örneklerde için oda ısısında ve etüvde 1, 3 ve 5. günlerde pozitiflik saptanmadı.

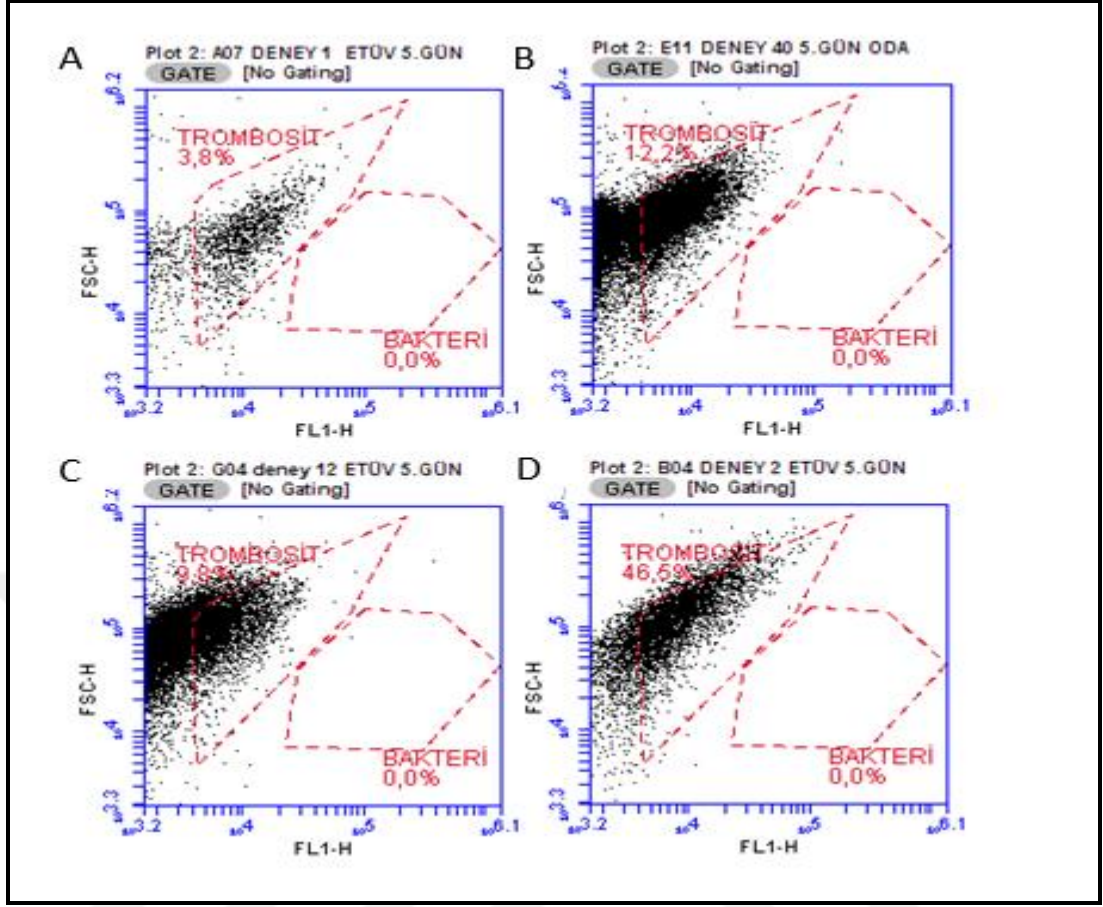
Şekil 15’de klinik örneklerin 1. gün dot blot görüntü grafikleri, Şekil 16’de 3.gün dot blot görüntü grafikleri, Şekil 17’de de 5. Gün dot blot görüntü grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 15. Klinik örnekler için 1.gün dot blot görüntü grafikleri



Şekil 16. Klinik örneklerin 3. gün dot blot görüntü grafikleri



Şekil 17. Klinik örneklerin 5. gün dot blot görüntü grafikleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Transfüzyonla bulaşan bakteriyel enfeksiyonlar, viral etkenler kadar sık görülmemekle birlikte mortalitesi viral enfeksiyonlardan daha fazladır. Trombosit süspansiyonları da oda ısısında saklama koşulu sebebiyle transfüzyon tıbbı açısından ciddi tehdit oluşturmaktadır (Hemovijilans Hemşireliği ve Transfüzyon Güvenliği Kitabı 2019).

