بررسی میزان شیوع آلودگی باکتریایی واحدهای خون بند ناف ذخیره شده در بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی قم از سال ۹۱ تا ۹۴

محسن شیخ حسن[۱]، مریم فرجی[۲]، مهدیه غیاثی[۳*]

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۲. کارشناس ارشد فیزیولوژی، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۳. کارشناس ارشد سلولی مولکولی، آزمایشگاه سلول های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۶/۰۵)

چکیده

زمینه و هدف: خون بند ناف به عنوان یک منبع مهم و اساسی برای دستیابی به سلول های بنیادی خونساز جهت درمان انواع بیماری های خونی استفاده شده است. احتمال ایجاد آلودگی باکتریایی در زمان خونگیری از بند ناف و نیز در طی فرآیندهایی مربوط به پردازش آن وجود دارد. هدف از این پژوهش، بررسی و تعیین منشا و نوع آلودگی باکتریایی نمونه های آلوده بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی قم می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه، تعداد ۳۷۰ واحد خون بند ناف جمع آوری شد و از نظر آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناخت منشا آلودگی، از هر دو مرحله خونگیری و در نهایت قبل از ذخیره سازی، کشت باکتریایی تهیه و تعیین سویه شد. نتایج توسط نرم افزار spss آنالیز شد.

یافته ها: از مجموع ۳۷۰ واحد خون بند ناف، تعداد ۵ (۱٫۳۵٪) واحد آلودگی باکتریایی داشتند. تعداد ۲ واحد (۰٫۵۴٪) آن در مرحله خونگیری از نظر کشت باکتریایی مثبت بودند و ۳ مورد (۰٫۸۱٪) پس از انجام فرایند پردازش مثبت شده بودند.

نتیجه گیری: در این بررسی، میزان آلودگی باکتریایی ۱٫۳۵٪ گزارش شد و در هر دو مرحله خونگیری و پردازش ایجاد شده بود و اکثریت این باکتری های جدا شده از نوع استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بودند، لذا با توجه به اهمیت و ارزش بالای سلول های بنیادی خون بند ناف و عوارض خطرناک ناشی از پیوند نمونه عفونی، تدوین برنامه هایی به منظور آموزش جهت اخذ استریل سازی نمونه، ضروری می باشد.

کلیدواژگان

آلودگی باکتریایی، خون بند ناف، سلول‌های بنیادی خون ساز.

