

# Kemik İliği Nakli Yapılan Hastalardan Nakil Öncesi Alınan Kök Hücre Örneklerinin Mikrobiyolojik Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Şöhret AYDEMİR\*, Meltem İŞIKGÖZ TAŞBAKAN\*\*, Ajda TURHAN\*,  
Oğuz Reşat SİPAHİ\*\*, Hüsnü PULLUKÇU\*\*, Feriha ÇİLLİ\*, Sercan ULUSOY\*\*

\* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

\*\* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

## ÖZET

Periferik kan hematopoietik kök hücre prosedürlerinin mikrobiyolojik tetkiki kalite kontrolünün rutin bir parçasıdır. Bu kültürler sonucunda sporadik olarak kontamine bakterilerle karşılaşılabilir. Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1 Ocak 1999-31 Aralık 2006 tarihleri arasında kemik iliği nakilleri öncesinde alınan kök hücre örneklerinin bakteriyolojik kültür sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kültür sonuçları bakteriyoloji laboratuvarının veri tabanından retrospektif olarak taranmıştır. Toplam 2759 örneğin 151 (%5.5)'inde mikrobiyolojik üreme olmuştur. En sık izole edilen etken koagülaz negatif stafilokoldardır (%66.2).

Sonuç olarak, hematopoietik kök hücrelerinin rutin kültürlerinde pozitiflik oranı düşüktür. Kemik iliği ve periferik kan kök hücreleri güvenli bir şekilde elde edilse de, işleme, saklama, çözündürme ve transfüzyon işlemlerinin monitörizasyonu için standartların iyileştirilmesi gerekli görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ototolog kemik iliği nakli, Kontaminasyon, Koagülaz negatif stafilokok, Kök hücre

## SUMMARY

### Evaluation of Microbiologic Culture Results of Peripheral Stem Cell Samples Collected Before Bone Marrow Transplantations

Microbiological follow up is a part of quality control in peripheral stem cell procedures. Bacterial contamination of peripheral blood hematopoietic cells collected for autologous bone marrow transplantation, is encountered sporadically. The aim of this study was to evaluate bacteriologic culture results of peripheral stem cell samples, collected before bone marrow transplantations between 1 January 1999-31 December 2006. The culture results were obtained from database of the bacteriology laboratory, retrospectively. There were bacterial growth in 151 (5.5%) of 2759 samples. Coagulase-negative staphylococci were the most commonly isolated microorganisms (66.2%). As a result, the positivity rate of the routine cultures of hematopoietic progenitor cells is low. Although bone marrow and peripheral blood progenitor cells are collected safely, better standards for manitorization of collection, processing, cryo-preservation, thawing and transplantation seem to be necessary.

Key Words: Autologous bone marrow transplantation, Contamination, Coagulase negative staphylococci, Stem cell

Periferik kök hücreler neoplastik hastalıkların pek çoğunda, otolog transplantasyon amacıyla hematopoietik progenitor hücrelerin kaynağı olarak yaygın kullanılmaktadır<sup>[1]</sup>. Dünya genelinde yaklaşık olarak her yıl 30-40 bin hematopoietik progenitor hücre transplantasyonu gerçekleştirilmektedir<sup>[2]</sup>. Transplantasyon için ürünün yeterli olması ve birtakım kalite kontrol şartlarına uygunluğu gerekmektedir. Bu kontrol içerisinde mikrobiyolojik açıdan ürünün steril olması önemli bir parametredir.

Periferik kök hücre ürünlerinin kontaminasyonu dikkate alındığında, birçok çalışmada bazı bakteri türleri ve dermatofitlerin kriyo-saklama sırasında canlı kalabildikleri ve nadiren de olsa aferez ürünlerinin mikrobiyolojik açıdan kontamine olabildikleri gösterilmiştir<sup>[3]</sup>. Bazı çalışmalarda bu kontaminasyonun ender olarak da olsa alıcıda sistemik enfeksiyona neden olduğu ileri sürülmektedir<sup>[4,5]</sup>. Dolayısıyla kök hücre ürünlerinin işlemleri sırasında oluşabilecek kontaminasyonların engellenmesine çalışılmaktadır. Hücrelerin toplanması, işlemlerden geçirilmesi, çözündürme aşamalarının herhangi birinde kontaminasyon gerçekleşebilmektedir<sup>[6,7]</sup>. Klinik olarak önemli patojenlerle laboratuvar kontaminasyonunu ayırmak oldukça güçtür. Bu bağlamda, uygulanacak mikrobiyolojik analizler, kalite kontrol işleminin önemli bir kısmı haline gelmektedir.

Bu çalışmada, bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen kök hücre örneklerinin bakteriyolojik kültür sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

#### MATERYAL-METOD

Ocak 1999-Aralık 2006 tarihleri arasında hastanemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarına gönderilen kök hücre örneklerinin kültürleri BacTAlert (BioMérieux Inc, Durham, NC, USA) kan kültürü otomatize sisteminde yapılmıştır. Üreme saptandıktan sonra kanlı agar ve "eosin methylene blue (EMB)" agar besiyerine yapılan ekimlerden izole edilip klasik ve otomatize yöntemlerle tanımlanan bakterilerin NCCLS ve CLSI önerileri doğrultusunda antibiyotik duyarlılıkları yapılmıştır<sup>[8]</sup>. Kök hücre kültürlerinin sonuçları veri tabanından retrospektif olarak taranmıştır.