Flow sitometri yönteminin mikrobiyoloji alanındaki kullanımı 30 yıl öncesine dayanmaktadır. Son zamanlarda bu yöntemin sık kullanılmaya başlanması önemli gelişmeleri de beraberinde getirmiştir (Steen et al. 1982). Ülkemizde flow sitometri ile trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, transfüzyon tıbbı açısından önemli bir sorun olan trombosit süspansiyonlarına bakteriyel bulaşın hastaya verilmeden önce kısa sürede (1-2 saat) flow sitometri ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Trombosit süspansiyonlarına bulaşta sıklıkla deri florası üyelerinin varlığı tespit edildiğinden, kontaminasyonun araştırıldığı çalışmalarda özellikle bu bakteriler seçilerek başlanmıştır (Agzie, Niguse, Tsegay, Kahsay and Mahmud 2019). Bu tez çalışmasında da trombositlerle bulaşı bildirilen bakterilerden seçim yapılarak, bu bakteriler üzerinden spike örnekler hazırlanmıştır.

Bakteriyel kontaminasyonun tespiti ve önlenmesi açısından birçok çalışmada FDA onaylı kültür şişesi olan BacT/ALERT® trombosit süspansiyonlarına özel kültür şişeleri kullanılmıştır. Farklı yöntemlerin araştırıldığı çalışmalarda da, incelenen yöntemlere ek olarak BacT/ALERT® yöntemi araştırılmıştır (Jacobs et al.2005, Levy, Neal and Herman 2018).

BacT/ALERT® trombosit süspansiyonları için özel kan kültür şişeleri ile tarama yöntemi kullanılarak kontamine trombositlerin transfüzyonunun engellendiği Munksgaard et al. tarafından bildirilmiştir. Bazı ülkelerde depolama süresi bakteriyel tespit yöntemine bağlı olarak 5 günden 7 güne de çıkarılabilmektedir (Munksgaard et al. 2004). Ancak Castro et al. BacT/ALERT® yönteminin trombosit süspansiyonlarının depolanma süresini 5 günden 7 güne çıkarmada tek başına yeterli olamayacağını

savunmuşlar ve ek bir yöntem ihtiyacı olduğunu vurgulamışlardır (Castro, Bueno, Barea and Gonzalez 2005). Bunun aksine 10 yıllık bir çalışmada; BacT/ALERT® yönteminin trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun saptanmasında başarılı olduğu ve raf ömrünün 7 güne uzatılmasında tek başına yeterli olduğu savunulmaktadır (Korte 2011). Ancak BacT/ALERT® sisteminin 24 saatten daha fazla inkübasyon süresi gerektirdiği bildirilmiştir (Johnson, Moriwaki and Johnson 2017). Bu tez çalışmasında; BacT/ALERT® trombosit süspansiyonuna özel kan kültür şişeleri ile tüm spike örneklerde (n=33, standart suşlar ve klinik izolatlar dahil) ve tüm dilüsyonlarda (10^0 , 10^1 , 10^2) 12-18 saatte üreme saptandı (Tablo 2). Bu yöntemin oldukça etkin ve duyarlı bir yöntem olduğu söylenebilir. Ayrıca az sayıda bakteri varlığını bile 24 saatten kısa bir sürede saptayabildiği gösterilmiştir.

Trombosit süspansiyonların bakteriyel kontaminasyonun flow sitometrik yöntemle araştırıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Bu çalışmalarda farklı flow sitometri cihazları ve farklı lizis solüsyonları kullanılmıştır. Flow sitometrik çalışmalarda trombositlerin parçalanması önemli bir sorundur. Bazı çalışmalarda ticari, bazılarında ise kimyasal lizis solüsyonları kullanılmıştır. Bunlar genellikle maliyeti artıran unsurlardır. Bu nedenle çalışmamızda pratik ve her laboratuvarında kolaylıkla yapılabilecek olan üç defa dondurup çözme işlemi ile trombositlerin parçalanmasını sağladık.

Dreier et al. flow sitometri yöntemi ile (BACTIFLOW, biomérieux, Fransa) bakteriyel kontaminasyonu araştırdıkları çalışmalarında 4 bakteri türünün (*K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*) standart suşlarını seçerek bunlarla spike örnekler üzerinde çalışma yapmışlardır. Standart suşlarla, 10^2 - 10^3 ve 10^3 - 10^4 CFU/ml konsantrasyonlarda spike örnekler hazırlayarak 37°C'de 15dk + 30°C'de 15dk inkübasyon sonrası Bactiflow cihazı ile analiz etmişler ve bu bakterilerin tümünü flow sitometrik yöntemle saptayabilmişlerdir. Bu çalışmada Bactiflow cihazında kullanılan bazı ticari kitler kullanmışlardır. Flow sitometrinin kısa sürede sonuç veren, duyarlı ve ucuz bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Dreier, Vollmer and Kleesiek 2009).