* نویسنده مسئول، رایانامه: mahdieh.ghiasi@yahoo.com

مقدمه

حجم وسیعی از تحقیقات دنیای امروز در جهت دستیابی هر چه بیشتر به قابلیت های سلول های بنیادی در درمان بیماری ها و تمایز دادن آنها به دیگر سلول های مورد نیاز و در ادامه تولید اندام های حیاتی و دانش مهندسی بافت متمرکز یافته اند. درمان انواع سرطان نیز از دیگر کاربرد های سلول های بنیادی است که امروزه توجه زیادی را به خود معطوف داشته است(۱). از سال ۱۹۸۸ خون بند ناف به عنوان یک منبع مهم و اساسی برای دستیابی به سلول های بنیادی خونساز جهت انجام پیوند برای گیرندگان خویشاوند و غیر خویشاوند در درمان انواع بیماری های خونی مورد استفاده قرار گرفته است(۲ و ۳). سلول های بنیادی خونساز خون بند ناف در درمان اختلالات خونی همچون کم خونی آپلاستیک و فانکونی، هموگلوبینوری حمله ای شبانه(PNH)، لوسمی های حاد و مزمن، لنفوم هوچکین و غیر هوچکین، بتاتالاسمی ماژور، کم خونی داسی شکل، سندروم کاستمن، نقص چسبندگی لکوسیتی، سندرم دی جرج، ترمبوسیتوپنی مادرزادی، مولتیپل میلوما، لوسمی پلاسماسل، سندرم لش نیهان کاربرد دارد (۳). در واقع سلول بنیادی موجود در بند ناف می تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای سلول های بنیادی مغز استخوان و خون محیطی در انجام پیوند برای گیرنده های انتخابی قرار گیرد (۴). پیوند سلول های بنیادی خونساز حاصل از خون بند ناف، حتی زمانی که سلول های مربوط به اهدا کنندگان نسبتا سازگار از نظر کمپلکس اصلی سازگاری سنجی (MHC) مورد استفاده قرار می گیرند، با کاهش خطر ابتلا به فرم شدید بیماری واکنش پیوند علیه میزبان (GVHD) همراه می شود (۵). همچنین با توجه به ویژگی های دیگر این خون، ذخیره سازی آن و تشکیل بانک های خون بند ناف پیشنهاد شده است. آلودگی میکروبی خصوصا آلودگی های باکتریایی مشکلات بسیار مهمی را برای افراد گیرنده پیوند که دارای سیستم ایمنی شدیدا سرکوب شده و ضعیف می باشند، ایجاد می کند (۶). طبق گزارش های انجام شده توسط سازمان FDA، از ۱۸۲ مورد مرگ و میر ناشی از انتقال خون بین سال های ۱۹۸۶ تا ۱۹۹۱، ۲۹ مورد (۷۲./.) به علت تزریق پلاکت و بقیه مربوط به فرآوردهای گلبول قرمز بوده که با عوامل میکروبی آلوده شده بودند (۷). آلودگی باکتریایی فراورده های خونی از مشکلات نسبتا شایع و بسیار خطرناک در سازمان‌های انتقال خون می‌باشد (۸). طبق مطالعات انجام شده، بیشتر باکتری‌های انجام شده از فراورده‌های خونی آلوده، فلور نرمال پوست بوده که در اثر ناکافی بودن و استاندارد نبودن عمل ضدعفونی محل خونگیری، روش های تهیه و نگهداری فراورده های خونی، روش های بررسی و زمان نمونه گیری به نمونه منتقل شده اند (۹ و ۱۰). خون بند ناف در دو مرحله ابتدا در حین خونگیری از بند ناف به واسطه حضور باکتری های ناحیه تناسلی و دیگری در هنگام انجام فرایند جداسازی و ذخیره سازی سلول ها می تواند توسط عوامل میکروبی آلوده گردد. استفاده از روش کشت، هر چند نیاز به زمان زیادی جهت رسیدن به تشخیص دارد، اما به علت حساس بودن می توان از این روش بهره برد (۷). در پژوهش حاضر، واحدهای خون بند ناف که از بیمارستان های مختلف استان تهران و استان قم به بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی ارسال شده بود، از لحاظ تعیین مرحله و نوع آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند و سپس به شناسایی آنها اقدام گردید.

مواد و روش‌ها

در این بررسی، تعداد ۳۷۰ نمونه خون بند ناف که از نظر آزمایشات ویروسی منفی گزارش شده بود، به

صورت تصادفی انتخاب شده و در دو فاز از نظر آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. نحوه نمونه گیری بدین صورت است که بلافاصله بعد از زایمان، نمونه خون توسط ماماهای آموزش دیده از ورید بندناف متصل به جفت، اخذ و داخل کیسه ای که حاوی ماده ضد انعقاد ست، جمع آوری شد که در این حین اصول بهداشتی جهت استریل سازی نمونه رعایت شده است. کیت مخصوص نمونه ها کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه بانک خون بند ناف منتقل شدند و قبل از جداسازی و ذخیره سازی مورد آزمایش میکروبی قرار گرفتند. در دو مرحله احتمال آلودگی وجود دارد: در حین اخذ نمونه خون بند ناف و ارسال به آزمایشگاه، دیگری در طی انجام فرایند پردازش، استخراج و ذخیره سازی سلول های بنیادی خون بندناف (شکل ۱). در این روند به منظور شناسایی آلودگی های میکروبی، از کشت خون که روش حساسی برای جداسازی باکتری ها می باشد، در هر دو مرحله استفاده شد (۷). بنابراین زیر هود لامینار در شرایط کاملا استریل، از هر کیسه خون بند ناف در مرحله اولیه ۳ میلی لیتر نمونه تهیه شد که ۰,۵ سی سی آن جهت بررسی شمارش سلولی اولیه و مابقی آن جهت کشت خون میکروبی مورد آزمایش قرار گرفت. برای کشت خون معمولا از بطری های حاوی محی کشت خون استفاده می‌شود. قبل از ترزیق درپوش بطری‌های کشت خون، با الکل ۷۰٪ ضد عفونی شد و سپس نمونه خون مورد نظر به داخل آن تزریق شد و ویال های کشت خون به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. جهت کشت و جداسازی گونه باکتریایی از لوپ استاندارد (0.001 ml) استفاده و نمونه خون داخل ویال را بر روی محیط های EMB (ائوزین متیلین بلو اگار)، مولر هینتون آگار، بلاد اگار، مانیتول سالت آگار (MSA) و شکلات آگار کشت داده شد و بعد از قرار دادن به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد، مورد مطالعه قرار گرفت. چنانچه روی محیط کشت بیش از ۱×۱۰^{۳} عدد باکتری در یک میلی لیتر وجود داشت، کشت مثبت تلقی میشود. سپس طی رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی نوع کوکسی مثبت و منفی مشخص گردید. همچنین لازم به ذکر است، جهت شناسایی باکتری های جدا شده در هر مرحله کشت میکروبی، از روش های استاندارد CLSI همچون تست های کاتالاز برای تعیین هویت کوکسی های گرم مثبت و برای تشخیص نوع دقیق باکتری نیز از تست های کوآگولاز و DNAase استفاده شد. بعد از انجام مراحل پردازش، استخراج و جداسازی سلول های بنیادی خون بند ناف دقیقا قبل از اضافه نمودن DMSO، جهت بررسی کشت میکروبی دوم در این مرحله نیز به میزان ۱ سی سی در شرایط کاملا استریل از نمونه خون بند ناف برداشت و داخل ویال مورد نظر تخلیه شد. سپس مانند مرحله قبل، بررسی میکروبی بر روی آن صورت گرفت.