Elde edilen veriler Microsoft Excell programına ve SPSS 13.0 paket programına kaydedilmiştir. İstatistiksel analiz için ki-kare testi kullanılmıştır.

#### BULGULAR

Toplam 606 hastanın (371 erkek, 235 kadın) 2759 örneği incelemeye alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması  $41.5 \pm 16.5$  (1-78 yaş) dir. Çocuk hasta-

lar grubun %8.4 (51/606)'ünü oluşturmaktadır (34 erkek, 17 kız). Laboratuvarımızda incelenen 2759 kök hücre örneğinden 99 hastaya ait 151 (%5.5)'inde üreme saptanmıştır. Yıllara göre bakıldığında; 1999 yılında 57 hastanın 12'sinin, 2000 yılında 75 hastanın 10'unun, 2001 yılında 41 hastanın üçünün, 2002 yılında 42 hastanın altısının, 2003 yılında 85 hastanın 10'unun, 2004 yılında 84 hastanın 14'ünün, 2005 yılında 109 hastanın 20'sinin ve 2006 yılında 113 hastanın 11'inin örneklerinde üreme saptanmıştır. En sık izole edilen etken koagülaz negatif stafilokok (KNS)'lardır (100/151-%66.2). Bunun *Candida* spp. 10/151 (%6.6) ve *Staphylococcus aureus* 7/151 (%4.6) izlenmektedir. İzole edilen bakteriler ve yıllara göre dağılımı Tablo 1 de gösterilmektedir.

Çocuk hastalara ait 122 örneğinin 12 (%9.8)'sinde üreme saptanmıştır, buna karşın yetişkin hastaların 2637 örneğinin 139 (%5.3)'ünde üreme vardır ( $p < 0.05$ ). Kadın hastalarla erkek hastaların kültürlerindeki üreme sıklığı karşılaştırıldığında; kadınlarda 1121 şişenin 64'ünde, erkeklerde 1638 şişenin 87'sinde üreme vardır, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).

#### TARTIŞMA

Kemik iliği veya periferik kök hücrelerin kontaminasyonu; toplama sırasında, saklama ya da çözündürme ve infüzyon işlemleri sırasında gerçekleşebilmektedir. Kemik iliği alındıktan sonra antikoagülan ve prezervatif çözelti içeren steril, tek kullanımlık filtrasyon sistemi içerisine transfer edilmektedir. Dolayısıyla bakteriler sisteme cilt florasından veya çevresel kaynaklardan geçebilmektedir<sup>[9]</sup>. Diğer işlemler "buffy coat" hazırlama, kırmızı küre veya T-hücre boşaltılması ya da pozitif-negatif hücrelerin ayrılması aşamalarını içermektedir. Bu basamakların her biri kontaminasyon kaynağı olabilir<sup>[4,10]</sup>. Hastadan alınan otolog kemik iliği kriyo-saklama işlemiyle saklanır ve dolayısıyla çözündürme sırasında ya da infüzyon sırasında kontamine olabilir<sup>[11]</sup>. Periferik kan hematopoietik hücrelerin kontaminasyon kaynakları da kemik iliğinkine benzemektedir.

Standart transfüzyon ürünlerinin bakteriyel kontaminasyonu nadirdir fakat önemli sonuçlar doğurabilir<sup>[12]</sup>. Kök hücre nakillerinin kontaminasyonu ile ilgili çalışma sayısı azdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada 2001-2005 yılları arasında toplanmış 3078 kök hücre kültür örneğinden 37 (%1.2)'sinin kontamine olduğu ve en sık kontamine edici bakterinin bizim sonuçlarımıza benzer şe-

Tablo 1. Kök hücre kültürlerinden izole edilen bakteriler ve yıllara göre dağılımı

Etkenler/yıllar	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Toplam
Koagülaz negatif stafilokok	18	7	3	4	15	12	24	17	100
<i>Candida</i> spp.		4		1	3		2		10
<i>Staphylococcus aureus</i>		2				2	3		7
<i>Enterococcus</i> spp.		2			1		4		7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		3				2		1	6
<i>Streptococcus viridans</i>				1			3		4
<i>Bacillus</i> spp.		1				1	2		4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							4		4
<i>Corynebacterium</i> spp.						1	1	1	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1						1		2
<i>Acinetobacter baumannii</i>						1			1
<i>Escherichia coli</i>							1		1
Mikrokök							1		1
<i>Ochrobactrum</i> spp.								1	1
Toplam	19	19	3	6	19	19	46	20	151

kilde %86.2 ile (32/37) KNS'ler olduğu ve bu türlerin verildiği hiçbir hastada (muhtemelen verilen profilaktik antibiyotikler nedeniyle) infeksiyon gelişmediği bildirilmiştir<sup>[13]</sup>. Bizim çalışmamızda 2117 kültür örneğinin 2005 (%95)'inde üreme olmadığı görülmüştür. Koruyucu olarak kullanılan dimetil-sülfoksit (DMSO)'ün antibakteriyel özelliği olduğu bilinmesine rağmen, en yaygın kontaminanlar olan gram-pozitif bakteriler (*Bacillus* spp. *Corynebacterium* spp. ve mikroköklar gibi) kriyo-saklama işleminden sonra zayıf oranda da olsa yaşamlarını sürdürebilmektedir<sup>[10,14]</sup>. DMSO kullanılarak yapılan kriyo-saklama işleminden sonra bakterilerin tam olarak eradike edilemediği düşünülmektedir.

KNS'lerin klinikle ilişkili olup olmadığı tartışılabilir. Kernik iliği alınması ve örneğin saklanması sırasında oluşan bulaş kontaminasyon olarak değerlendirilebilir. Lorrea ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada toplama sonrasında, hemen kriyo-saklama öncesinde ve çözündürüldükten sonra kök hücre örnekleri alınarak kültürleri yapılmıştır. Üreme sonuçlarının her üç basamakta da korelasyon gösterdiği görülmüştür<sup>[9]</sup>. Bizim çalışmamızda bu örneklerin hastalara verilirken ve verildiyse de klinik sonuçları hakkında bilgimiz olmadığından KNS kök hücrelerinin gerçek patojen olup olmadığı konusunda net bir yorum yapamamaktayız.

Günümüzde hematolojik malniteler nedeniyle bulaşıklığı baskılanan hastaların sayısı giderek artmaktadır. Kernik iliği nakli planlanan hastalarda, nakil öncesi alınan kök hücre örneklerinin bakteriyolojik yönden dikkatle değerlendirilmesi, bu hastalara verilecek ürünlerin iyatrojenik sepsis oluşturabilme potansiyeline sahip olması nedeniyle oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, hematopoietik kök hücrelerinin rutin kültürlerinde pozitiflik oranı düşüktür. Kernik iliği greftlerinin toplanması ve işlev görmesi sırasında özellikle cilt flora bakterileriyle kontaminasyonu gerçekleşmektedir. Kernik iliği ve periferik kan kök hücreleri aslında güvenli bir şekilde elde edilmektedir. Yine de işleme, saklama, çözeltirme ve transfüzyon işlemlerinin monitörizasyonu için standardizasyon ile düşük düzey kontaminasyon engellenebilir.

#### KAYNAKLAR

1. Gratwohl A. The role of the EBMT activity survey in the management of hematopoietic stem cell transplantation. European Group for Blood Marrow Transplantation. Int J Hematol 2002;76 (Suppl 1):386-92.
2. Kamble R, Pant S, Selby GB, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell grafts: incidence, clinical outcome, and cost-effectiveness: an analysis of 735 grafts. Transfusion 2005;45:874-8.

3. Larrea L, De La Rubia J, Saler MA, et al. Quality control of bacterial contamination in autologous peripheral blood stem cells for transplantation. *Haematologica* 2004;89:1232-7.
4. Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC, Hurd DD, Ramsay NF, McCullough J. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion* 1991;31:521-6.
5. Attarian H, Bensinger WI, Buckner CD, McDonald DL, Rowley SD. Microbial contamination of peripheral blood stem cell collections. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:699-702.
6. Farrington M, Matthews I, Marcus R, Scott MA, Caffrey E, Hunt CJ. Contamination of bone marrow transplants from peripheral blood. *BMJ* 1994;309:958.
7. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. *Transfusion Med* 1997;4:165-72.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15<sup>th</sup> Information Supplement. Document M100-A15. 2005.CLSI, Wayne, Pa.
9. Justice HK, Farrington M, Hunt C, et al. Bacterial contamination of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfusion Med* 1996;6:103-10.
10. Rowley SD, Davis J, Dick J, et al. Bacterial contamination of bone marrow grafts intended for autologous and allogeneic bone marrow transplantation: incidence and clinical significance. *Transfusion* 1988;28:109-12.
11. Webb LJ, Coral FS, Andersen JW, et al. Sources and sequelae of bacterial contamination of hematopoietic cell components: Implications for the safety of hematotherapy and graft engineering. *Transfusion* 1996;36:782-8.
12. Kuchnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al. Transfusion transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001;41:1493-9.
13. Patah PA, Parmar S, McManis J, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: Clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:365-8.
14. Mollison PL. *Blood transfusion in clinical medicine*. Oxford: Blackwell, 1983;7:761-7.

**Yazışma Adresi:**

Uzm. Dr. Meltem İŞIKGÖZ TAŞBAKAN

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

İnfeksiyon Hastalıkları ve

Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bornova-İZMİR

e-mail: tasbakan@yahoo.com

Makalenin Geliş Tarihi: 01.07.2007

Kabul Tarihi: 17.11.2007