Mohr et al. 10 farklı standart bakteri suşu (*P. aeruginosa*, *B. cereus*, *E. cloaca*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Y. enterocolitica*, *S. marcescens*) ile 1-10 CFU/ml konsantrasyonda spike örnekler hazırlamışlar ve 64 saate kadar ajitatörde oda ısısında inkübe etmişlerdir. *E. cloaca* ve *P. acnes* diğer suşlarla hazırlanan spike örneklerde flow sitometri cihazı (BD FAC-SCAN, ABD) ile bakteri varlığını 21 saate kadar inkübasyon süresinde saptayabilmişlerdir. *E. cloaca* ve *P. acnes* gibi yavaş üreyen bakterileri ise daha uzun inkübasyon sürelerinde saptamışlardır. Bu araştırmacılar, flow sitometri yöntemi ile trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığının saptanabileceğini rapor etmişlerdir. Ancak yavaş üreyen bakteriler için inkübasyon süresinin 1-2 gün daha uzatılması gerektiğini belirtmişlerdir (Mohr et al. 2006).

Jhonson et al. 5 farklı bakteri suşu (*E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactia*, *S. marcescens*) ile yaklaşık olarak 10^2 - 10^4 CFU/ml konsantrasyonda spike örnekler hazırlamışlar ve 37°C'de 5dk inkübasyon ve 4dk 16000g'de sonrasında flow sitometri cihazı ile analiz yapmışlardır. Flow sitometrinin kısa sürede sonuç veren etkin ve duyarlı bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır (Jhonson 2017).

Bu tez çalışmasında standart suşlarla hazırlanan spike örneklerin flow sitometrik analizinde; *E.coli* standart suşu için oda ısısında ve etüvde, *K.pneumoniae* standart suşu için oda ısısında, *P.aeruginosa* standart suşu için oda ısısında tüm dilüsyonlarda ve etüvde inkübe (16-18 saat) edilen örneklerin 10^0 CFU/ml konsantrasyonunda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edilemedi. Bunu dışındaki tüm örnekler ve tüm dilüsyonlarda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edildi.

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin saptanmasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Klinik izolatlarla hazırlanan spike örneklerin flow sitometrik analizinde; *S.epidermidis* ve *E.faecalis* için tüm dilüsyonlarda oda ısısı ve etüvde 16-18 saat inkübasyon sonrası trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edilemedi. *E. coli* klinik izolatu için oda ısısında, *K.pneumoniae* klinik izolatu için oda ısısında tüm dilüsyonlarda ve etüvde inkübe (16-18 saat) edilen örneklerin 10^0 CFU/ml

konsantrasyonunda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edilemedi. Bunun dışındaki tüm örnekler ve tüm dilüsyonlarda trombosit süspansiyonlarındaki bakteri varlığı tesbit edildi (Tablo 2).

Fow sitometri ile oda ısısında inkübe edilen örneklerde daha düşük oranda pozitiflik saptanmıştır. Uygulanan oda ısısında bir gecelik inkübasyonda bakterilerin daha fazla oranda yeterli sayıya ulaşamadıkları söylenebilir. Ayrıca trombosit süspansiyonlarının oda ısısında bekletilmesinin bakterilerin üremesini kolaylaştırdığı ve uygun ortam sağladığı ifade edilse de etüvde inkübasyona göre daha az oranda ürediği görülmüştür. Flow sitometrik analizlerde oda ısısında inkübasyonun uygun olmadığı söylenebilir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz rutinde alınan 50 adet aferez trombosit süspansiyonu örneğinin sadece birinde (%2) BacT/ALERT® otomatize kan kültürü sisteminde pozitif sinyal alındı. Bu örnekte üreyen bakteri VITEK MS sistemi ile *Bacillus simplex* olarak tanımlandı. Flow sitometrik incelemede bu örnek de dahil tüm örneklerde için oda ısısında ve etüvde 1, 3 ve 5. günlerde pozitiflik saptanmadı. Bu bakterinin 16-18 saatlik inkübasyon süresinde yeterli sayıda üremediği ve daha uzun inkübasyon süreleri uygulanması gerektiği söylenebilir.

BacT/ALERT® kültür yöntemi kullanılarak taramanın yapıldığı bir çalışmada bulaş 1/5000 olarak tespit edilmiştir (Kleinman 2006). Yine Hollanda da yapılan farklı bir çalışmada 28.104 trombosit tarandığında 203 adet örnekte (%0.7) pozitif sinyal alınmıştır (Boekhorst, Beckers, Vos, Vermeij and Rhenen 2005). Bu tez çalışmasında BacT/ALERT® otomatize kan kültürü sistemi ile sadece bir rutin aferez trombosit süspansiyonu örneğinde (%2) bakteriyel kontaminasyon saptanmıştır. Genel bir çıkarım yapabilmek için daha çok sayıda ve daha uzun sürelerle çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak bununla bile en azından trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun araştırılması gerektiği, konunun ne kadar önemli olduğu ve ihmal edilmemesi gerektiği söylenebilir.