شکل ۱- مراحل مختلف جداسازی و ذخیره سازی سلول های خون بند ناف

یافته‌ها

طبق بررسی های انجام شده از مجموع ۳۷۰ واحد نمونه ارسال شده به بانک خون بند ناف، تعداد ۵ (۱,۳۵٪) نمونه خون بندناف دارای آلودگی باکتریایی

بودند. با توجه به کشت میکروبی انجام شده از این تعداد، جواب کشت باکتریایی ۲ واحد (۰,۵۴٪) نمونه خون بندناف در مرحله خونگیری، مثبت گزارش شد. همچنین جواب کشت تعداد ۳ مورد (۰,۸۱٪) نمونه خون بند ناف ارسالی بعد از فرایند پردازش، مثبت اعلام شد. اصولا باکتری های جدا شده از نوع استافیلوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بود. به این ترتیب که ابتدا تعیین هویت کوکسی گرم مثبتی چون باکتری استافیلوکوک ارئوس با تست کاتالاز مثبت، رشد در محیط مانیتول سالت آگار، DNAase مثبت و تولید کوآگولاز با استفاده از پلاسمای سیتراته خرگوش روی لام و لوله تایید شد و سپس شناسایی استافیلوکوک اپیدرمیدیس (کوکسی گرم مثبت) با توجه به تست کاتالاز مثبت، عدم رشد در محیط کشت مانیتول سالت آگار (منفی)، DNAase منفی و تست کوآگولاز منفی، از طریق تشکیل حاله حساس به دیسک نووبیوسین انجام شد. در این میان جواب کشت باکتریایی تعداد ۳۶۵ واحد خون بند ناف ارسال شده از سال ۹۱ تا ۹۴ معادل ۹۵٪ درصد در هر دو مرحله منفی گزارش شد. سپس با توجه به نتایج به دست آمده، آنالیز آماری توسط نرم افزارSPSS نسخه ۱۸ انجام شد و بر اساس اطلاعات به دست آمده نمودار ترسیم گردید.