Vollmer et al. 472 adet aferez trombosit süspansiyonunu Bactiflow ve BacT/ALERT® sistemi ile bakteriyel kontaminasyon yönünden analiz etmişler ve BacT/ALERT® sistemi ile 2 örnekte pozitiflik saptamışlardır (Vollmer 2011). Bactiflow yöntemi ile bu örneklerin birinde pozitiflik saptayamamışlardır. Flow

sitometrik analizleri donasyonun 4.günü yapmışlardır. Bu tez çalışmasında donasyonun 1, 3 ve 5. günlerinde flow sitometrik analizler yapılmıştır. Yine Vollmer et al. 1956 trombosit süspansiyonunu Bactiflow ve BacT/ALERT® sistemi ile bakteriyel kontaminasyon yönünden analiz etmişlerdir. BacT/ALERT® sistemi ile 4 örnekte pozitiflik saptamışlardır. Bactiflow yöntemi ile sadece bu örneklerin ikisinde pozitiflik bulmuşlardır (Vollmer 2012).

Müller et al. 25 ay süreyle 34.631 trombosit süspansiyonunu (26.411 random süsp, 8.220 aferez süsp) Bactiflow sistemi ile bakteriyel kontaminasyon yönünden donasyonun 3.günü analiz etmişler ve ilk aşamada 228 örnekte, ikinci aşamada ise 24 örnekte pozitiflik saptamışlardır. Bunların sadece 12'sinde BacT/ALERT® sistemi ile bakteriyel kontaminasyon saptanmıştır. İlgili makalede yanlış pozitiflik oranını %0.03 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada Bactiflow sisteminin bakteriyel kontaminasyonu taramak amacıyla başarılı olduğunu rapor etmişlerdir. Bactiflow sistemi ile çalışılırken ticari olarak satılan kitler ve lizis solüsyonları kullanılmıştır (Müller et al. 2014).

Flow sitometri dışında farklı bir yöntem olarak özel bir sistem olan Scansystem'in denenerek bakterilerin tespit edilmeye çalışıldığı pilot bir çalışmada da sonuçlar başarılı bulunmuş, trombositlerin kan merkezinden çıkışında hızlı bir şekilde taranarak bulaşın engellenebileceği vurgulanmıştır (Schmidt 2005).

Bazı çalışmalarda lateral flow yöntemi ile çalışan ve hızlı sonuç veren bir ticari ürün (Verax PGD, ABD) kullanılmıştır (Jhonson et al.2017). Bu ürünün hızlı ve kullanışlı olduğu, ancak relatif olarak daha düşük duyarlılığa sahip olduğu belirtilmiştir (Störmer and Vollmer 2014, Jhonson et al.2017). Bu ürünün 10^3 - 10^4 CFU/ml altındaki bakteri konsantrasyonlarında duyarlılığının düştüğü rapor edilmiştir.

Kolorimetrik yöntemle ölçüm yapan ticari bir ürün olan BacTx (Immunitics, ABD) için de Verax'a benzer özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Jhonson et al.2017).

Tablo 3. Trombosit süspansiyonların bakteriyel kontaminasyonun araştırıldığı yöntemler ve karşılaştırmalı özellikleri

| KÜLTÜR YÖNTEMLERİ (ERKEN ÖRNEK ALIMI) | | | | | | | | | | |
|--|------------------|--|---|------------------------------------|----------------|--|------------|--------------------|---|---|
| Metot (Üretici Firma) | FDA/ CE-IVD | Saptama Prensipieri | Analitik Hassasiyet CFU/ml | Yanlış- Pozitiflik Oranı (%) | Örnek Hacim | Hazırlama/ Sonuç Verme Zamanı | Fiyat | | Avantajlar | Dezavantajlar |
| | | | | | | | Reaktifler | Ekipmanlar | | |
| BacT/Alert (BioMerieux) | Evet | Otomatize kan kültürü (CO ₂ üretiminin kolorimetrik tespiti) | 1-10 | 0.03-0.36 | 4-10 ml | 5 dk / bakteri yüküne bağlı olarak | 2 X <4€ | 15000€ < | Yüksek hassasiyet Kolay performans Otomasyonu | Örnekleme hata riski, bakteriyel yüke bağlı sonuç alma süresi, klinik değeri sınırlı (bugüne kadar negatif) |
| Bactec (BD Biosciences) | Hayır | Otomatize kan kültürü (CO ₂ üretiminin florimetrik tespiti) | 1-10 | 0.10 | 4-10 ml | - | - | - | - | “ |
| VersaTrek (Trek Diagnostics) | Hayır | Otomatize kan kültürü (kültür şişesindeki basınç değişiminin tespiti) | 10-20 | Belirtilmem iş | 4 ml | - | - | - | - | “ |
| Haemonetics Pall eBDS (Haemonetics) | Evet | Ekim sonunda oksijen tüketiminin elektrokimyasal tespiti | 1 | 0.008-3.5 | 2-3 ml | Belirtilmemiş / 24-30 h | - | - | - | “ |
| HIZLI YÖNTEMLER (GEÇ ÖRNEK ALIMI) | | | | | | | | | | |
| Bactiflow (BioMerieux) | Hayır | Flow sitometri (canlı hücrelerin görüntülenmesi) | 300-500 | 0.05-0.57 | 1ml | 5dk/1h | 4€ | 54.000€ | Hızlı, kolay, düşük örnekleme hata riski, yüksek klinik verimlilik | Düşük duyarlılık, ek bir yönteme ihtiyaç |
| PDG (Verax Biomedical Inc.) | Evet | Bakteriyel LPS ve/veya lipoteikoik asit lateral- flow | GP: 10 ³ - 10 ⁴ GN: 10 ³ - 10 ⁵ | 0.5-1.15 | 0.5ml | 5dk/1.5h | 18€ | - | “ | “ |
| BacTx ² (Immunetics) | Evet | Bakteriyel peptidoglikanın kolorimetrik tespiti | bazı örn.>10 ⁶ 10 ³ -10 ⁴ | Belirtilmem iş | 1 ml | 1 h | - | - | “ | “ |
| NAT ve 16S rDNA realtime PCR (In-House) | Evet | Nükleik asit amplifikasyonu | 20-35 | - | 0.5- 2.4ml | 30-60 dk /4 h | 6€ | 80000- 100000 € | “ | “ |
| GN= Gram Negatif | GP= Gram Pozitif | * Dreier et al. 2009 ve Störmer and Vollmer 2014 kaynaklarından uyarlanmıştır. | | | | | | | | |

Ayrıca “Pall enhanced bacterial detection system (Pall eBDS)” sisteminin BacT/ALERT® ile benzer duyarlılık oranlarına sahip olduğu vurgulanmıştır. Ancak BacT/ALERT® ve Pall eBDS 24 saatten daha fazla inkübasyon süresi gerektirdiği bildirilmiştir. Trombosit süspansiyonların bakteriyel kontaminasyonun araştırıldığı yöntemler ve karşılaştırmalı özellikleri Tablo 3’te sunulmuştur (Störmer and Vollmer 2014). Trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun saptanması için özel olarak geliştirilen Becton Dickinson şişeleri ile ilgili henüz bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Daha fazla sayıda bakteri suşu ve örnek incelenememiş olması, inkübasyon sürelerinin daha uzun tutulamamış olması, sadece aferez trombosit süspansiyonlarında analizlerin yapılması bu çalışmanın kısıtlayıcı faktörleri olarak sayılabilir.

Sonuçlar;

BacT/ALERT® sisteminin trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun tespitinde oldukça duyarlı olduğu tesbit edilmiştir.

Flow sitometri yöntemi, trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun tespitinde ve taranmasında başarılı bulunmuştur.

Flow sitometrik analizler, örneklerin hazırlanma süresi de dahil 2 saat gibi kısa bir sürede sonuçlanmaktadır.

Flow sitometrik analizlerin maliyeti düşüktür. Bu çalışmada uygulanan dondurup çözme yöntemi ile trombositlerin parçalanması maliyetleri daha da uygun hale getirmiştir.

Flow sitometri cihazı olan laboratuvarlarda öncesinde her bakteri için ayrı ayrı optimizasyon çalışmaları yapılarak rutinde kolaylıkla uygulanabilir. Hatta hastaya transfüzyon öncesi de yapılabilir.

Trombosit süspansiyonlarında henüz tek başına flow sitometrik analiz yapılarak, depolanma süresinin 7 güne çıkartılabileceği söylenemez.

Yeterli üreme sayısına ulaşmış bakteri varlığı söz konusu olduğunda flow sitometri yöntemiyle yüksek oranda saptanabilmektedir. Ancak az sayıda bakteri varlığında, bakteriyel kontaminasyonu saptama oranı düşmektedir.

Trombosit süspansiyonlarında ve diğer kan ürünlerinde bakteriyel kontaminasyonun araştırılması güvenli kan transfüzyonu sağlanması açısından önemlidir.

Bakteriyel kontaminasyonun engellenebilmesi için tarama sistemleri kullanmanın yanında donör seçiminin dikkatli yapılması, dezenfeksiyon uygulamalarının aksatılmaması gerekmektedir.