بحث

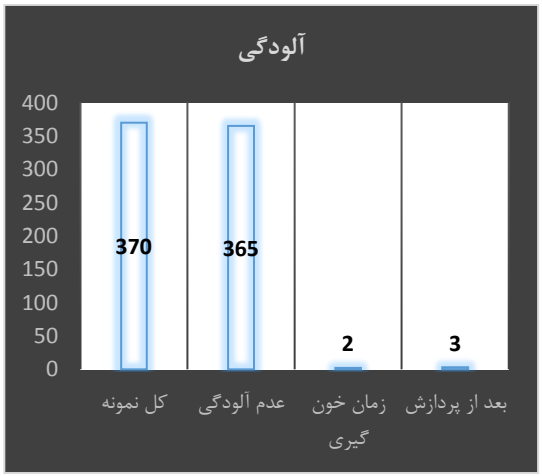
نخستین پیوند سلول های بنیادی خون بند ناف سال ۱۹۸۸ در فرانسه و توسط Gluckman و همکارانش صورت گرفت. آنان بهبود بیماری پسر مبتلا به آنمی فانکونی را با استفاده از پیوند سلول های بنیادی از خون بند ناف متعلق به خواهر وی گزارش کردند (۱۱ و ۱۲). یکی از شاخص های بانکداری موثر و کارآمد نسبت نمونه های جمع آوری شده است که قابلیت و شرایط ذخیره سازی به منظور استفاده آتی جهت پیوند به بیماران نیازمند را داشته باشد. عواملی وجود دارند که ممکن است موجبات عدم ذخیره سازی را برای ذخیره سازی سلول های بنیادی خون بند ناف فراهم کنند (۱۳). از عوامل مهمی که می تواند سبب از بین رفتن قابلیت ذخیره سازی سلول های خون بند ناف شود، وجود آلودگی باکتریایی در آن ها می باشد. که به دنبال آن، تزریق این سلول ها به سلول های گیرنده می تواند سبب ایجاد واکنش های خفیف تا شدید و حتی مرگ آن ها گردد (۹ و ۱۳). بنابراین، اهمیت غربالگری میکروبی خون بند ناف و فرآوردهای آن امری واجب و ضروری به نظر می رسد. طبق گزارشات اعلام شده از مرکز انتقال خون کشور اسپانیا، ۹۵٪ باکتری های جدا شده از واحدهای خون بند ناف را فلور نرمال پوست و دستگاه تناسلی گزارش کرده اند و کمتر از ۱۵٪ آن ها باکتری های دارای پاتوژنیسیته بالا مانند استرپتوکوس آگالاکتیه بوده اند (۱۴). در مطالعه انجام شده در کشور هلند ۸۵٪ موارد آلوده مربوط به باکتری های دارای پاتوژنیسیته پایین بوده اند (۱۵). در مطالعه حاضر میزان آلودگی باکتریایی بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی قم از مجموع ۳۷۰ نمونه ارجاع شده به این مرکز حدود ۵٪ گزارش شد و حدود ۹۵٪ آن عدم آلودگی را نشان دادند. موارد مثبت به باکتری استافیلوکوک اورئوس و استافیلو کوک اپیدرمیدیس آلوده بودند (شکل ۲). که ۲٪ آن مربوط به زمان نمونه گیری از بندناف بود و ۳٪ آن در مرحله پردازش ایجاد شد. طبق تحقیقات به عمل آمده در بانک خون بند ناف رویان، میزان آلودگی باکتریایی ٪۳/۰۲ گزارش شد. در این مطالعه نیز همه باکتری های جدا شده جزء فلور پوست و دستگاه تناسلی بودند و هیچ باکتری دارای پاتوژنیسیته بالا جدا نشد که ۹۶/۲ این آلودگی ها مربوط به زمان نمونه گیری از بند ناف اعلام شد (۱۶). طبق مطالعه دیگر در بانک خون بند ناف میلان ایتالیا، کمتر از ۱٪

گزارش شده است(۱۳ و ۱۷). امروزه تعدادی از بانک های خون بندناف، کاهشی در میزان آلودگی های باکتریایی تا حد کمتر از ۵٪ را گزارش کردند که به دلیل آموزش های انجام شده برای مراحل جمع آوری و ایجاد راه کارهای دقیق و استاندارد جهت ضد عفونی محل خونگیری بوده است (۱۳ و ۱۸ و ۱۹ و۲۰). در سال ۲۰۰۱ قوانین Netcord-Fact standard وضع شد. بر طبق آن، نمونه های آلوده با باکتری های پاتوژنیسیته پایین با توجه به نوع باکتری، میزان مقاومت سیستم ایمنی فرد گیرنده پیوند و تعیین میدان حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری آلوده کننده و مراقبت های تکمیلی قبل و بعد از عمل پیوند، امکان ذخیره برای بانک های خونی که عضو شبکه بانک خون بند ناف جهان هستند، وجود دارد (۱۳ و ۱۵ و ۱۹ و ۲۱). اما در ایران به دلیل اینکه چنین قوانینی تصویب نشده است و با توجه به اهمیت روز افزون ذخیره سلول های بنیادی خون بند ناف و ضرورت استفاده در درمان انواع بیماری های خونی، تمامی نمونه هایی که از لحاظ آلودگی میکروبی مثبت باشند رد شده و قابل ذخیره سازی نیستند.