Flow sitometri yönteminin trombosit süspansiyonlarında bakteriyel kontaminasyonun tespitinde ve taranmasında kullanımı konusunda daha fazla sayıda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Adverse Effect of Transfusion. Chapter 5. 5th Handbook of Transfusion Medicine.
Editor: Dr. Derek Norfolk. United Kingdom Blood Services. Published by
TSO and available from: Online www.tsoshop.co.uk. Norwich, England,
2013.
- Agzie M, Niguse S, Tsegay E, Kahsay G, Mahmud MA. Bacterial contaminants
of stored blood and blood components ready for transfusion at blood banks
in Mekelle, Northern Ethiopia BMC Res Notes (2019) 12:169.
- Avcı İY, Turhan V, Çınar E. Kan Nakli ile Bulaşan Enfeksiyon Hastalıkları . T Klin
Tıp Bilimleri 2000, 20:317-324.
- Babayiğit MA, Bakır B. Hiv Enfeksiyonu ve Aids: Epidemiyoloji ve Korunma;
GATA Halk Sağlığı ABD/Ankara TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 2004:
3 (11).
- Basic Principles and Practice; Editors: Christopher Hillyer Leslie Silberstein Paul
Ness Kenneth Anderson John Roback. Blood Banking and Transfusion
Medicine, 2nd Edition, 2007, Elsevier Inc.
- Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd RY, Brander C. Transfusion-transmitted
infections. Journal of Translational Medicine 2007, 5:25.
- Blajchman MA, Goldman M. Bacterial Contamination of Platelet Concentrates:
Incidence, Significance, and Prevention. Seminars in Hematology, Vol38,
No 4, Suppl 11 (October), 2001: pp 20-26.
- Blood Transfusion Guideline. National Users's Board Sanquin Blood Supply
Organisation:© Copyright CBO, 2011.
- Boekhorst P.A.W, Beckers E.A.M, Vos M.C, Vermeij H, Rhenen D.J. Clinical
significance of bacteriologic screening in platelet concentrates. Transfusion
2005; 45:514-519.

- Brecher ME, Hay SN. Bacterial Contamination of Blood Components. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan. 2005, p. 195–204. doi: 10.1111/j.1365-3148.2011.01070.x
- Caram- Deelder C, Kreuger L, Jacobse J, Van Der Bom J.G, Middelburg R.A. Effect of platelet storage time on platelet measurements: a systematic review and meta- analyses. doi.org/10.1111/vox.12443.
- Castro E, Bueno J.L, Barea L, Gonza'lez R. Feasibility of implementing an automated culture system for bacteria screening in platelets in the blood bank routine. *Transfusion Medicine*, 2005, 15, 185–195.
- Çavuşoğlu H, Güneş NB, Pars H. Kan Ürünleri ve Güvenli Kan Transfüzyonu; *Türkiye Klinikleri J Nurs Sci*. 2015;7(1):49-57.
- Doğu MH, Sarı İ, Ertürk S, Hacıoğlu S ve Keskin A. Aferez trombosit donasyonu: Demografik bulgular, işlem ve ürün özellikleri. *Pamukkale Tıp Dergisi* 2015;8(1):19-22.
- Douglas DD, Taswel HF. The prevalence of HBV-DNA a1 detected by polymerase chain reaction in HBsAg negative, anti-HBc positive blood donors. *Transfusion* 1991; 31 (Supplement) : 653
- Dreier J, Vollmer T, and Kleesiek K. Novel Flow Cytometry–Based Screening for Bacterial Contamination of Donor Platelet Preparations Compared with Other Rapid Screening Methods. *Clinical Chemistry* 2009; 55:8 1492–1502.
- Fang CT, Chambers LA, Kennedy J, Strupp A, Fucci MH, Janas AJ, Tang Y, Hapip CA, Lawrence TB, Dodd RY. Detection of bacterial contamination in apheresis platelet products: American Red Cross experience, 2004. *Transfusion* 2005;45:1845-1852.
- Fasano R, Luban NL. Blood component therapy. *Pediatric Clinics*. 2008;55(2):421-45.

Gezer, E. Tıp Fakülteleri ve Eğitim Araştırma Hastaneleri Acil Tıp Uzmanları ve Acil Tıp Araştırma görevlilerinin Kan ve Kan Ürünü Transfüzyonları Hakkındaki Bilgi, Tutum ve Davranışlarının Değerlendirilmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Acil Tıp Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2015

Group G. False-positive alarms for bacterial screening of platelet concentrates with BacT/ALERT new-generation plastic bottles: a multicenter pilot study. *Transfusion* 2005;45:1267-1274.

Gün R. Hemovijilans Hemşireliği ve Transfüzyon Güvenliğine Katkısı. Sakarya Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya 2019.

Hemovijilans Hemşireliği ve Transfüzyon Güvenliği kitabı; Editör: Altındış M. Nobel Yayın Dağıtım Ankara 2019.

Hemşireler İçin Mikrobiyoloji Kitabı; Editör: Altındış M. Nobel Yayın Dağıtım İstanbul 2010.

Jacobs MR, Bajaksouzian S, Windau A, Palavecino EL, Yomtovian RA. Evaluation of the Scansystem method for detection of bacterially contaminated platelets. *Transfusion* 2005;45:265-269.

Jacobs MR, Smith D, Heaton WA, Zantek N and Good CE. Detection of bacterial contamination in prestorage culture-negative apheresis platelets on day of issue with the Pan Genera Detection test. *Transfusion* 51 (12), 2011; 2573-2582.

Johnson P, Moriwaki M, Johnson J. Rapid, sensitive detection of bacteria in platelet samples with Fountain Flow Cytometry. 2017.

Kandoi S, Kumarl P, Patra B, Vidyasekar P, Sivenesan D, Vijayalakshmi S, Rajaopal K, Verma RS. Evaluation of platelet lysate as a substitute for FBS in explant and enzymatic isolation methods of human umbilical cord MSCs. *Scientific Reports* (2018) 8:12439.

Kaya S, Alanoğlu G, Polat M, Sipahi T. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezinin 2000- 2007 yılları Tarama Test Sonuçları. S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2009: 16(2)/13-15.

Kleinman SH, Kamel HT, Harpool DR, Vanderpool SK, Custer B, Wiltbank TB, Nguyen KA, Tomasula PA. Two-year experience with aerobic culturing of apheresis and whole blood-derived platelets. *Transfusion* 2006;46:1787-1794.

Kocazeybek B. Kan ve Kan Ürünleriyle Bulaşan İnfeksiyonlar: Rutin Tarama Testleri ve Moleküler Tanı Yöntemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2003 Cilt (Sayı) 34 (3).

Korte D, Curvers J, De Kort W.L.A.M, Hoekstra T, Van Der Poel CL, Beckers E.A.M, Marcelis JH. Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. *Transfusion* 2006;46:476-485.

Korte D. 10 Years Experience with Bacterial Screening of Platelet Concentrates in the Netherlands. *Transfus Med Hemother* 2011;38:251–254.

Levy JH, Neal MD, Herman JH. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. *Critical Care* (2018) 22:27.

McDonald C.P, Pearce S, Wilkins K, Colvin J, Robins S, Colley L, Taylor J, Barbara J.A.J. Pall eBDS: an enhanced bacterial detection system for screening platelet concentrates. *Transfusion Medicine*, 2005, 15, 259–268.

Mohr H, Lambrecht B, Bayer A, Spengler HP, Nicol SB, Montag T, and Müller TH. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates. *Transfusion*, 2006;46:41-49.

Munksgaard L, Albjerg L, Lillevang ST, Gahrn-Hansen B, Georgsen J. Detection of bacterial contamination of platelet components: six years' experience with the BacT/ALERT system. *Transfusion* 2004;44:1166-1173.

- Müller B, Walther-Wenke G, Kalus M, Alt T, Bux J, Zeiler T, Schottstedt V. Routine bacterial screening of platelet concentrates by flow cytometry and its impact on product safety and supply. doi.org/10.1111/vox.12214.
- Özdemir GN, Apak H. Çocuklarda kan transfüzyonunun temel ilkeleri. Turkish Pediatrics Arciheve/Turk Pediatri Arşivi. 2009;44.
- Öztürk G. Kanın hazırlanması, saklanması ve nakli. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum dizisi No: 44-Mayıs 2005; 43-54.
- Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Detecting Bacterial Contamination in Platelet Products. Clin. Lab. 2006; 52:443-456.
- Ramirez-Arcos S, Jenkins C, Dion J, Bernier F, Delage G, Goldman M. Canadian experience with detection of bacterial contamination in apheresis platelets. Transfusion 2007; 47:421-429.
- Rutter S, Snyder EL. How do we ... integrate pathogen reduced platelets into our hospital blood bank inventory? Transfusion 2019;00:1-9.
- Savaşçı Ü, Avcı İY. Kan ve Kan Bileşenleri ile Bulaşan Enfeksiyon Etkenleri ve Nükleik Asit Amplifikasyon Test (NAT) Yönteminin Önemi. İKSST Derg 8(3):125-134, 2016.
- Schmidt M, Weis C, Heck J, Montag T, Nicol SB, Hourfjar MK, Schaefer V, Sireis W, Roth WK, Seifried E. Optimized Scansystem platelet kit for bacterial detection with enhanced sensivity; detection within 24h after spiking. Vox Sanguinis(2005) 89, 135-139.
- Steen HB, Boye E, Skarstad K, Bloom B, Godal T, Mustafa S. (1982). Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects, and quantitation of antibody binding. Cytometry, 2: 249-57.
- Störmer M, Vollmer T. Diagnostic Methods for Platelet Bacteria Screening: Current Status and Developments. Transfus Med Hemother 2014; 41:19-27.

Tekin A. Kan ve Kan Ürünleri Nakli ile Bulaşan Enfeksiyonlar. Konuralp Tıp Dergisi 2011;3(2):38-45.