شکل ۲- نمایش نمونه مثبت خون بند ناف که در محیط کشت میکروبی رشد نموده است

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق نشان می دهد که از مجموع ۳۷۰ واحد خون بندناف، ۵٪ آلودگی باکتریایی وجود دارد که مرتبط به زمان نمونه گیری و بعد از انجام پردازش است (شکل ۳) که این امر نشان دهنده درصد بسیار پایین آلودگی در بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی در طی ۴ سال گذشته است. اکثریت آلودگی ها مربوط به باکتری های استافیلوکوک اورئوس و استافیلوکوک اپیدرمیدیس بود. بنابراین با توجه به اهمیت و ارزش بالای سلول های بنیادی خون بند ناف در عصر حاضر و نظر به تاثیرات بسیار منفی آلودگی های میکروبی بر کیفیت و سلامت این سلول ها، تدوین برنامه های آموزشی مدون هر چه بیشتر ماماها و افراد نمونه گیر در بخش های زایمان در جهت اخذ صحیح نمونه خون بند ناف و پس از آن در مراحل جداسازی و پردازش توسط کارشناسان آزمایشگاهی، مطابق با استاندارد های موجود جهانی امری ضروری و غیر قابل انکار است.



شکل ۳- بررسی کشت میکروبی ۳۷۰ واحد خون بند ناف در سال‌های ۱۳۹۱ تا ۱۳۹٤

تقدیر و تشکر

در نهایت از کلیه همکاران محترم آزمایشگاه سلول‌های بنیادی و بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی استان قم و تمامی عزیزانی که ما را در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و سپاس را داریم.

منابع و مآخذ

1. Gluckman E. Cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant.2006; 12: 808–812.
2. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. New Engl J Med 1989; 321(17): 1174-8.
3. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. New Engl J Med 1996; 335(3): 157-66.
4. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J Med 1998; 339(22): 1565-77.
5. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. Blood 1996; 88(3): 795-802.
6. FDA. Current good tissue practice for manufacturers of human cellular tissue based products. Inspection and enforcement; Proposed rule. 2001. Available from: URL: www.access.gpo.gov/su_docs/aces140.html
7. Liu HW, Yuen KY, Shui-Yiny cheng T, Lee KB, Chau KM, Ho PL, et al. Reduction of platelet transfusion associated sepsis by short-term bacterial culture. Vox Sang 1999; 77(1): 1-5.
8. Theise ND. Stem Cell Plasticity: Tools for Investigation and Repair. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2005; 40: 110-114.
9. Leiby DA, Kerr KL, Campos JM, Dodd RY. A retrospective analysis of microbial contaminants in outdated random-donor platelets from multiple sites. Transfusion 1997; 37(3): 259-63 .
10. Sazama K. Bacteria in blood for transfusion. Arch Pathol Lab Med 1994; 118: 350-65.
11. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA identical sibling. N Engl J Med. 1989; 321: 1174-1178.
12. Ende M, Ende N. Umbilical Cord Blood Banking: Implications for Perinatal Care ProvidersJ Obstet Gynaecol Can. 2005; 27 (3): 263–274.
13. Lecchi L, Ratti I, Lazzari L, Rebulla P, Sirchia G. Reasons for discard of umbilical cord blood units before cryopreservation. Transfusion 2000; 40(1): 122- 4.
14. Winn WC, Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Procop GW, et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2005. P.737- 856.
15. Honohan A, Olthuis H, Bernards AT, van Beckhoven JM, Brand A. Microbial contamination of cord blood stem cells. Vox Sanguinis 2002; 82(1): 32-8.
16. Ahmadi M.h, Temperance St., Ebrahimi M, intimate Q, M AD, the well-mannered, Zand (i), the zarabi. Bacterial contamination of cord blood units stored in a cord blood bank embryo from 1383 to 1386. Volume 6, Issue 4, December 88, 257-265. [In Persian]
17. Lazzari L, Corsini C, Curioni C, Lecchi L, Scalamogna M, Rebulla P, et al. The Milan Cord Blood Bank and the Italian Cord Blood Network. J Hematother 1996; 5(2): 117-22.
18. M-Reboredo N, Díaz A, Castro A, Villaescusa RG. Collection, processing and cryopreservation of umbilical cord blood for unrelated transplantation. Bone Marrow Transplant 2000; 26(12): 1263-70.

19. Armitage S, Warwick R, Fehily D, Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking in London: the first 1000 collections. Bone Marrow Transplant 1999; 24(2): 139-45.

20. Kögler G, Somville T, Göbel U, Hakenberg P, Knipper A, Fischer J, et al. Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. Klin Padiatr 1999; 211(4): 224-32.

21. Netcord-Fac. International Standards for Cord Blood Collection. Processing, Testing, Banking, Selection and Release, 2nd edn. Fact Accreditation Office, NB, USA, 2001.