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Kitabı; Editör: Altındış M. Nobel Yayın Dağıtım İstanbul 2013.

Ulusal Hemovijilans Rehberi 2016. Türkiye 2008 Ulusal IPA (Katılım Öncesi Mali Yardım) Programı. TR0802,15-01/001- Türkiye’de Kan Tedarik Sisteminin Güçlendirilmesi Teknik Destek Projesi 2016.

Vollmer T, Dreier J, Schottstedt V, Bux J, Tapernon K, Sibrowski W, Kleesiek K, Knabbe K. Detection of bacterial contamination in platelet concentrates by a sensitive flow cytometric assay (BactiFlow): a multicentre validation study. doi: 10.1111/j.1365-3148.2012.01166.x.

Vollmer T, Engemann J, Kleesiek K, Dreier J. Bacterial screening by flow cytometry offers potential for extension of platelet storage: results of 14 months of active surveillance. Transfusion Medicine, 2011, 21, 175–182.

XXI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kurs Kitabı, Antalya 2018.

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onay Formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 03/01/2019-E.80



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 71522473/050.01.04/297
Konu : Girişimsel Olmayan Etik Kurul
Başvuru Dosyası Hk.

Sayın Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 12.12.2018 tarihli 233 sayılı başvurunuz.

Destekleyicisi olduğunuz "Trombosit Süspansiyonlarında Bakteriye Kontaminasyonun, Otomatize Kan Kültürü ve Flow Sitometri Yöntemi İle Araştırılması" isimli çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen şekilde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir.
Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER
Etik Kurulu Başkanı

Yücel DEMİR
Etik Kurulu Sekr.

Güvenli Elektronik
İmzalı Aşılı İle Aynıdır.

03...101...12019

Evrakı Doğrulamak İçin : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V=BEND42568>

Fakülte Girişimsel Olmayan Etik Kurulu Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dekanlığı, Korucuk Kampüsü, Korucuk, Adapazarı/Sakarya
Tel:264 295 6630 Faks:264 295 6629
E-Posta :tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ağ :www.tip.sakarya.edu.tr



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Mehtap Bolat

Doğum yeri ve tarihi: Ardahan 20.10.1987

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu:-

İletişim adresi ve telefonu: Erenler/Sakarya bukkooo@hotmail.com

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

2015-2019 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbi Yüksek Lisans Programı

2004-2008, Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi

2001-2004, İstanbul Nevzat Ayaz Anadolu Lisesi

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

2008-2019, Hemşire

IV- Mesleki Deneyimi

2008-2010, Üsküdar Hospital Türk Hastanesi Yenidoğan Yoğun Bakım
Ünitesi/İSTANBUL

2010-2012, Nefromed Diyaliz Merkezi/SAKARYA

2015-2019 Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Doğumevi
Kampüsü Çocuk Acil Birimi / SAKARYA

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayımları:

Makaleler

Semra Öz, Mehtap Bolat. Alkhurma hemorajik ateş virüsü / Flora
Dergisi 2017 doi: 10.5578/flora.61921

Poster Bildiriler

- **M.Bolat**, MP.Adıgöl, T.Demiray, M.Koroglu, M.Altındış. Aferez trombosit bağışçılarında tarama testleri sonuçlarının incelenmesi; SAKARYA. PS-94. XI. Ulusal Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, 11-15 Mart 2018, Antalya.
- MP.Adıgöl, **M.Bolat**, T.Demiray, S.Özbayraktar, M.Köroğlu, M.Altındış. Transfüzyon merkezine başvuran bağışçılarının ret nedenlerinin incelenmesi; SAKARYA. PS-95. XI. Ulusal Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, 11-15 Mart 2018, Antalya.
- MP.Adıgöl, **M.Bolat**, Ü.Özçelik, T.Demiray, M.Köroğlu, M.Altındış. Kliniklere göre aferez trombosit kullanım durumunun değerlendirilmesi; SAKARYA. PS-96. PS-95. XI. Ulusal Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi, 11-15 Mart 2018, Antalya

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- Mikrobiyota, Probiyotikler ve Akılcı Beslenme Sempozyumu 9 Mayıs 2018, Sakarya Üniversitesi Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya.
- XI. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbi Kongresi , Kurs Programı, 11-15 Mart 2018, Antalya.
- I.Sakarya Hemovijilans Sempozyumu 6 Mart 2019, Sakarya.
- Sakarya Grip/Ekonomisi Sempozyumu 18 Ekim 2017, Sakarya.
- Etkin Bakım; Sıfır Enfeksiyon Sempozyumu 26 Mart 2019, Sakarya Üniversitesi Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya.
- Mikrobiyota Çalıştayı 10 Mayıs 2017, Sakarya Üniversitesi Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya.

VIII- Diğer Bilgiler

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri