

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**INVESTIGAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA EM CONCENTRADOS
PLAQUETÁRIOS E AVALIAÇÃO DE
TÉCNICAS CONVENCIONAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rosiéli Martini

Santa Maria, RS, Brasil, 2012

**INVESTIGAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM
CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS E AVALIAÇÃO DE
TÉCNICAS CONVENCIONAIS**

Rosiéli Martini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**INVESTIGAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM
CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS E AVALIAÇÃO DE
TÉCNICAS CONVENCIONAIS**

elaborada por
Rosiéli Martini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rosmari Hörner, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Luciane Noal Calil, Dra. (UFRGS)

Virgínia Maria Coser, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 06 de janeiro de 2012.

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus pais, Claudio e Ires!
Eles que sempre acreditaram em mim. Meu porto seguro.
E aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado.
Obrigada por todo o amor, dedicação, conforto e incentivo.
Então, comemorem comigo esta conquista, ela também é sua!*

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento a Deus, presença constante em minha vida, pela saúde, esperança, pelo amor e auxílio na escolha do melhor caminho a seguir.

Especialmente aos meus pais, Claudio e Ires, pelo amor maior, ensino, apoio e doação. Por me ensinarem os valores que compõem uma pessoa de verdade e por acreditarem nos meus sonhos. “A vocês, que se doaram por inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes, eu pudesse realizar os meus.”

As minhas manas Franciele e Andreia, por fazerem parte do meu crescimento, pelo amor, apoio, carinho e confiança. Obrigada por essa família maravilhosa que eu tenho.

À minha orientadora professora Dra. Rosmari Hörner. “Ao longo de tua caminhada tu guiaste o meu caminho, mostraste a cada momento compreensão, luta, paciência, inteligência e dedicação”, muito obrigada.

A todos os meus amigos, principalmente a Andressa e a Franciele, pelas palavras de incentivo. Obrigada pelo apoio constante, risos e choros que compartilhamos juntas. “Amigo não se escolhe, é conquista, é pura sintonia...”

A toda minha família, em especial a minha madrinha Ivanete, aos meus avós Augusto e Assunta e a minha vizinha Maria (*in memoriam*). Vocês fazem parte desta conquista.

Aos colegas, mestrandas e alunos de iniciação científica do laboratório de microbiologia. Um agradecimento especial as minhas alunas de iniciação, pela ajuda, carinho, companhia e convivência. Tenho certeza de que essa conquista também lhes pertence.

Ao meu pequeno Smuffy, que através de um simples olhar demonstra o companheirismo e pela alegria que me deste durante os dias de realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

A toda a equipe do HEMORGS de Santa Maria, do Banco de Sangue e do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário de Santa Maria, especialmente a Viviane e ao Zanoni.

A todos os professores do curso de Farmácia e da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria, obrigada pelos seus ensinamentos.

Muito obrigada a todos por esta conquista.

*“Há quem diga que todas as noites são de sonhos.
Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão.
No fundo, isto não tem muita importância.
O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos.
Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares,
em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”*
William Shakespeare

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

INVESTIGAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS E AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS CONVENCIONAIS

AUTORA: ROSIÉLI MARTINI

ORIENTADORA: ROSMARI HÖRNER

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de janeiro de 2012.

As transfusões sanguíneas sempre foram o grande suporte para o seguimento do tratamento de câncer, principalmente em pacientes dos setores de hematologia-oncologia, mas ainda destacam-se como uma das principais fontes de transmissão de doenças infecciosas, atualmente as bacterianas. Os concentrados plaquetários (CPs) são os hemocomponentes com maior frequência de contaminação bacteriana e são os responsáveis pela grande maioria das reações sépticas transfusionais. A infecção bacteriana é uma das principais causas de morbidade e mortalidade decorrentes de transfusões plaquetárias. Bactérias gram-positivas, em especial *Staphylococcus epidermidis*, são majoritariamente os responsáveis pela contaminação de CPs. Sendo assim, este estudo objetivou determinar a prevalência da contaminação bacteriana em CPs, o isolamento e a identificação dos microrganismos encontrados. Além disso, buscou identificar reações sépticas transfusionais bem como avaliar técnicas convencionais de detecção bacteriana. Um total de 691 amostras de CPs (665 plaquetas randômicas e 26 plaquetaféreses) foi analisado. Estas amostras foram provenientes do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS), localizado na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Empregaram-se técnicas de cultura qualitativa, quantitativa, de crescimento diário e também marcadores metabólicos para a detecção das bactérias. Os testes de identificação dos microrganismos isolados foram feitos por técnicas convencionais fenotípicas e genotípicas e o rastreamento das reações sépticas foi realizado por hemovigilância passiva. A prevalência da contaminação bacteriana encontrada neste estudo foi de 1,47% e *S. epidermidis* foi a bactéria responsável por todas as contaminações. Esta prevalência é considerada alta quando comparada a estudos recentes realizados em outros países. No Brasil contamos com pouquíssimos estudos nesta área. Todas as amostras contaminadas foram de plaquetas randômicas. O ensaio de marcadores metabólicos foi inespecífico para a pesquisa de bactérias. Ocorreu uma grande dificuldade na execução da técnica do crescimento diário inviabilizando essa metodologia para ser proposta ao HEMORGS. Através da hemovigilância passiva as reações transfusionais foram caracterizadas e foi possível confirmar a ocorrência de uma reação séptica transfusional. Sendo assim, sugerimos a associação de metodologias para a detecção da contaminação bacteriana na triagem dos CPs, uma vez que, se trata de um problema de saúde. A associação de sistemas de cultura pode reduzir os riscos de transfusões de CPs contaminados. Acreditamos que as reações sépticas transfusionais podem ser minimizadas com o seu reconhecimento precoce pela equipe clínica.

Palavras-chaves: Concentrados plaquetários; reação transfusional; seps; bactérias.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Posgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

INVESTIGATION OF BACTERIAL CONTAMINATION IN PLATELET CONCENTRATE AND EVALUATION OF CONVENTIONAL TECHNIQUES

AUTHOR: ROSIÉLI MARTINI

ADVISER: ROSMARI HÖRNER

Presentation date: Santa Maria, January 6th 2012.

Blood transfusions have always been great support for monitoring the treatment of cancer, especially patients in the sectors of hematology-oncology, but still stand out as a major source of transmission of infectious diseases, today the bacteria. Platelet concentrates (PCs) are the blood components with higher frequency of bacterial contamination and are responsible for the vast majority of septic transfusion reactions. Bacterial infection is a major cause of morbidity and mortality due to platelet transfusions. Gram-positive bacteria, particularly *Staphylococcus epidermidis*, are mainly responsible for the contamination of PCs. Therefore, this study aimed to determine the prevalence of bacterial contamination in PCs, the isolation and identification of microorganisms found. In addition, we sought to identify septic transfusion reactions and to evaluate conventional techniques for bacterial detection. A total of 691 samples of PCs (665 whole blood-derived platelets and 26 apheresis platelets) was analyzed. These samples were from the Blood Center of the State of Rio Grande do Sul (HEMORGS), located in Santa Maria, Rio Grande do Sul. Were employed culture techniques qualitative, quantitative, daily growth and also metabolic markers for the detection of bacteria. Tests for identification of microorganisms were made by conventional techniques and the phenotypic and genotypic screening of septic reactions was performed by passive haemovigilance. The prevalence of bacterial contamination found in this study was 1.47% and *S. epidermidis* bacteria was responsible for all contamination. This prevalence is considered high when compared to recent studies conducted in other countries, in Brazil we have very few studies in this area. All samples were contaminated platelet random. The test metabolic markers were nonspecific for the detection of bacteria. There was a great difficulty in performing the daily growth of the technical methodology make it impossible to be proposed to HEMORGS. Through haemovigilance passive transfusion reactions were characterized and it was possible to confirm the occurrence of a septic transfusion reaction. Therefore, we suggest the combination of methodologies for the detection of bacterial contamination screening of PCs, since it is a health problem. The combination of culture systems can reduce the risks of transfusions contaminated CPs. We believe that the septic transfusion reactions can be minimized with early recognition by the clinical team.

Keywords: Platelet concentrates; transfusion reaction; sepsis; bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura 1.....	21
Figura 2.....	22
Figura 3.....	23
Figura 4.....	25

Artigo 2

Gráfico 1 - Relação da porcentagem positiva ou negativa dos níveis de glicose de todas as amostras analisadas durante a realização diária das suas medidas	48
Gráfico 2 - Relação da porcentagem dos níveis de pH de todas as amostras durante a realização diária das suas medidas	48

Manuscrito 1

Table 1 - Bacteria isolated in PCs by the HEMORGS microbiological control and by prospective study.....	63
---	----

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1 - Métodos de detecção de contaminação bacteriana em plaquetas atualmente disponíveis, juntamente com os seus limites de detecção.	36
---	----

Artigo 1

Tabela 1 - Dados e perfil clínico dos pacientes receptores das bolsas de plaquetas contaminadas das 292 amostras de CPs obtidas no HEMORGS de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), no período de 2009/2010..	41
---	----

Resultados Adicionais

Tabela 1 - Distribuição dos índices de contaminação bacteriana em amostras de plaquetas randômicas de acordo com o dia de incubação no CMH..	77
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABB	<i>American Association of Blood Banks</i>
ADN ou DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARN ou RNA	Ácido Ribonucleico
AS ou BA	Ágar Sangue
ATCC	<i>American type culture collection</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
bpm	batimentos cardíacos por minuto
BRA	Brasil
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
<i>CLSI</i>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM ou MIC	Concentração Inibitória Mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico
CPs ou PCs	Concentrados plaquetários
CHs	Concentrado de hemácias
CMH ou MHB	Caldo Mueller Hinton
CRIO	Crioprecipitado
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
dL	decilitro
EUA ou USA	Estados Unidos da América
<i>eBDs</i>	<i>enhanced bacterial detection system</i>
<i>FACs</i>	<i>Fluorescence-activated cell sorting analysis</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GN	Gram-negativas
GP	Gram-positivas
GNF-GNB	Glucose non-fermenting gram negative bacilli
h	Hora (s)
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
HEMORGS	Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul
HTLV	Vírus T-Linfotrópicos Humanos
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
ipm	incursões por minuto
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LMA ou AML	Leucemia Mielóide Aguda
mg	miligrama
mL	mililitro
mmHg	milímetros de mercúrio
mm ³	milímetros cúbicos
MS	Ministério da Saúde
<i>NAT</i>	<i>Nucleic acid amplification techniques</i>
O ₂	Oxigênio ou Gás Oxigênio
pCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>

<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PFC	Plasma fresco congelado
PGD	<i>Pan genera detection</i>
PRP	Plasma rico em plaquetas
P24	Plasma de 24 h
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RS	Rio Grande do Sul
RT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SBHH	Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
SCN ou SCoN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
ST	Sangue total
SM	Santa Maria
TTI	Transfusion transmitted infections
TSA ou AST	Tryptic Soy Tooltip Agar
UFC/mL ou CFU/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VHB ou HBV	Vírus da Hepatite B
VHC ou HCV	Vírus da Hepatite C
VHI ou HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
µg	Micrograma
µL	Microlítro

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - RDC nº 57 de 16 de dezembro de 2010.....	96
Anexo B- Portaria MS nº 1.353 de 13 de junho de 2011	97
Anexo C - Registro no Comitê de Ética em Pesquisa	98
Anexo D - Resumos Publicados em Congressos.....	99

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Técnica da Microdiluição em Caldo – Antimicrobiano Vancomicina	101
---	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Objetivos	17
1.1.1 Obetivo principal	17
1.1.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 História das transfusões sanguíneas	19
2.2 Processo de coleta de sangue	20
2.3 Processamento do sangue total e dos seus componentes	20
2.4 Legislação Brasileira	24
2.5 Armazenamento dos componentes sanguíneos	24
2.6 Contaminação bacteriana	25
2.7 Bactérias relacionadas à contaminação de plaquetas	26
2.8 Fontes de contaminação	27
2.9 Estimativas de contaminação	30
2.10 Métodos para detecção	31
2.11 Reações sépticas	36
3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	39
3.1 Artigo 1	39
Resumo	39
Abstract	40
Introdução	40
Métodos	41
Resultados	41
Discussão	42
Agradecimento	43
Conflito de interesse	43
Suporte financeiro	43
Literatura citada - Referências	43
3.2 Artigo 2	44
Resumo	45
Abstract	45
Introdução	46
Materiais e métodos	46
Coleta e destino das amostras	46
Preparação das amostras	47
Semeadura em placa de ágar sangue (AS) de carneiro, com contagem (quantitativa)....	47
Medida de pH e glicose	47
Conceitos éticos	47
Resultados	47
Discussão	49
Conclusão	51
Literatura citada - Referências Bibliográficas	51
3.3 Manuscrito 1	54
Abstract	57
Introduction	58
Methods	60

Collection of platelets by apheresis system and whole blood-derived platelets.....	60
Investigation of bacterial contamination.....	60
Confirmation of bacterial contamination through reculture.....	61
Cases reported of transfusion reactions.....	61
Genotypic identification.....	62
Ethical concepts.....	62
Results.....	63
Rate of bacterial contamination of all samples of August 2009 and January 2010.....	63
Rate of bacterial contamination found in HEMORGS control routine.....	63
Investigation of possible septic reactions prospective study.....	64
Discussion.....	65
Acknowledgments.....	68
Conflict of interest.....	68
Literatura citada - References.....	69
4 MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS.....	75
4.1 Técnica do Crescimento Diário.....	75
4.1.1 Coleta, destino e preparação das amostras.....	75
4.1.2 Semeadura em Caldo Mueller Hinton, qualitativa.....	75
4.1.3 Semeadura diária em placa de Ágar sangue de Carneiro a 5%.....	75
4.1.4 Análise das sementeiras.....	76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS.....	77
6 DISCUSSÃO GERAL.....	79
7 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS.....	95
APÊNDICES.....	100

1 INTRODUÇÃO

A transfusão de concentrados plaquetários (CPs) é essencial no tratamento de pacientes, especialmente da unidade de hematologia-oncologia e necessária, também, para manter a hemostasia em procedimentos cirúrgicos (NIU et al., 2006). Há anos, as reações sépticas transfusionais são complicações reconhecidas e a presença de bactérias nos hemocomponentes está associada à morbidade e mortalidade dos receptores (BLAJCHMAN, 2002).

Apesar dos melhoramentos realizados nos sistemas de triagem, nos métodos de armazenamento e nos procedimentos de antissepsia a contaminação bacteriana continua sendo o foco de preocupação para a medicina transfusional (BERKOW et al., 2003). Cerca de 1/2000 unidades de plaquetas estão contaminadas com bactérias. A sepse bacteriana é considerada a segunda causa mais comum de óbitos devido às transfusões (primeiro lugar é a incompatibilidade), com taxas de mortalidade variando entre 1/20.000 - 1/85.000 (BLAJCHMAN, 2004a). Os CPs têm a maior frequência e, portanto, maior probabilidade de provocar reações sépticas transfusionais. Isto se deve a temperatura de estocagem que varia entre 20 a 24 °C, por 5 dias, a qual proporciona o crescimento bacteriano, principalmente de bactérias que colonizam a pele (MCDONALD et al., 2004).

A detecção da contaminação nos CPs é realizada através de exames bacteriológicos, os quais constituem um procedimento de rotina nos países acreditados pela *Food and Drug Administration (FDA)*. A partir de 2004 foi determinado pela *American Association of Blood Banks (AABB)* medidas para detectar e limitar a presença de bactérias em todos os CPs, porém sem a indicação de uma metodologia padrão (AABB, 2004). Entretanto, métodos automatizados como o *BacT/Alert®* são largamente utilizados para esta finalidade.

Já no Brasil, a atual regulamentação da hemoterapia é realizada pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010, a qual aborda o problema da contaminação bacteriana em hemocomponentes de forma genérica, não determinando a cultura em todas as amostras como triagem pré-transfusional, mas sim em apenas 1% da produção mensal ou em 10 unidades por mês (BRASIL, 2010a).

Os produtos do sangue são atualmente triados por técnicas ultra-sensíveis para evitar o risco de transmissão viral. Entretanto, o risco da contaminação bacteriana permanece sendo o evento adverso mais comum de infecção relacionado à transfusão (ANDREU et al., 2002). A ocorrência de bacteremia associada às infusões sanguíneas passou a assumir um papel de destaque na hemoterapia (ENGELFRIET et al., 2000).

Embora a transmissão de microrganismos pela transfusão de sangue seja conhecida há mais de meio século, a contaminação bacteriana dos hemocomponentes, principalmente dos CPs, permanece como um problema de saúde pública (CUNHA, 2006). Apesar da possibilidade de serem minimizadas e evitadas, as reações sépticas transfusionais são pouco conhecidas ou subnotificadas o que faz com que este problema de transmissão de bactérias por meio das transfusões sanguíneas continue ocorrendo.

Em bacteriologia, o principal teste para a avaliação da esterilidade é a cultura. A proposta de sua introdução na rotina, como mais um teste de triagem do sangue doado, diferentemente dos testes sorológicos ou dos de biologia molecular, que podem ser aplicados momentos antes da transfusão, a cultura requer tempo para que os organismos proliferem e sejam passíveis de detecção (RIBEIRO e KUTNER, 2003).

Este estudo realizado no Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS) localizado em Santa Maria (SM), Rio grande do Sul (RS) é inédito. As consequências clínicas resultantes da infusão de bolsas de CPs contaminadas com bactérias tornam premente a utilização de um método eficaz e seguro ou uma associação de metodologias para o controle bacteriológico dos CPs, e que tenha fácil desempenho na rotina.

Acreditamos dessa forma, que a realização do controle microbiológico de todos os CPs doados possibilitará a transfusão de plaquetas “isentas” de contaminação bacteriana, minimizando assim o risco de reações sépticas transfusionais aos receptores, que na maioria das vezes se encontram em estado clínico debilitado e com o sistema imune deprimido.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo principal

Investigar a contaminação bacteriana de amostras de plaquetas randômicas e plaquetaféreses coletadas no HEMORGS de SM – RS e propor metodologia para a triagem da contaminação bacteriana nos CPs.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar a prevalência de CPs contaminados com bactérias utilizando metodologia qualitativa;
- Identificar a carga média bacteriana, ou seja, as Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL);
- Caracterizar os isolados bacterianos envolvidos;
- Aprimorar a técnica, cultura qualitativa, utilizada atualmente no Controle Microbiológico do HEMORGS de SM/RS;
- Testar metodologias diferentes passíveis de detecção de bactérias nas amostras de CPs;
- Comunicar ao HEMORGS, sempre que possível, a presença de contaminação bacteriana nos CPs analisados, evitando a transfusão e os riscos ao paciente;
- Avaliar as reações transfusionais dos receptores os quais, porventura, tenham recebido CPs contaminados com bactérias;
- Comparar os resultados obtidos pelas diferentes metodologias convencionais empregadas neste estudo e propor uma técnica para a triagem na detecção da contaminação bacteriana em CPs.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História das transfusões sanguíneas

O sangue sempre esteve associado ao conceito de vida e seu uso terapêutico é denominado hemoterapia (HARMENING-PITTLIO et al., 1992). O primeiro relato de transfusão sanguínea entre animais e o homem ocorreu em 1665, mas em 1667, Jean Batiste Denys, descreveu a primeira transfusão entre seres humanos. A descoberta dos grupos sanguíneos por Karl Landsteiner, o início do século XX (1901) ficou conhecido como a era científica da hemoterapia (BLOOD-BOOK, 2003).

Inicialmente, as técnicas de transfusões sanguíneas eram precárias e associadas à ausência de conhecimentos sobre o sangue. Isso implicava em grandes complicações transfusionais. Mas, em 1914, Hustin, relatou o uso de anticoagulantes (citrato de sódio) e de soluções diluentes, demonstrando a capacidade de armazenar e preservar o sangue. Isso originou novas atividades médicas, e em 1921, em Londres, foi criado o primeiro Serviço de Transfusão Sanguínea (HARMENING-PITTLIO et al., 1992). Além disso, durante a 1ª Guerra Mundial e ainda mais na 2ª Guerra, as transfusões tornaram-se mais comuns. No decorrer desta última, a doação de sangue era um dever patriótico em muitos países (TYNELL, 2005).

No Brasil, em 30 de dezembro de 1879 (Bahia) ocorreu o primeiro relato sobre hemoterapia, com a tese de doutorado de José Vieira Marcondes, a qual relatava experiências empíricas e discussões sobre qual seria a melhor transfusão (MARCONDES, 1879). Já em 1916, na cidade do Rio de Janeiro (RJ), Isaura Leitão relatou o primeiro caso de transfusão sanguínea. Em 1933, o primeiro Serviço de Transfusão Sanguínea foi inaugurado, e nessa época, as doações podiam ser remuneradas (JUNQUEIRA et al., 2005). Em 1950, durante a realização do 1º Congresso de Hemoterapia em Petrópolis (RJ), teve origem a Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH) (GUERRA, 2000).

Nesse mesmo ano foi promulgada a Lei número (nº) 1075, que determinava a Doação Voluntária de Sangue, sustentando a possibilidade de remuneração (BRASIL, 1950). Com o passar dos anos, em 1965 foi criada a Comissão Nacional de Hemoterapia, a qual regulamentava a atividade hemoterápica no Brasil. E em 1980, a SBHH liderou uma

campanha nacional com o objetivo de expor sua insatisfação perante as doações sanguíneas, as quais, muitas vezes, eram realizadas por presidiários ou mendigos em busca de remuneração. A partir desse acontecimento foi extinta a doação remunerada (JUNQUEIRA et al., 2005).

2.2 Processo de coleta do sangue

Antes da década de 60 o sangue era coletado em garrafas de vidro e transfundido como sangue total. No entanto, a inserção dos sistemas de coleta fechado permitiu a separação em componentes. Dessa maneira, tornou-se possível utilização apenas do hemocomponente necessário o que permitiu o bom uso do sangue (MOHAMMADI, 2006).

Os componentes básicos do sangue são os glóbulos vermelhos, as plaquetas e o plasma. Os glóbulos vermelhos são transfundidos para melhorar o fornecimento de oxigênio nos pulmões; as plaquetas são essenciais para a hemostasia e o plasma é transfundido para pacientes que necessitam de múltiplos fatores de coagulação (MOHAMMADI, 2006).

A transfusão de hemocomponentes envolve perigo, como a transmissão de infecções virais e bacterianas, principalmente. As bactérias foram reconhecidas como risco para doenças infecciosas ainda quando o sangue era coletado nas garrafas de vidro (MOLLISON et al., 1993). A introdução dos sistemas fechados contribuiu para a redução desse risco. Entretanto, nas últimas décadas, apesar do grande declínio da transmissão viral, a septicemia devido à transfusão de hemocomponentes contaminados com bactérias persiste, especialmente, através da infusão de CPs (HILLYER et al, 2003; YOMTOVIAN, 2004).

A transfusão de sangue e hemocomponentes é um processo indispensável na terapia moderna. Deve ser utilizada em condições de morbidade ou mortalidade significativas, podendo salvar vidas e melhorar a saúde dos receptores. Contudo, assim como outras intervenções terapêuticas, pode levar à complicações agudas ou tardias, com chance de risco de transmissão de agentes infecciosos, em especial de bactérias, entre outras complicações clínicas (BRASIL, 2010b).

2.3 Processamento do sangue total e de seus componentes

- Sangue total

Anterior à inserção da agulha em uma veia, o local da punção venosa é desinfectado com álcool 70%, para proceder a coleta de sangue. A seguir, o sangue flui para uma bolsa estéril, contendo anticoagulante, coletando assim o sangue total (MOHAMMADI, 2006).

Os produtos derivados do sangue total um a um, nos serviços de hemoterapia, por meio de processos físicos como centrifugação e congelamento, são denominados hemocomponentes, os quais são: plasma, CPs, concentrado de hemácias (CHs) ou glóbulos vermelhos e crioprecipitado (CRIO). Entretanto, os produtos obtidos em escala industrial, a partir do fracionamento do plasma e por processos físico-químicos são os hemoderivados: albumina, globulinas e os fatores de coagulação (BRASIL, 2010b). A figura 1 representa os produtos originados a partir do sangue total.

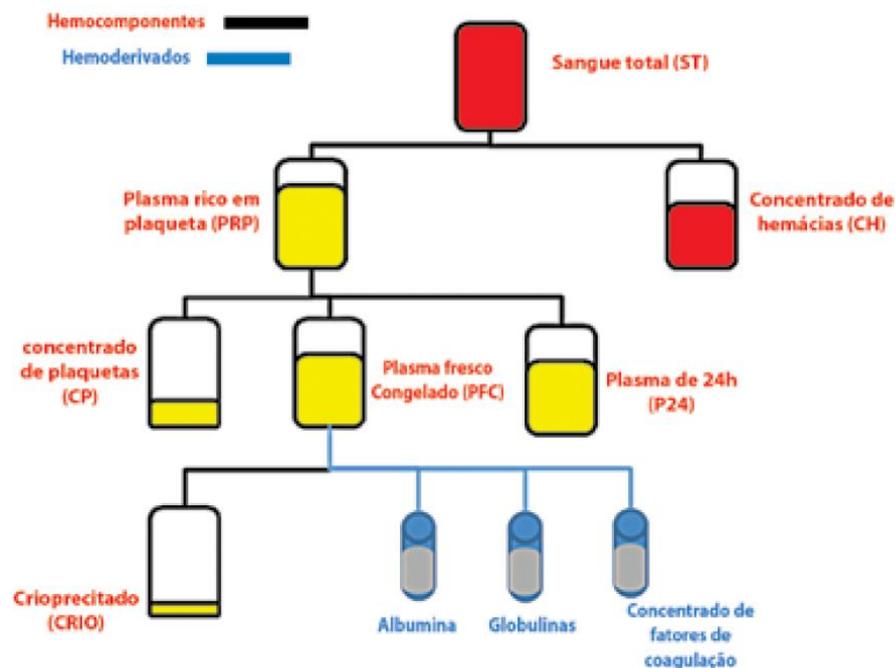


Figura 1– Produtos sanguíneos originados a partir do sangue total.

Fonte: Adaptado de Brasil, 1998.

- Métodos de separação do sangue total

Através da centrifugação de baixa velocidade duas camadas de componentes são formadas, uma de plasma rico em plaquetas (PRP), contendo leucócitos e uma outra camada de células vermelhas misturada com leucócitos e algumas plaquetas. O PRP é transferido para outra bolsa e submetido a uma segunda rotação. A maior parte do plasma pobre em plaquetas

é removida e o *pellet* de plaquetas é ressuspenso com 40 - 70 mL de plasma. Este PRP pode ser transfundido como unidade individual ou agrupado em 4 a 6 unidades em plasma ou solução aditiva (VASCONCELOS et al., 2003). Essas unidades podem ser filtradas para reduzir o número de leucócitos, benéfica para prevenir as reações adversas. Já os CHs são leucoreduzidos pelo uso de um filtro (DZIK, 2000).

Outro método de separação é por centrifugação de alta velocidade. Três frações são obtidas: as células vermelhas depositadas no fundo da bolsa, acima o *buffy-coat* que é uma camada leucoplaquetária contendo 70% de leucócitos e 90% de plaquetas e algumas células vermelhas. E acima do *buffy-coat* fica a camada de plasma que contém plaquetas dispersas (Figura 2) (ZBIGNIEW et al., 1995; VAN DER MEER et al., 1999).

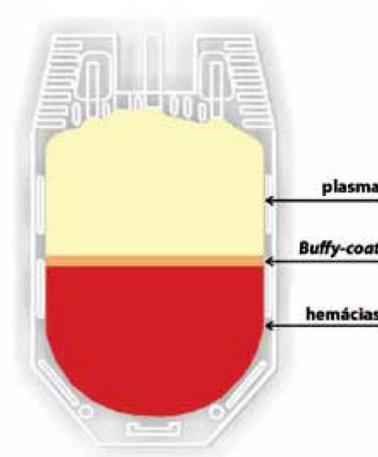


Figura 2 – Separação do sangue total após o processo de centrifugação de alta velocidade.

Fonte: Brasil, 1998.

Estas três frações podem ser separadas em bolsas diferentes. Antes da transfusão de CHs a fração é diluída em uma solução nutritiva, devido à elevada viscosidade das células e a dificuldade de fluir durante a infusão (MOHAMMADI, 2006).

Para a obtenção de uma dose terapêutica de plaquetas é necessário 4 a 6 unidades de plaquetas originadas do sangue total, que são agrupadas em uma unidade de plasma ou de solução aditiva de plaquetas, unidade conhecida como *pool*. Após uma centrifugação suave o sobrenadante rico em plaquetas é transferido através de um filtro de leucorredução a uma bolsa de armazenamento de CPs (MOHAMMADI, 2006). Estes, contém cerca de $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas e um volume de 40 a 70 mL (BRASIL, 2010a).

Os componentes sanguíneos também podem ser preparados por aférese: este método envolve o uso de um separador de células, onde a circulação do sangue do doador é conectada a uma centrífuga. A separação ocorre durante o procedimento de coleta, onde o componente escolhido é transferido para uma bolsa, enquanto que os demais são devolvidos ao doador (Figura 3) (MOHAMMADI, 2006). Possuem rendimento de três doses terapêuticas, mais de 3×10^{11} plaquetas e um volume de plasma de 200 a 400 mL (BRASIL, 2010a).



Figura 3 – Máquina de aférese para doação específica de determinado hemocomponente.

Fonte: Disponível nos sites: <http://www.hemoped.com/doacaodesangue.html> e <http://www.flickr.com/photos/7195028@N07/4350381831>

- As plaquetas e os concentrados plaquetários

As plaquetas são células discóides anucleadas, originadas da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos medulares e constituintes normais do sangue. Sua principal função é promover uma superfície hemostática nos vasos sanguíneos para a formação da fibrina (ABREU e MOREIRA, 2003). Deficiências no número e função plaquetária podem causar anormalidades nas vias da coagulação, tornando necessária a reposição (CHAMONE et al., 2001). As plaquetas são transfundidas na forma de CPs, que é uma suspensão em plasma, preparado por dupla centrifugação do sangue total (plaquetas randômicas); pode também ser obtido pelo método de aférese (plaquetaférese) (BRASIL, 2010a).

Sua transfusão é uma forma de reduzir os riscos de hemorragias que são mais frequentes em pacientes com neoplasias, em tratamento quimioterápico, submetidos a

transplantes ou com falência de medula óssea. Em 1911, Duke relatou a primeira transfusão de plaquetas (GOMES e ALBIERO, 2001) e em 1964, o primeiro relato de transfusão de CPs, obtidos após o fracionamento do sangue anticoagulado (ÁSTER e JANDL, 1964).

2.4 Legislação Brasileira

No Brasil a primeira lei referente à doação de sangue foi a Lei Federal nº 1075, de 1950, que regulamentava a licença de um dia no trabalho para o doador de sangue (BRASIL, 1950). Com a criação da Lei Federal nº 4.701, de 1965, ficava estabelecido normas regulamentadoras sobre a atividade hemoterápica e a definição das bases da Política Nacional do Sangue (BRASIL, 1965). A partir disso, o Ministério da Saúde (MS) periodicamente atualiza as normas vigentes referentes à transfusão de sangue (CARNEIRO e LOPES, 2002).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão do MS, supervisiona as atividades práticas da hemoterapia no Brasil. Este processo segue as normas determinadas pela RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010 (Anexo A) e por regulamentos técnicos editados pelo MS através da Portaria nº 1.353, de 13 de junho de 2011 (Anexo B) (BRASIL, 2010a, 2011).

2.5 Armazenamento dos componentes sanguíneos

O plasma fresco congelado (PFC) pode ser armazenado entre -18 a -30 °C, sendo que a validade nesse intervalo de temperatura é de 12 meses, mas se for armazenado a -30 °C ou inferior, terá validade de 24 meses. Para o CRIO seguem-se as mesmas recomendações. Já para o plasma isento de CRIO deve ser preparado em sistema fechado, armazenado a -18 °C ou inferior e possui validade de 12 meses (BRASIL, 2010a). Os CPs devem ser armazenados em temperatura ambiente, entre 22 ± 2 °C, sob agitação constante (Figura 4), com validade de 3 a 5 dias, dependendo do tipo de plastificante da bolsa de conservação e os CHs devem ser armazenados a 4 ± 2 °C, com validade de 34 – 42 dias, dependendo da solução conservadora (BRASIL, 2010a).



Figura 4 – Armazenamento de CPs em temperatura ambiente e sob agitação:

Fonte: Disponível no site: <http://www.flickr.com/photos/redcrossbloodks/5121788050/in/set-72157625131914995>

No início das transfusões, as plaquetas eram armazenadas numa temperatura de 4 °C (MOLLISON et al., 1993; YOMTOVIAN, 2004); porém, sob essas condições a viabilidade e a hemostasia eram afetadas. A temperatura ambiente e o armazenamento por 3 dias foi proposto na década de 70, como alternativa. Em 1981, com o desenvolvimento das bolsas de plástico permeáveis ao gás, para preservar a qualidade das plaquetas em temperatura ambiente, a vida útil dos CPs foi prorrogada para 5 dias e em 1984 para 7. No entanto, o armazenamento nestas condições proporcionou a propagação do crescimento bacteriano (MOHAMMADI, 2006).

Assim em 1986, o aumento da transmissão de infecções bacterianas devido à CPs contaminados foi fator determinante para a redução do tempo de armazenamento para 5 dias (FDA, 2004). Já, atualmente com o surgimento das novas metodologias de detecção, o tempo de armazenamento permitido pelo FDA é de até 7 dias nos Estados Unidos da América (EUA) (FDA, 2004), diferentemente do Brasil que é de 3 a 5 dias (BRASIL, 2010a).

2.6 Contaminação bacteriana

Transfusões sanguíneas com suspeita de transmissão de bactérias vêm sendo descritas há mais de meio século. Após dois anos da abertura do primeiro banco de sangue nos EUA já havia relatos de risco de infusão de sangue contaminado (NOVAK, 1939). Strumia e

McGraw, em 1941, descreveram o primeiro relato de transmissão de microrganismos por transfusão sanguínea. No mesmo ano foi relatado o primeiro caso de morte causada por sepse bacteriana, por consequência de um *pool* de plasma transfundido que estava contaminado com bacilo Gram-positivo (GP) (STRUMIA e MCGRAW, 1941).

Apesar da redução observada, a contaminação bacteriana continua persistindo, principalmente nos CPs (SEGHATCHIAN, 2001). Mesmo que todos os hemocomponentes sejam suscetíveis à contaminação bacteriana e também às complicações sépticas pós-transfusionais, os CPs são mais suscetíveis ao desenvolvimento bacteriano (YOMTOVIAN, 2004). Essas infecções bacterianas apresentam elevados riscos de saúde para os transfundidos, especialmente para os indivíduos imunocomprometidos, os quais são submetidos frequentemente à transfusões plaquetárias, devido ao tratamento quimioterápico e são mais suscetíveis ao desenvolvimento de complicações clínicas (CLAWSON e WHITE, 1971).

A transmissão de bactérias por ocasião da transfusão sanguínea esta diretamente relacionada à rápida evolução do paciente à sepse e nesses casos demonstram uma alta taxa de mortalidade (WAGNER et al., 1994). De acordo com Blajchman (2004), a taxa de óbitos depende de vários fatores, tais como: o microrganismo envolvido; a concentração do agente transfundido, ou seja, as unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL); do sistema imune do receptor e da antibioticoterapia (BLAJCHMAN, 2004a).

Mesmo com a realização da antisepsia, microrganismos oriundos da pele são os principais responsáveis pela contaminação (GOLDMAN et al., 1997). Uma concentração inicial presente na bolsa de sangue logo após a doação, com cerca de 10 UFC/mL, poderia não ser detectada (WAGNER et al., 1997). Estudos experimentais com cultivo bacteriano, realizados após a inoculação de bactérias em CPs, demonstraram uma fase de estagnação inicial, ou fase *lag*, que oscila entre 24 a 48 h, seguida por uma fase de rápida proliferação, que pode elevar a 10^8 UFC/mL. Esta multiplicação foi observada tanto em bactérias GP como Gram-negativas (GN), sendo que essa concentração resultaria em manifestações clínicas ao receptor. Essa pesquisa foi realizada durante os 5 dias de armazenamento de CPs (PUNSALANG et al., 1989).

2.7 Bactérias relacionadas à contaminação de plaquetas

Bactérias GP comensais da pele, tais como *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus* são os organismos mais frequentemente encontrados no sangue e implicados na contaminação bacteriana de CPs. Esta contaminação possivelmente ocorre durante a flebotomia, como resultado da desinfecção incompleta (GIBSON e NORRIS, 1958). Estes organismos normalmente não crescem entre 1 a 6 °C, mas sobrevivem e se multiplicam rapidamente nos CPs que são armazenadas entre 20 a 24 °C (BRECHER e HAY, 2005).

As bactérias detectadas nos CPs variam entre GN e GP destacando-se: *Staphylococcus Coagulase Negativo* (SCon), *B. cereus*, *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Klebsiella pneumoniae* e bacilos difteróides ou *Corynebacterium* spp.. Todas têm em comum o fato de serem residentes da pele (DEPICK-SMITH et al., 2001; KUEHNERT et al., 2001).

Os cocos GP são responsáveis por aproximadamente 58% dos casos de contaminação bacteriana em CPs, seguidos pelos bacilos GN, 32% dos casos, e das demais bactérias, 10% (ANDREU et al., 2002). O FDA reporta que 98% dos casos de reações fatais atribuídos à transfusão de CPs contaminados, entre os anos de 1976 a 1998, foram causados por: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* beta-hemolíticos e *B. cereus* (DEPICK-SMITH et al., 2001; ORTOLANO et al., 2003).

A frequência de contaminação destas bactérias varia entre países e entre os centros de sangue dentro do mesmo país. Sequelas clínicas devido à transfusão de CPs contaminados com bactérias vão desde a ausência de sintomas à febre moderada, sepse aguda, hipotensão e ao óbito (MOHAMMADI, 2006).

2.8 Fontes de contaminação

Mesmo sendo difícil determinar a fonte de contaminação de CPs, acredita-se que essa possa ser inserida através do sangue dos doadores, durante a coleta de sangue ou também no processo de manufatura dos hemocomponentes (BLAJCHMAN et al., 2004b). De maneira geral, microrganismos oriundos da pele do doador, sejam eles transitórios ou residentes, são responsáveis por cerca de 90% das contaminações (STAINSBY et al., 2003).

As bactérias presentes na microbiota da pele são as fontes mais comuns de contaminação. Métodos otimizados de antisepsia são ideais para a redução desse risco

(GOLDMAN, 2004). Para o Banco de Sangue da Cruz Vermelha da Austrália, a antissepsia da pele é considerada a medida mais importante e necessária na prevenção da contaminação (WONG et al., 2004). Uma associação entre aprimoramento na antissepsia da pele e a eliminação dos primeiros 10 mL da coleta podem reduzir em 75 a 90% da contaminação dos hemocomponentes por bactérias provenientes da pele (AUBUCHON et al., 2002). A RDC vigente no Brasil estabelece a utilização de bolsa de sangue com sítio coletor como medida preventiva para essa contaminação (RDC 2010a). A seguir são reportadas as possíveis fontes de contaminantes:

- Doador

A bacteremia assintomática em doadores pode ser responsável pela contaminação do sangue total e dos produtos subsequentes. Encontram-se citados na literatura vários casos de transfusão de CPs contaminados por *Salmonella* spp. associados a quadros de sepse. Um caso especial, descrito por Jafari et al. em 2002, relata sepse em 2 receptores por *Salmonella enterica*, onde a fonte de contaminação foi o réptil de estimação do doador (JAFARI et al., 2002). Esse fato enfatiza a importância da seleção cuidadosa dos doadores.

No caso de contaminação bacteriana por bactérias GN, cada situação deve ser analisada de forma criteriosa. Doadores assintomáticos com bacteremia transitória são os responsáveis pela maioria dos casos. Por exemplo, 7 casos de contaminação de CHs por *Yersinia enterocolitica* resultaram em 5 óbitos, posteriormente 6 dos 7 doadores tiveram resultado sorológico positivo, para *Y. enterocolitica*, indicando infecção pela bactéria (TIPPLE et al., 1990). Também há o relato de um surto de contaminação de sangue por *S. marcescens*, no qual, uma possível falha no processo de fabricação e esterilização das bolsas provavelmente tenha sido a fonte de contaminação (HELTBERG et al., 1993).

Associações incomuns entre doadores e receptores podem ocorrer como o óbito devido ao choque séptico consequente à transfusão de um CP contaminado com o anaeróbio *Clostridium perfringens*; atribuiu-se a fonte dessa bactéria pelo fato desse doador trocar frequentemente as fraldas de seus 2 filhos pequenos (MCDONALD et al., 1998). Outro caso foi o surto ocorrido no Centro Clínico do Instituto Nacional de Saúde, em Bethesda (EUA), onde sete pacientes imunocomprometidos desenvolveram sepse na qual foi isolada a *S. enterica* sorotipo choleraesuis, devido à doação de plaquetas oriundas de um doador com osteomielite oculta (RHAME et al., 1973). Porém na maioria dos casos, a fonte da contaminação bacteriana permanece não identificada (BRECHER e HAY, 2005).

Além disso, bacteremia transitória no doador pode causar septicemia transfusional aos destinatários. Exame endoscópico ou procedimentos odontológicos, como extração dentária

podem predispor ao doador uma bacteremia transitória. Como medida preventiva, em muitos países os doadores que foram submetidos a procedimentos odontológicos são excluídos da doação de sangue, por alguns dias ou uma semana (MOHAMMADI, 2006).

- Coleta

A desinfecção inadequada da pele no local da flebotomia pode ser a origem da contaminação. Bactérias podem ser introduzidas, a partir da superfície da pele, na bolsa de sangue no momento da coleta. Esta ocorrência depende do método e dos materiais usados para a preparação do local da punção no braço do doador (MOHAMMADI, 2006). A contaminação de CPs com *C. perfringens* relatado por McDonald et al., em 1998, anteriormente, também é um exemplo disso. Provavelmente a pele do braço do doador se tornou contaminada pela flora fecal da criança (MCDONALD et al., 1998). Este caso destaca a importância de métodos ideais para o processo de limpeza da pele anterior à coleta sanguínea.

No entanto, a contaminação bacteriana de hemocomponentes também pode ocorrer devido à utilização de desinfetantes contaminados, os quais são utilizados para preparar o local de flebotomia. Garcia-Erce et al., em 2002, relatou alguns casos de contaminação resultantes do uso do desinfetante clorexedina, contaminado com *Burkholderia cepacia* (GARCIA-ERCE et al., 2002).

Para reduzir a taxa de contaminação pelo processo de flebotomia, várias medidas devem ser tomadas, as quais incluem: melhoria nos métodos de desinfecção da pele do doador e eliminação dos primeiros 10 mL do sangue. Este último método, de acordo com De Korte et al., em 2002, parecia promissor. Os autores relataram uma redução de 0,35 para 0,21% na prevalência de bactérias após desprezar os 10 mL do volume inicial. Essa redução, na maioria dos casos correspondia às bactérias provenientes da superfície da pele do doador (DE KORTE et al., 2002).

Outro estudo, descrito por McDonald et al., em 2004, em Londres, constatou uma redução de 47% na contaminação quando era utilizado a eliminação da alíquota inicial. Esta redução chegou a alcançar redução de contaminação de aproximadamente 57%, quando, o desvio era associado com um procedimento de desinfecção aprimorado (MCDONALD et al., 2004). Atualmente, desviar as primeiras alíquotas de sangue constitui procedimento de rotina (LEE et al., 2002; RDC 2010a).

- Fabricação e manipulação

Os CPs podem ser contaminados devido à manipulação inapropriada dos produtos derivados do sangue ou do uso de equipamentos ou dispositivos não estéreis. Também é

possível que as amostras sejam contaminadas durante a inoculação ou sementeiras nos frascos de cultura dos aparelhos (ex.: *BacT/Alert*®) (MOHAMMADI, 2006). Embora raramente, equipamentos contaminados como bolsas de sangue utilizadas na coleta de sangue, também têm sido apontados como a fonte de contaminação bacteriana de CPs (HELTBERG et al., 1993; HÖGMAN et al., 1993).

2.9 Estimativas de contaminação

A contaminação bacteriana de CPs é uma preocupação que vem desde a introdução na prática médica da transfusão de sangue, e ao longo dos anos o tempo de armazenamento em temperatura ambiente poderia estar relacionado com a ocorrência dessa contaminação. Os primeiros 2 óbitos devido à infecção bacteriana proveniente de transfusão sanguínea foram reportados por Borden e Hall em 1951, com transfusão de sangue total contaminado (BORDEN e HALL, 1951).

Dados do *FDA* apontam que nos EUA a contaminação bacteriana por transfusão sanguínea de hemocomponentes foi a causa mais frequente de fatalidades depois das reações hemolíticas. Entre 1985 a 1999 foram descritos 694 óbitos ligados ao uso de sangue e seus derivados, sendo que 77 desses (11%) foi devido à presença de contaminação bacteriana (DODD, 2003).

Desde então, vários casos de contaminação bacteriana de CPs e das subsequentes infecções transfusionais foram publicados. De 1994 a 1998, o sistema de hemovigilância da Agência Francesa de Sangue registrou 185 casos com 18 óbitos por transfusão de hemocomponentes contaminados com bactérias (ANDREU et al., 2002). O sistema de vigilância do Reino Unido relatou 26 infecções transmitidas por transfusão, incluindo 6 óbitos entre 1995 a 2002 (SHOT, 2002). Além disso, durante 1998 a 2000, 9 casos fatais de transfusão de CPs foram relatados ao *FDA* (KUEHNERT et al., 2001).

Os dados sobre prevalência da contaminação bacteriana em CPs são oscilantes. Esses números dependem do método de cultura utilizado, do local do estudo e do tempo (horas) de coleta da amostra (VASSALO e MURPHY, 2006). Um índice de referência nos hemocomponentes não está estabelecido. Uma revisão sobre a prevalência da contaminação bacteriana em CPs demonstrou que as taxas variaram entre 0,08 a 0,8% (GOLDMAN, et al., 2000; GOLDMAN e BLAJCHMAN, 2001). Recentemente, Hsueh, et al., em 2009, na cidade

de Taiwan, detectaram 0,34% de contaminação bacteriana em CPs; Martínez, et al., em 2010, no Texas, relataram 0,31% e Walther-Wenke et al., também em 2010, na Alemanha, encontraram 0,3% (HSUEH et al., 2009; MARTÍNEZ, et al., 2010; WALTHER-WENKE et al., 2010). No Brasil há poucos dados que se referem à contaminação bacteriana em CPs. Um estudo significativo, realizado em um hospital universitário em Goiânia, por Cunha et al., em 2006, revelou uma prevalência de contaminação bacteriana em CPs de 0,4% (CUNHA et al., 2008). Além desse, em nosso estudo efetuado nos anos de 2009 e 2010, no HUSM, obtivemos um índice de 1,7% de contaminação bacteriana em CPs (MARTINI et al., 2010).

Os riscos estimados de receber CPs com bactérias é cerca de 50 a 250 vezes maior em relação a receber o vírus humano da imunodeficiência (VHI ou HIV), ou vírus T-linfotrópicos humanos (HTLV), ou vírus da Hepatite C (VHC ou HCV) e/ou vírus da Hepatite B (VHB ou HBV) (AABB, 1996). Portanto, estima-se que 1 em cada 3.000 CPs pode induzir sepse ao receptor, enquanto que o risco de transmissão de infecções virais é entre 1 em 200.000 a 1 em 2.000.000, dependendo do tipo viral (HILLYER et al, 2003; YOMTOVIAN, 2004).

Nos EUA, anualmente, 14 milhões de unidades de CHs e 4 milhões de unidades de CPs são transfundidas, representando uma transfusão de hemácias a cada 2,3 segundos e uma de plaquetas a cada 8 segundos. Portanto, cerca de 2.000 a 4.000 unidades contaminadas são transfundidas anualmente (AABB, 2003).

No que se refere aos receptores dos CPs, cerca de 85% pertencem às unidades de oncologia e hematologia adulta e pediátrica ou de transplante de medula óssea, os quais representam um grupo de pacientes acentuadamente imunossuprimidos, suscetíveis ao desenvolvimento de graves consequências, caso a bolsa transfundida esteja contaminada (UHC, 1998).

2.10 Métodos de detecção

Com a epidemia causada pelo HIV, o foco das atenções foi prevenir a transmissão de vírus. Dessa maneira, ocorreu uma diminuição dos estudos sobre a contaminação bacteriana em hemocomponentes, apesar desta permanecer como a maior causa de morbidade e de mortalidade a transfusão (BLAJCHMAN, 1995).

Existem várias estratégias para reduzir a transfusão de hemocomponentes contaminados com bactérias, as quais podem ser agrupadas em quatro grandes categorias:

prevenção, detecção bacteriana, eliminação bacteriana e inibição do crescimento (BRECHER e HAY, 2005). Para detectar bactérias em hemocomponentes é necessário um intervalo de tempo para a etapa de proliferação destas, para que se tornem passíveis de detecção em um pequeno volume de amostra. Sendo assim, conhecer o crescimento característico das bactérias nos hemocomponentes é essencial antes de se estabelecer uma estratégia de detecção (BRECHER e HAY, 2005).

Várias técnicas têm sido sugeridas para a triagem da contaminação bacteriana em CPs, mas nenhuma padronizada, a isso se deve ao fato de nenhuma atender todos os requisitos necessários, destacando, em especial, alta sensibilidade e especificidade, curto intervalo de tempo, custo acessível e padronização da técnica para uso (MITCHELL e BRECHER, 1999). Abaixo estão relatados os métodos de detecção bacteriana em CPs mais utilizados mundialmente:

- Parâmetros metabólicos

O crescimento bacteriano pode resultar em consumo de glicose e produção de ácidos, provocando uma diminuição no pH do meio. Assim, concentrações de glicose baixas e níveis baixos de pH têm sido amplamente utilizados como indicadores de uma possível presença de bactérias. Dessa forma, o método da fita reagente para avaliar a concentração de glicose e a detecção do pH foram utilizados em diversos estudos (WERCH et al., 2002; HAY E BRECHER, 2004).

Sendo que, concentrações de glicose menor que 250mg/dL e pH inferior à 7 têm sido utilizados como indicadores da presença bacteriana (BURSTAIN et al. 1997). Mesmo que estes testes sejam rápidos, de fácil execução e de baixo custo, eles não são muito sensíveis, devido ao fato de detectarem apenas concentrações de bactérias iguais ou superiores a 10^7 - 10^8 UFC/mL e de que algumas espécies bacterianas não diminuem o pH do meio, quando presentes (MOHAMMADI, 2006). Estudo realizado por Tarrand et al., em 2004 mostraram a incapacidade destes testes em detectar *S. epidermidis* (TARRAND et al., 2004).

- Microscopia

O exame microscópico tem sido proposto como triagem de bactérias em CPs e os corantes de Gram e de Laranja de Acridina são normalmente utilizados. Estes métodos possuem baixa sensibilidade, apenas detectando altos níveis de contaminação bacteriana, uma vez que os limites de detecção estão entre 10^5 - 10^6 UFC/mL para o Gram e 10^4 - 10^5 UFC/mL para a Acridina (MITCHELL e BRECHER, 1999).

Uma sensibilidade melhor ainda pode ser obtida com exame microscópico pelo método de *Scansystem* otimizado (Hemosystem, Marselha, França). Este é realizado em 70

minutos e tem uma sensibilidade de 5×10^3 UFC/ml, mas é complexo e requer operadores especializados e treinados; por isso não é muito utilizado (SCHMIDT et al, 2005). Existe ainda o método de Epifluorescência, que combina uma coloração fluorescente de ácido nucléico e a microscopia de epifluorescência automatizado e sua faixa de detecção é entre $3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL para GN e GP (SEEVER et al., 2001).

- Métodos baseados na detecção de DNA/RNA

Esses métodos são amplamente empregados, tendo como características a rapidez e a sensibilidade na triagem de bactérias em CPs. Estudo demonstrou que na técnica da Reação em cadeia da Polimerase em tempo real - *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) a sensibilidade foi de 30 UFC/mL (SEN, 2000). No entanto, este ensaio apresenta limitações, não distinguindo entre bactérias vivas e mortas, risco de contaminação dos reagentes e dificuldade de aplicação (SHERIDAN et al., 1998).

Um estudo utilizando o método Eletroquimioluminescência demonstrou uma sensibilidade aproximada de 10^5 UFC/mL (CHANEY et al., 1999). Tentativas de aumento da sensibilidade deste ensaio foram realizadas, resultando em uma melhoria para 10^4 UFC/mL. No entanto, esta sensibilidade não é suficiente para detectar os baixos níveis iniciais de bactérias presentes nos CPs. Além do mais, a complexidade e a duração deste ensaio tornam difíceis a sua incorporação no uso rotineiro (RIDER e NEWTON, 2002).

Ensaio de amplificação de ácido nucléico - *Nucleic acid amplification techniques* (NAT) são largamente usados em hemocentros para detectar vírus, sendo muito sensíveis e rápidos. Ensaio NAT que detectaram contaminação bacteriana em CPs já foram publicados (SCHMIDT et al., 2006a; STORMER et al., 2007). Uma pesquisa em CPs mostrou uma sensibilidade de 5×10^3 UFC/mL (MOHAMMADI et al., 2003).

- Imunoensaio

Sistema de detecção de vários gêneros de bactérias em plaquetas - *pan genera detection* (PGD) (Verax biomedical, Worcester, USA). Este teste é útil na detecção de uma ampla gama de bactérias. Estudos preliminares mostraram 100% de sensibilidade e especificidade em relação à cultura automatizada. O ensaio é rápido, em torno de 20 minutos e capaz de detectar cerca de 10^3 UFC/mL (HALL et al., 2004).

- Análise da fluorescência ativada por separação celular - *Fluorescence-activated cell sorting analysis* (FACS)

As bactérias são detectadas por análise de citometria de fluxo. A sensibilidade do ensaio é de 10^5 UFC/ml (MOHR et al., 2006) e uma etapa de pré-incubação em meio de crescimento bacteriano aumenta a sensibilidade para 10 UFC/ml (SCHMIDT et al., 2006b).

- Métodos automatizados de cultura

Dois métodos de cultura foram aprovados pelo *FDA* para a detecção de contaminação bacteriana em CPs. Os testes são: *BacT/Alert*® (BioMérieux, Boxtel, Netherlands) e o sistema de detecção bacteriana aprimorado não automatizado - *enhanced bacterial detection system* - (*eBDS*) (Pall Medical, Covina, CA) (*FDA*, 2004).

O *BacT/Alert*® é um método colorimétrico e amplamente utilizado para detectar microrganismos no sangue e nos fluidos corporais. Cultura baseada na detecção de CO₂ como indicador de crescimento bacteriano e detecção de bactérias aeróbias e anaeróbias. Produção de CO₂ por bactérias provoca uma diminuição do pH, isso faz com que o sensor mude de cor, o que resulta em um aumento da reflexão da luz vermelha (THORPE et al., 1990).

Sendo um sistema de fácil uso, atualmente vários hemocentros implementaram esse método na rotina da triagem para detectar a contaminação bacteriana nos CPs. Vários estudos têm demonstrado a confiabilidade e a sensibilidade deste sistema (MCDONALD et al., 2001, 2002; BRECHER et al., 2001, 2002, 2004a). Com o *BacT/Alert*®, 1 - 10 UFC/mL podem ser detectadas. Algumas bactérias podem ser detectadas nas 24 a 48 h, mas as de crescimento lento apenas acima de 48 h, como *P. acnes* (BRECHER et al., 2004b). Outro inconveniente é que, durante a inoculação pode ocorrer contaminação, resultando em falsos-positivos. Falsos-negativos também já foram relatados, devido ao baixo nível inicial de bactérias (MERTENS e MUYLLE, 1999).

O *eBDS* é baseado no princípio de medição do consumo de O₂ como indicador de crescimento bacteriano. A porcentagem de O₂ é medida com um analisador de O₂. Taxas menores ou iguais a 19,5 são usadas como ponto de corte para diferenciar as unidades contaminadas. Um estudo piloto realizado por Ortolano et al., em 2003, demonstrou a capacidade deste método em detectar níveis de bactérias entre 1-5x10² UFC/mL, após 24 h de incubação (ORTOLANO et al., 2003).

Entretanto, com o lento crescimento de algumas bactérias, pode ser necessário um tempo maior de incubação para alcançar estes níveis. Este sistema permite a detecção de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, mas não de anaeróbias estritas. Em estudo relatado por Rock et al, em 2004, este método detectou contaminação bacteriana em CPs a qual foi confirmada por metodologias manuais. O teste é de fácil execução e requer menos de 5 minutos para ser concluído, sendo especialmente útil para uso hospitalar, pouco antes da transfusão (ROCK et al., 2004).

Embora nem todos os CPs positivos sejam detectados antes da transfusão, o sistema de cultura é capaz de impedir a transfusão da maioria dos CPs contaminados com concentrações de bactérias clinicamente significativas (DE KORTE et al., 2006).

- Redução ou inativação de organismos patógenos

Novos métodos com o objetivo de reduzir os patógenos contaminantes de CPs estão sendo investigados. Baseados na inativação fotoquímica de bactérias, o teste conhecido como *Intercept technology* já está disponível (SVAOOR et al., 2002). Testes preliminares em plaquetaféreses, armazenadas por 5 dias, demonstraram uma efetiva inativação de bactérias. Além disso, foi eficaz na inativação de uma série de vírus (HIV, HCV, HBV, HTLV, citomegalovírus, parvovírus B-19) e alguns parasitas (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana*) (MOHAMMADI, 2006). Estes resultados são promissores. No entanto, problemas de toxicidade residual dos agentes fotoquímicos e os efeitos na qualidade de plaquetas deverão ser posteriormente investigados (AUBUCHON et al., 2004).

- Métodos de detecção utilizados atualmente em bancos de sangue

Atualmente, no que se refere às metodologias de detecção bacteriana nos bancos de sangue do exterior, os CPs são triados por métodos de cultura, na sua maioria. Entre esses, o sistema *BacT/Alert*® é usado quase que exclusivamente. Ele é usado em todos os países onde a triagem bacteriana tem sido implementada. Nos EUA, 90% de todos os CPs são testados com esse sistema (PIETERSZ et al., 2007). Atualmente, três métodos para a detecção de bactérias, baseados em cultura, são licenciados nos EUA: *BacT/Alert* (BioMerieux), *eBDS* (Pall) e *Scansytem* (Hemosystem) (FDA, 2004; KAUFMAN, 2006). Atualmente testes moleculares baseados na detecção genômica das bactérias vêm sendo desenvolvidos. A Tabela 1 descreve, resumidamente, os ensaios de detecção bacteriana com os limites de detecção citados anteriormente.

Tabela 1 - Métodos de detecção de contaminação bacteriana em CPs atualmente disponíveis, juntamente com os seus limites de detecção:

Sistema de detecção	Limite de detecção (UFC/mL)
BacT/Alert	10
RT-PCR	30
DNA/RNA	5x10
<i>NAT</i>	5x10
<i>eBDS</i>	1 - 5x10 ²
<i>Scansystem otimizado</i>	10 - 10 ³
Imunoensaio	10 ³
Epifluorescência	3 - 5 x 10 ³
Acridina	10 ⁴ - 10 ⁵
<i>FACS</i>	10 ⁵
Eletroquioluminescência	3-5x10 ⁵
Gram	10 ⁵ - 10 ⁶
Parâmetros metabólicos	10 ⁷ - 10 ⁸

Fonte: Adaptado de MOHAMMADI, 2006 e ROOD, 2011.

Em suma, várias são as metodologias que podem ser utilizadas para detectar a contaminação bacteriana, anterior à transfusão de CPs. No entanto, necessita-se da seleção de um método adequado que deve ser fundamentado em uma combinação de sensibilidade e rapidez. Além do mais, é indispensável que isso seja equilibrado com os benefícios, riscos e custos de cada método de triagem, antes de sua introdução na rotina (MOHAMMADI, 2006).

2.11 Reações sépticas

Uma reação séptica transfusional pode ser caracterizada através de sinais e sintomas tais como: febre (com aumento de temperatura de 1 a 2 °C), calafrios, tremores, taquicardia,

hipotensão, ruborização, náusea, vômitos e choque. Pode ser imediata, quando ocorre em até 24 h após a transfusão, ou tardia, após as 24 h (BRASIL, 2007).

Sinais e sintomas encontram-se descritos no Manual Técnico de Hemovigilância da ANVISA (BRASIL, 2007) e os parâmetros de Bone et al., são fontes disponíveis para auxiliar na caracterização de uma bacteremia. Considera-se: - sepse: presença de duas ou mais das seguintes condições: temperatura $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$, frequência cardíaca >90 bpm, frequência respiratória >20 ipm ou $\text{pCO}_2 <32$ mmHg, contagem de leucócitos $>12.000/\text{mm}^3$ ou $<4.000/\text{mm}^3$, ou 10% de formas imaturas; - sepse grave: sepse associada a disfunção de órgão, hipoperfusão ou hipotensão e choque séptico: hipotensão induzida pela sepse (BONE et al., 1992).

Mesmo que a sepse bacteriana após infusão de sangue seja rara, episódios de transfusão associados à septicemia podem levar a desfechos fatais ou a outras sequelas graves. Em vista disso, é fundamental que os clínicos estejam conscientes deste problema e considerem a possibilidade de contaminação bacteriana quando estiverem investigando reações transfusionais febris, especialmente em pacientes que receberam transfusão de CPs (BURNS e WERCH, 2004).

A comunidade de Medicina Transfusional vem tentando reduzir a contaminação bacteriana por transfusão, fornecendo várias instruções para isso, como a melhoria da desinfecção da pele antes da doação, desvio dos primeiros 10 mL da coleta, a triagem dos doadores e a cultura dos produtos doados. Mesmo com estas medidas em prática ocorreram várias vítimas fatais, devido às reações sépticas transfusionais (SHEPPARD et al., 2005).

Melhorias na detecção da contaminação bacteriana são desafios a almejar, não apenas de sensibilidade e de especificidade, mas também de eficiência econômica e logística para fornecer um abastecimento seguro de CPs para pacientes, que são únicos em suas necessidades e vulnerabilidades (BURNS e WERCH, 2004). Talvez a mais promissora abordagem considerada para a redução ou prevenção de transfusões associadas à sepse seja a utilização de testes para detectar bactérias diretamente nos componentes sanguíneos pouco antes de sua infusão. Há um grande potencial para a aplicação de modernas técnicas da biotecnologia para o desenvolvimento simples, acessível e eficaz dos métodos de ensaio de detecção de bactérias no sangue (WAGNER et al., 1994).

Além disso, faz-se necessário que normas de biossegurança sejam seguidas na execução de técnicas de antisepsia junto a um controle de qualidade de hemocomponentes no que se refere à contaminação bacteriana, visto que falhas nesta etapa constituem um dos principais interferentes nos processos de contaminação de componentes sanguíneos

(SANTOS et al., 2008). Apesar da cultura bacteriana, em todos os CPs obtidos, ainda não ser exigida pelas autoridades sanitárias do Brasil, constitui consenso clínico a necessidade de sua introdução e realização em todas as amostras (RIBEIRO e KUTNER, 2003).

A implantação do controle de qualidade nos Serviços de Hemoterapia tem papel relevante na obtenção de resultados confiáveis (GUERIN e BURTET, 2006). Lamentavelmente, apesar de a contaminação bacteriana ser uma complicação passível de prevenção, frequentemente é desconhecida e/ou subnotificada, problema perpetuado por várias décadas. A subnotificação dessas reações ocorre por vários motivos; entre eles destaca-se a desconsideração de uma contaminação bacteriana frente a uma reação transfusional, ou os microrganismos isolados nos CPs são confundidos com agentes contaminantes de cateter, ou ainda devido a elevada porcentagem de reações hemolíticas não febris após o uso de CPs (BLAJCHMAN e GOLDMAN, 2001).

A fim de minimizar o impacto da contaminação bacteriana em saúde pública, se torna fundamental a implementação, pelo sistema de vigilância brasileiro, nos Bancos de Sangue e Serviços de Transfusão dos mesmos padrões adotados pela AABB, em 2004: este determina o emprego de medidas para detectar e limitar a contaminação bacteriana em todos os CPs.

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 Artigo 1 – Contaminação bacteriana em concentrados plaquetários: identificação, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e sepse associada à transfusão.



Artigo/Article

Contaminação bacteriana em concentrados plaquetários: identificação, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e sepse associada à transfusão

Bacterial contamination on platelet concentrates: identification, antimicrobial susceptibility profile and transfusion-related sepsis

Rosiéli Martini¹, Cláudia Barbisan Kempfer¹, Mônica de Abreu Rodrigues², Fábio Teixeira Kuhn³, Fabiane Rigatti¹, Viviane Ratzlaff³, Zanoni Segala³ e Rosmari Hörner^{1,4}

RESUMO

Introdução: Devido à sepse bacteriana associada à transfusão de concentrados plaquetários (CPs) ter sérias consequências clínicas para os pacientes, alguns procedimentos têm sido incorporados na preparação e no controle de qualidade dos componentes sanguíneos para reduzir o risco da contaminação bacteriana. Este artigo descreve a prevalência da contaminação bacteriana dos CPs que foram transfundidos, o espectro bacteriano detectado com seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e as reações transfusionais nos receptores. **Métodos:** Um total de 292 CPs (278 randômicos e 14 por aférese), proveniente do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS) de Santa Maria foi testado. As quantidades de 100µL e 200µL foram coletadas da porção tubular da bolsa de plaquetas e semeadas utilizando dois tipos de metodologias. **Resultados:** Em cinco unidades (1,7%; 5/292) foram isoladas bactérias pela metodologia qualitativa e apenas uma pela quantitativa. *Staphylococcus epidermidis* foi o microrganismo identificado em todas as amostras. Dois pacientes apresentaram sepse associada à transfusão com desfecho fatal. **Conclusões:** A contaminação bacteriana pelas transfusões de CPs constitui-se num importante problema de saúde pública devido a sua associação com altas taxas de morbidade e mortalidade. Neste estudo, somente microrganismos gram-positivos foram isolados sendo que nenhuma amostra obtida por aférese apresentou contaminação.

Palavras-chaves: Concentrados plaquetários. Contaminação bacteriana. Sepse. *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial sepsis associated with the transfusion of platelet concentrates (PCs) results in serious clinical implications for patients. Given these implications, certain procedures have been integrated into the preparation and quality control of blood components to reduce the risk of bacterial contamination. This article describes the prevalence of bacterial contamination on transfused PCs, the bacterial spectrum detected and their antimicrobial susceptibility profile and transfusion reactions in receptors. **Methods:** A total of 292 PCs (278 random and 14 per apheresis) from the Blood Center of the State of Rio Grande do Sul (HEMORGS), located in the city of Santa Maria, were tested. Quantities of 100µL and 200µL were collected from platelet bag tubing and seeded using two methodologies. **Results:** Using the qualitative methodology, bacteria were isolated in five units (1.7%; 5/292), while only one was isolated using the quantitative methodology. *Staphylococcus epidermidis* was the microorganism identified in all samples. Two patients died of transfusion-related sepsis. **Conclusions:** Bacterial contamination due to PC transfusion is considered a major public health problem due to its association with high rates of morbidity and mortality. In this study only gram-positive microorganisms were isolated and none of the samples obtained by apheresis presented contamination.

Key-words: Platelet Concentrate. Bacterial contamination. Sepsis. *Staphylococcus epidermidis*.

1. Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2. Iniciação Científica, Laboratório de Bacteriologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 3. Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS. 4. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Endereço para correspondência: Prof^a Rosmari Hörner. Lab Bacteriologia/DACT/UFSM. Prédio 26, sala 1201, Campus da UFSM, 97015-900 Santa Maria, RS.

Telefax: 55 55 3220-8751

e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com

Recebido para publicação em 02/06/2010

Aceito em 20/08/2010

INTRODUÇÃO

Embora o risco de infecção viral tenha diminuído consideravelmente nos últimos anos, a contaminação bacteriana de concentrados plaquetários (CPs) é, atualmente, o maior perigo remanescente de infecção em transfusões sanguíneas^{1,2}. Mesmo que o número de bactérias presentes na bolsa no momento da coleta seja pequeno, a estocagem destes hemocomponentes a uma temperatura entre 20-24°C por 5-7 dias facilita a replicação bacteriana^{3,4}.

Apesar de esta contaminação ser considerada o maior risco de infecção na transfusão de plaquetas, a associação entre as espécies bacterianas responsáveis pela contaminação, a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e as reações transfusionais não estão ainda bem caracterizadas⁵.

A transfusão de bolsas de CPs constitui um importante suporte no tratamento de pacientes, especialmente nas unidades de hematologia-oncologia¹. Por isso há um grande risco na transfusão de produtos sanguíneos contaminados, uma vez que a maioria dos receptores são pacientes imunossuprimidos, mais susceptíveis ao desenvolvimento de complicações clínicas agudas ou retardadas^{6,7}.

Microrganismos gram-positivos, principalmente do gênero *Staphylococcus* são os responsáveis pela maioria dos casos de contaminação dos CPs. A triagem realizada nos serviços de hemoterapia inclui duas etapas: um questionário que analisa as condições de saúde relatadas pelo doador e a realização do controle de qualidade das bolsas. Porém, nem sempre essas etapas poderão identificar a fonte e a presença bacteriana^{8,9}. A doação de sangue deve ser em condições assépticas, mediante uma só punção venosa e sistema de coleta fechado e estéril¹⁰. No Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS), a higiene do local da punção é realizada primeiramente com algodão embebido com digluconato de clorexidina seguido de álcool 70%.

No Brasil, atualmente, está em vigor a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 153, de 14 de junho de 2004¹⁰ do Ministério da Saúde, a qual regulamenta o processo de doação de sangue, de hemocomponentes e de hemoderivados. Considerando que todo o processo desde a coleta, processamento e transfusão de sangue deve ser efetuado com altíssimo controle de qualidade, evitando a propagação de patologias e afastando qualquer tipo de contaminação, esta RDC define que 1% da produção mensal ou 10 unidades por mês, independente da quantidade produzida, sejam submetidos à cultura para detecção de bactérias¹⁰.

Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência da contaminação microbiológica nos CPs randômicos e por aférese, a identificação bacteriana e o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 292 amostras, obtidas no HEMORGS de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS).

MÉTODOS

Foram analisadas 292 amostras de CPs: 278 obtidos pela centrifugação do sangue total (plaquetas randômicas) e 14 pelo método de aférese (plaquetaférese), coletadas no HEMORGS no período de 2009/2010. O estudo constituiu-se de duas etapas: hemovigilância ativa (prospectiva) e passiva (retrospectiva). As culturas foram realizadas a partir da porção tubular das bolsas de plaquetas, correspondente a um tamanho aproximado de 10cm, da qual foram retiradas alíquotas equivalentes a um volume médio de 100µL e de 200µL de CPs. Cabe relatar que o fragmento usado neste estudo correspondeu à parte não utilizada pelo HEMORGS. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), onde se realizou esta investigação. Os CPs foram semeados em Cabine de Segurança Biológica II, exaustão total, com prévia desinfecção da porção tubular da bolsa de plaquetas com álcool 70%, por aproximadamente 1min.

Hemovigilância ativa

Culturas quantitativas^{11,12} e qualitativas^{11,13} foram realizadas de acordo com a metodologia relatada na literatura, com algumas modificações.

Semeadura em placa de ágar sangue (AS) de carneiro, com contagem (quantitativa)

Dos CPs coletados da porção tubular da bolsa de plaquetas, 100µL foram semeados em AS e incubados a 35°C +/- 2°C em atmosfera de microaerofilia, por 24-48h. Posteriormente foi efetuada a análise das placas e a contagem das UFC por mL de CPs. Amostras que apresentaram crescimento bacteriano, independente do número de colônias desenvolvidas, foram consideradas positivas (utilizou-se o fator de multiplicação 10). Na sequência, foi efetuada a identificação fenotípica e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) utilizando metodologia convencional¹⁴ e automação (MicroScan®-Siemens).

Semeadura em caldo Mueller Hinton (qualitativa)

Aproximadamente 200µL dos CPs da porção tubular da bolsa de plaquetas foram semeados em 2mL de caldo Mueller Hinton e incubados por 5 dias a 35°C +/- 2°C, ar ambiente. Após este período, aproximadamente 10µL do caldo contendo a amostra foram repicados em AS e seguidos os mesmos procedimentos de identificação e TSA. As amostras que em 48h não demonstraram nenhum crescimento

bacteriano no AS, foram consideradas negativas. Nas amostras com colônias bacterianas (positivas), procedeu-se novamente o repique do caldo, para exclusão de uma possível contaminação.

Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Foi efetuado com as cepas isoladas utilizando disco-difusão, e automação, seguindo os procedimentos padrões referidos no *Clinical and Laboratorial Standards Institute* 2010 (CLSI)¹⁵. Frente ao antimicrobiano vancomicina foi realizada somente a metodologia de microdiluição em caldo com a determinação da concentração mínima inibitória (CIM).

Hemovigilância passiva

Foi realizada uma análise retrospectiva^{11,16} através da investigação das reações clínicas reportadas nos pacientes os quais receberam as transfusões dos CPs contaminados. Cabe ressaltar que todos os CPs obtidos no HEMORGS são utilizados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

Ética

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 0285.0.243.000-09.

RESULTADOS

Em 5 (1,7%) das 292 amostras de CPs cultivadas qualitativamente houve crescimento bacteriano. Na análise quantitativa, apenas em uma amostra (1/292), houve crescimento de 10² UFC/mL (cultura número 1).

Todas as 5 amostras estavam contaminadas com a mesma espécie bacteriana: *Staphylococcus epidermidis*. Através dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos utilizando difusão do disco e automação (MicroScan®-Siemens), as 5 cepas de *S. epidermidis* isoladas mostraram-se sensíveis frente a sulfametoxazol-trimetoprima, oxacilina, cefoxitina, linezolida, tetraciclina, vancomicina, rifampicina, daptomicina e tigeciclina, e resistentes a eritromicina, penicilina e clindamicina. O CIM da vancomicina para as amostras 1 e 4 foi de 4µg/mL e para as amostras 2, 3 e 5 de 2µg/mL (sensível).

Os dados da hemovigilância passiva encontram-se na **Tabela 1**. As bolsas número 2, 4 e 5 foram transfundidas por meio de *pool* de unidades randômicas para o paciente 1 e a bolsa 1 e 3 para os pacientes 2 e 3, respectivamente.

TABELA 1 - Dados e perfil clínico dos pacientes receptores das bolsas de plaquetas contaminadas das 292 amostras de CPs obtidas no HEMORGS de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS), no período de 2009/2010.

Dados e perfil clínico	Pacientes		
	1	2	3
Idade	23 anos	46 anos	1 mês
Número de plaquetas	8.000 /mL	93.000/mL	55.000/mL
Doença de base	Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	Nefropatia diabética	Colestase neonatal
Setor hospitalar	Unidade de hematologia-oncologia	Unidade nefrológica	Unidade de terapia intensiva
Antibioticoterapia	Sim	Não	Sim
Reação febril	Sim: 39°C	Sim: 38°C	Sim: 39,8°C
Cultura Qualitativa	Positiva	Positiva	Positiva
Cultura Quantitativa	Negativa	Positiva(100 UFC/mL)	Negativa
Hemocultura	Positiva: <i>Streptococcus sp.</i>	Não realizada	Negativa
Evolução do paciente	Óbito	Alta hospitalar	Óbito

DISCUSSÃO

A sepse associada à transfusão de plaquetas é reconhecida como a mais comum complicação infecciosa da terapia da transfusão sanguínea, sendo duas vezes mais frequente que a transmissão viral associada à transfusão¹¹.

Vários estudos já foram realizados empregando metodologias de cultura convencional e automatizada para detectar a contaminação bacteriana em CPs obtidos por aférese e randomicamente^{13,17,18}. Todos os CPs contaminados do nosso estudo foram obtidos randomicamente. Porém, no estudo de Hsueh cols¹⁹ 1,2% dos CPs contaminados foram obtidos por aférese e somente 0,3% randomicamente.

A prevalência da contaminação bacteriana em plaquetas obtidas por um único doador através de aférese (transfundidas isoladamente) e as plaquetas randômicas (obtidas pelo sangue total - 5 a 7 unidades transfundidas em forma de *pool*) nos EUA, varia de 1:2.000 - 1:3.000, equivalendo a 0,05% - 0,03% de contaminação^{11,20}.

Recentemente, Walther-Wenke cols¹⁸ encontraram um valor de 0,3% de culturas contaminadas de CPs, (169 de 52.243 amostras analisadas), sendo que, em 45 (26,6%) foram identificados *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN). Hsueh cols¹⁹ detectaram 0,34% (8 positivas em 2.338 amostras) de contaminação bacteriana em CPs com 75% (6 das 8 contaminações) de *S. epidermidis*.

Num estudo realizado em um hospital universitário em Goiânia, Brasil, Cunha cols¹⁷ detectaram uma contaminação bacteriana de 0,4% de CPs contaminadas (8 de 2.000 amostras investigadas), sendo bactérias gram-positivas as responsáveis por 38% das contaminações.

Yomtovian cols¹¹ em seu estudo realizado em um hospital universitário durante 13 anos (1991 a 2004), empregando diferentes métodos de vigilância para a detecção de contaminação bacteriana em plaquetas, obtiveram um percentual de 0,018% (-0,02%) de CPs contaminados (38/216.283), sendo que em 71% (27/38) das amostras SCN foi o microrganismo isolado.

Cunningham e Cash¹³ detectaram em seu estudo uma taxa de 6,3% de contaminação bacteriana em CPs, (63 positivas de um total de 1.000 amostras), sendo o *S. epidermidis* responsável por 83% (52/63) das contaminações.

Os contaminantes encontrados nos CPs são predominantemente bactérias gram-positivas, principalmente *Staphylococcus spp* o qual faz parte da flora residente da pele^{11,13,18}. Como a maioria dos contaminantes prevalentes é oriunda da pele, há a necessidade de executar uma desinfecção que seja comprovadamente eficaz no local da punção. A esterilidade dos componentes deverá ser mantida durante o processamento empregando-se métodos assépticos, equipamentos e soluções estéreis e livres de pirogênios, como também a transferência de componente de uma bolsa-satélite para outra deverá realizar-se em circuito fechado¹⁰.

A septicemia é uma complicação que pode ocorrer após a transfusão de plaquetas com contaminação bacteriana. Há vários casos relatados associando sepse após infusão plaquetária^{1,18,19,21-24}. Uma reação transfusional é caracterizada através de sinais e sintomas tais como: febre (com aumento de temperatura de 1 a 2°C), calafrios, tremores, hipotensão, ruborização, náusea, vômitos e choque²⁵. Porém, nos pacientes que recebem por transfusão CPs contaminados, esta sintomatologia clínica pode passar facilmente despercebida caso não seja diagnosticada como uma reação transfusional transmitida

pelo CP contaminado¹⁹. Isto porque é complexo diferenciar os sintomas mencionados, devido à sua semelhança com os efeitos adversos dos medicamentos em uso pelos pacientes ou até mesmo por representarem um efeito esperado da antibioticoterapia¹⁹. Complementarmente, o isolamento de determinados gêneros de microrganismos em um exame cultural de CPs deixa dúvidas na etiologia da sepse¹⁹.

Comparando as reações transfusionais deste estudo com as de outros grupos de pesquisa, os resultados foram similares^{1,18,19,21-24}. Em 1992, Muder cols²¹ descreveram uma reação séptica após infusão plaquetária que estava contaminada por *S. epidermidis* em um homem de 66 anos que apresentou os sintomas específicos de uma reação transfusional, relatados anteriormente²⁵. A cultura do sedimento do *pool* de plaquetas revelou uma contagem de 10⁵ UFC/mL. Hsueh cols¹⁹, em 2009, também publicaram em seu estudo uma reação transfusional ocasionada pelo mesmo microrganismo, sem citar ou ter efetuada a quantificação das UFC/mL.

Em nosso estudo, o paciente 1 (sexo masculino, 23 anos, portador de leucemia mielóide aguda - LMA), conforme mostra a **Tabela 1**, fazia uso dos antibióticos cefepime, vancomicina e meropenem quando recebeu a primeira bolsa contaminada (bolsa número 2); contudo, não apresentou febre. Depois de 4 dias, sua hemocultura resultou positiva para *Streptococcus sp*. No 7º dia, continuava a apresentar plaquetopenia devido a sua condição imunossuprimida. Novamente, em forma de *pool*, plaquetas foram transfundidas contendo duas unidades de bolsas contaminadas. No 8º dia, ele apresentou estado febril persistente (38-39°C) indo a óbito por infecção do trato respiratório inferior e choque séptico.

O paciente 2 (sexo masculino, 46 anos, transplantado de rim) não fazia uso de antimicrobianos no dia da infusão da bolsa de plaquetas contaminada (bolsa número 1). No dia seguinte apresentou-se febril (38°C) e, uma semana depois, submeteu-se a procedimento cirúrgico com prescrição de Clavulin® 500mg como tratamento profilático. Porém, devido a falta deste antibiótico na farmácia hospitalar, o paciente fez uso do cefadroxil 500mg. Dois dias depois teve alta.

O 3º paciente tratou-se de um recém-nascido com um mês de vida e colestase neonatal, ao qual eram administrados cefotaxima, vancomicina, amicacina e meropenem. Ele recebeu por transfusão uma das bolsas de plaquetas contaminadas (bolsa 3). Posteriormente apresentou febre (39,8°C). Foi coletado sangue para hemocultura no dia posterior à transfusão resultando numa hemocultura negativa. O óbito foi registrado no mesmo dia da coleta da hemocultura por choque séptico e extrema colestase.

A transfusão de plaquetas continua sendo imprescindível nos casos de trombocitopenia, cirurgias, acidentes com grande perda sanguínea e no tratamento de pacientes leucêmicos os quais apresentam períodos prolongados de plaquetopenia. Ainda que existam riscos associados, a transfusão de CPs permanece sendo o melhor tratamento frente a estas situações. Portanto, é necessário o aprimoramento das medidas a fim de prevenir, diagnosticar e reduzir a contaminação bacteriana e suas reações transfusionais associadas.

As metodologias convencionais existentes para a detecção da contaminação bacteriana em CPs têm limitações na sensibilidade e especificidade. Neste estudo, a origem das 5 cepas provavelmente foi a pele, por isso, torna-se necessário uma adequada desinfecção das mãos e da pele dos doadores, condições ideais de armazenamento e triagem em 100% das amostras de CPs obtidas pelos Bancos de Sangue.

Atualmente, a prevalência da contaminação bacteriana em CPs não se encontra bem caracterizada, possivelmente subestimada. Como é complexa a eliminação da contaminação das bactérias provenientes da pele nos hemocomponentes, é essencial reconhecer os sintomas clínicos iniciais associados com sepsis transfusional para a instituição imediata do tratamento adequado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à equipe de coordenação e controle de qualidade do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

SUORTE FINANCEIRO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria.

REFERÊNCIAS

- Niu MT, Knippen M, Simmons L, Holness LG. Transfusion-transmitted *Klebsiella pneumoniae* Fatalities 1995 to 2004. *Transfus Med Rev* 2006; 20:149-157.
- Palavecino EL, Yomtovian RA, Jacobs MR. Bacterial contamination of platelets. *Transfus Apher Sci* 2010; 42:71-82.
- Simon TL, Dzik WH, Snyder EL, Stowel CP, Stauss RG. Rossi's Principles of Transfusion Medicine. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002.
- McDonald CP, Roy A, Mahajan P, Smith R, Charlett A, Barbara JA. Relative values of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang* 2004; 86:178-182.
- Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA. Relationship between Bacterial Load, Species Virulence, and Transfusion Reaction with Transfusion of Bacterially Contaminated Platelets. *Clin Infect Dis* 2008; 46:1214-1220.
- Clawson CC, White JG. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. *Am J Pathol* 1971; 65:367-380.
- University Health System Consortium. University Health Consortium technology assessment. Platelet transfusion guidelines, 1998. Disponível em: <http://www.uhc.edu>.
- Burns KH, Werch JB. Bacterial contamination of platelet units: a case report and literature survey with review of upcoming American Association of Blood Banks requirements. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128:279-281.
- Sazama, K. Bacteria in blood for transfusion. A review. *Pathol Lab Med* 1994; 18:350-365.
- Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução 153 de 13 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de Junho; Seção 1, 2004. p. 68.*
- Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH, Downes KA, Morrissey AM, Bajaksouzian S, et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion* 2006; 46:719-730.
- Guerin GD, Burter LP. Avaliação de Concentrados Plaquetários produzidos pelo serviço de Hemoterapia de Hospital de Santo Ângelo: implantação de um sistema de controle de qualidade. *Rev Bras Anal Clin* 2006; 38:287-292.
- Cunningham M, Cash JD. Bacterial contamination of platelet concentrates stored at 20° C. *J Clin Pathol* 1973; 26:401-404.
- Koneman EW, Stephen AD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 6ª ed.* Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S20. CLSI, Wayne, PA; 2010.
- Roth VR, Kuehnert MJ, Haley NR, Gregory KR, Schreiber GB, Arduino MJ, et al. Evaluation of a reporting system for bacterial contamination of blood components in the United States. *Transfusion* 2001; 41:1486-1492.
- Cunha GS, Leão L, Pimenta F. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. *Transfusion* 2008; 48:282-285.
- Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, Geis G, Burkhart J, Höchsmann B, et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol* 2010; 89:83-91.
- Hsueh JC, Ho CF, Chang SH, Pan FZ, Chen SC, Shi MD, et al. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. *Transfus Med* 2009; 19:350-356.
- Kleinman SH, Kamel HT, Harpool DR, Vanderpool SK, Custer B, Wiltbank TB, et al. Two-year experience with aerobic culturing of apheresis and whole blood-derived platelets. *Transfusion* 2006; 46:1787-1794.
- Muder RR, Yee YC, Rihs JD, Bunker M. *Staphylococcus epidermidis* bacteremia from transfusion of contaminated platelets: application of bacterial DNA analysis. *Transfusion* 1992; 32:771-774.
- Fang CT, Chambers LA, Kennedy JM, Strupp A, Fucci MC, Janas JA, et al. Detection of bacterial contamination in apheresis platelet products: American Red Cross experience, 2004. *Transfusion* 2005; 45:1832-1835.
- Chang AH, Kirsch CM, Mobashery N, Johnson N, Levitt LJ. *Streptococcus bovis* Septic Shock Due to Contaminated Transfused Platelets. *Am J Hematol* 2004; 77:282-286.
- Coutinho H, Galloway A, Ajdukiewicz K, Cleeve V. Platelet contamination causing *Staphylococcus aureus* septicemia. *J Clin Pathol* 2010; 63:262-263.
- Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Hemovigilância: Manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas, Brasília, DF; 2007.

3.2 Artigo 2 – Avaliação da detecção de contaminação bacteriana em concentrados plaquetários utilizando bacteriológico quantitativo e redução da concentração de glicose e do pH

AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM CONCENTRADOS PLAQUETÁRIOS UTILIZANDO BACTERIOLÓGICO QUANTITATIVO E REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE E DO PH

Rosiéli Martini, Mônica de Abreu Rodrigues***, Andressa Oss-Emer
Soares, Livia Gindri, Maisa Kraulich Tizotti*, Cláudia Barbisan
Kempfer*, Magda Roehrs*, Leticia Eichstaedt Mayer*, Viviane
Ratzlaff, Rosmari Horner***

Universidade Federal de Santa Maria

RESUMO: Introdução: A contaminação bacteriana em concentrados plaquetários (CPs) constitui um problema crítico devido ao risco de eventos sépticos associados à transfusão. A cultura microbiológica dos CPs apresenta alguns desafios como o volume pequeno do inóculo inicial e o tempo para a liberação do resultado. Neste estudo nós avaliamos o desempenho na detecção da contaminação em 79 amostras de CPs provenientes do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul de Santa Maria no ano de 2010 por duas diferentes metodologias. Material e Métodos: Cultura bacteriológica quantitativa: semeadura de 100 µL de CPs em ágar sangue; e marcadores metabólicos: medida de glicose e pH com tiras reagentes. Resultados: Em todas as análises deste estudo a glicose apresentou valores positivos e 91,13% ficou com pH acima de 7,5 e 8,87% abaixo de 7,0. No 5º dia 83,55% das amostras apresentaram glicose negativa. Não houve crescimento bacteriano em nenhuma das amostras que apresentaram pH inicial ácido. A taxa de contaminação bacteriana foi de 1,27% (*Staphylococcus epidermidis*). Conclusão: Concluímos que os marcadores metabólicos utilizados não permitiram a detecção da contaminação bacteriana, uma vez que a amostra positiva não mostrou relação com a acidificação do pH e do consumo da glicose.

Descritores: PH; Glicose; Contaminação bacteriana; Concentrados plaquetários; Cultura microbiológica.

EVALUATION OF DETECTION OF BACTERIAL CONTAMINATION IN PLATELET CONCENTRATES USING THE QUANTITATIVE BACTERIOLOGICAL AND REDUCTION THE CONCENTRATION OF GLUCOSE AND PH

ABSTRACT: Background: Bacterial contamination in platelet concentrates (PCs) is a critical problem due to the risk of septic events associated with transfusion. The microbiological culture of the PCs present some challenges as the small volume of inoculum and time to release of results. In this study we evaluated the performance in the detection of contamination in 79 samples PCs from the Blood Center of the State of Rio Grande do South of Santa Maria in 2010 by two different methodologies. Methods: Quantitative bacteriological: seeding of 100 µL of PCs on blood agar; and metabolic markers: measurements of glucose and pH by reagent strips. Results: In all analysis of this study the glucose showed positive values and 91.13% remained above pH 7.5 and 8.87% below 7.0. At 5° day 83.55% of the samples were negative glucose. There was no bacterial growth in any of the samples with initial pH acid. The rate of bacterial contamination was 1.27% *Staphylococcus epidermidis*). Conclusion: We conclude that metabolic markers used did not allow the detection of bacterial contamination, since the positive sample was not related to the acidification of pH and consumption of glucose.

Descriptors: PH; Glucose; Bacterial contamination; Platelet concentrates; Microbiological culture.

* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

***Acadêmica do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Introdução

Atualmente a infusão de hemocomponentes contaminados por bactérias é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os receptores.¹ Este fato representa um considerável problema de saúde pública, especialmente no Brasil.^{1,2} A contaminação bacteriana pode estar presente em qualquer hemocomponente, principalmente em concentrados plaquetários (CPs), devido à temperatura de armazenamento (20 - 24 °C) que facilita a proliferação dos microrganismos. Os CPs são os responsáveis pela maior parte dos casos de reações sépticas transfusionais.^{3,4}

Vários procedimentos *screening* são utilizados na rotina pelos bancos de sangue para reduzir os incidentes da contaminação bacteriana de CPs.^{2,5-8} Alguns métodos microbiológicos têm sido efetivos na detecção das bactérias presentes nos CPs, porém com o inconveniente de necessitar um grande intervalo de tempo para a liberação do resultado. Além disso, a maioria destes métodos possui baixa sensibilidade para detectar pequenas quantidades de unidades formadoras de colônia por mL de sangue (UFC/mL).^{5,9}

É de consenso que o crescimento bacteriano provoque uma redução nos níveis de glicose e pH nos líquidos biológicos, como por exemplo, nos CPs. Consequentemente, a diminuição da glicose e dos níveis de pH têm sido amplamente utilizados como indicadores de presença bacteriana.¹⁰⁻¹⁴ Este teste é um dos métodos sugeridos pela *American Association of Blood Banks* (AABB), sendo utilizado em vários países.¹² Entretanto, até o momento, não constatamos nenhum estudo brasileiro que utilizasse esta metodologia com a finalidade de investigar contaminação bacteriana em CPs.

Desta maneira, visto que a transfusão de CPs contaminados com bactérias pode causar reações transfusionais sépticas com desfechos fatais, a prevenção e/ou a redução da ocorrência destas reações constitui um dos maiores desafios enfrentados nos bancos de sangue e na medicina transfusional.^{15,16}

Por isso o nosso estudo objetivou investigar a contaminação bacteriana em CPs através de duas metodologias: cultura quantitativa e variação da concentração da glicose e dos níveis de pH das amostras provenientes do Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul (HEMORGS), de Santa Maria (RS).

Material e métodos

Coleta e destino das amostras

Foram analisadas 79 amostras de CPs de até 24 h as quais foram coletadas no HEMORGS, durante os meses de setembro e outubro de 2010. Não existiram critérios de exclusão, portanto todas as amostras de CPs obtidas nesse período foram incluídas nesta pesquisa.

Estas amostras foram provenientes de dois tipos de coleta: 74 CPs obtidos pela centrifugação do sangue total (plaquetas randômicas) e 5 obtidos pelo método de aférese (plaquetaféreses). Os CPs avaliados neste estudo foram coletados a partir da porção tubular das bolsas. Cabe relatar que a porção utilizada neste estudo seria desprezada pelo HEMORGS, não acarretando desperdício de CPs. Após a coleta as amostras foram

encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), onde foi efetuado este estudo.

Preparação das amostras

No laboratório de Bacteriologia as amostras foram manipuladas em cabine de segurança biológica, classe II, tipo B2. A porção tubular da bolsa de plaquetas foi desinfetada com álcool 70% (fricção por aproximadamente 1 minuto).

As duas metodologias realizadas neste estudo foram:

Semeadura em placa de ágar sangue (AS) de carneiro, com contagem (quantitativa).^{2,17,18}

Foram semeados 100 µL dos CPs em AS, com o auxílio de pipeta automática, os quais foram incubados a 35 °C ± 2 °C 5% de CO₂, por 24 – 48 h.

A análise do crescimento de colônias bacterianas foi feita nas 24 – 48 h após a semeadura. Nas amostras em que houve crescimento de colônias (positivas) foi efetuada a sua contagem e o resultado relatado foi em UFC/mL, utilizando fator de multiplicação de 10X. Com as amostras positivas foram realizadas, na sequência, coloração de Gram e identificação fenotípica convencional¹⁹ e automatizada (MicroScan®-SIEMENS).

Medida do pH e glicose.¹⁰⁻¹⁴

Aproximadamente 200 µL da porção tubular da bolsa de plaquetas, com o auxílio de seringa e agulha estéreis, foram transferidos para um tubo de vidro esterilizado e rosqueado contendo 2 mL de caldo Mueller Hinton (CMH) e incubados por 5 dias a 35 °C ± 2 °C. A glicose e o pH foram mensurados com o auxílio de tiras reagentes (Biocolor®-Bioeasy) nas primeiras 24 h após a coleta, em amostra de CPs puro, posterior a adição das plaquetas em 2 mL do CMH e na sequência efetuaram-se mais quatro medidas até o quinto dia, com intervalo de 24 h em cada análise.

Com relação à glicose, nesta pesquisa as amostras foram agrupadas como glicose positiva (faixa de 100 - 2000 mg/dL) e glicose negativa (inferior à 50 - 100 mg/dL); em relação ao pH agrupadas em três níveis diferentes: amostras básicas (acima de 7,5), neutras (7,0 - 7,5) e ácidas (abaixo de 7,0).

Também foi utilizado um controle negativo constituído apenas de CMH, que foi manipulado da mesma forma que as amostras, com a finalidade de verificar possíveis influências na determinação da glicose e do pH.

Conceitos éticos

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 0285.0.243.000-09.

Resultados

Em 1 das 79 amostras (1,27%) houve crescimento bacteriano de incontáveis UFC/mL (método bacteriológico quantitativo), oriunda de CP randômico. Cocos gram-positivos foram visualizados na microscopia (coloração de Gram), sendo identificados como *Staphylococcus epidermidis* (metodologia fenotípica convencional e automatizada).

Nos parâmetros metabólicos concentração de glicose e pH, na metodologia na qual foram utilizadas as fitas de urina, detectamos uma grande variação na concentração da glicose medida no primeiro e no quinto dia. Em todas as amostras analisadas neste estudo, a glicose apresentou-se positiva, quando medida na plaqueta pura. No primeiro dia, quando a plaqueta foi semeada no CMH, 92,41% mostrou-se positiva. 62,03% das amostras no segundo dia foram negativas. No quarto e quinto dias em aproximadamente 84% das amostras a glicose foi negativa (Gráfico 1).

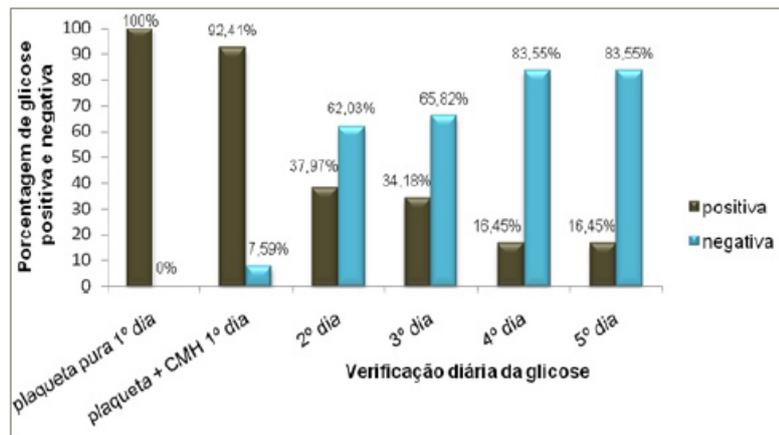


Gráfico 1 — Relação da porcentagem positiva ou negativa dos níveis de glicose de todas as amostras analisadas durante a realização diária das suas medidas.

A amostra que apresentou crescimento bacteriano foi glicose positiva no primeiro dia (500 mg/dL). Nos segundo, terceiro, quarto e quinto dias a amostra positiva permaneceu com glicose positiva (100 mg/dL). O controle negativo, composto apenas de CMH, mostrou-se negativo durante todas as medidas (primeiro ao quinto dia).

O pH apresentou oscilação nos seus valores, em todas as amostras analisadas (Gráfico 2). No primeiro dia, 8,86% das amostras (7 de 79) tiveram pH ácido (plaqueta pura sem CMH). A amostra na qual foi isolado o *S. epidermidis*, teve pH neutro na plaqueta pura e no CMH no primeiro dia. No segundo dia apresentou-se pH neutro e nos demais dias, pH básico (8,0). Além disso, algumas amostras isentas de microrganismos que inicialmente eram neutras ou básicas tornaram-se ácidas no final da análise.

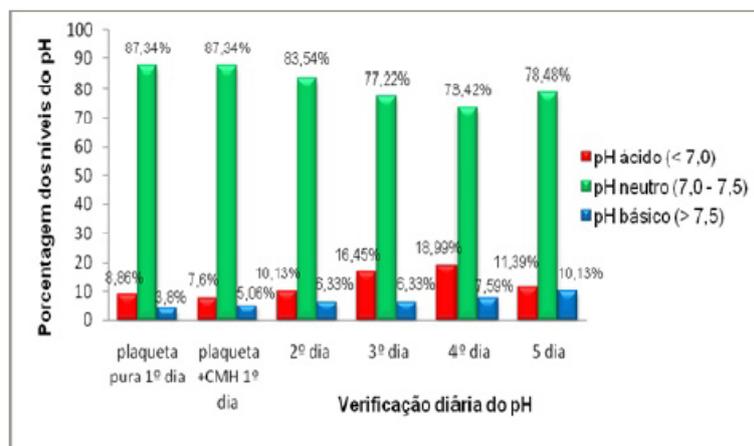


Gráfico 2 — Relação da porcentagem dos níveis de pH de todas as amostras durante a realização diária das suas medidas.

Discussão

A contaminação bacteriana das plaquetas constitui o risco de infecção mais comum das transfusões. A presença de bactérias contaminantes em plaquetas pode desencadear eventos sépticos. Os receptores destes CPs transfundidos normalmente são pacientes imunossuprimidos e, portanto mais suscetíveis a infecções bacterianas.⁴

Atualmente, devido à emergência de episódios de sepse após transfusões de plaquetas, os serviços de hemoterapia juntamente com os órgãos responsáveis pelo controle de qualidade vêm buscando desenvolver e aprimorar técnicas eficientes, práticas e mais rápidas que as bacteriológicas na detecção de bactérias em componentes sanguíneos.

A cultura bacteriana é claramente o método atual de escolha para a detecção da contaminação bacteriana em plaquetas obtidas por aférese (único doador), porém, este método não tem sido prático para a avaliação dos CPs randômicos.¹⁴ O que pode tornar o método de cultura microbiológica não realizável numa rotina de banco de sangue, onde há uma grande escala de produção de CPs derivados de sangue total, é devido à elevada mão de obra que depende da quantidade de CPs produzidos e pelo intervalo de tempo necessário para o crescimento bacteriano, diferentemente das amostras de plaquetaféreses, as quais são de baixa produção e direcionadas a determinados pacientes. Por esta razão, desde 2004 a AABB permitiu o uso de técnicas alternativas para a detecção de bactérias. Esta associação permite incluir o uso da coloração bacteriana (Gram) e de fitas de urina multi-reagentes para detectar a redução da concentração de glicose e pH causada pelo crescimento bacteriano.¹² Além do mais, nos países acreditados pelo Food and Drug Administration (FDA), a análise microbiológica é preconizada em todas as amostras de plaquetas.¹²

Já no Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 153, de 14 de junho de 2004 estabelece que o controle microbiológico seja realizado em apenas 1% das bolsas produzidas ou em 10 amostras aleatórias por mês; a escolha deve ser em relação a que apresentar maior número de amostras.²⁰ Esta nossa RDC não preconiza a execução da triagem em toda a produção mensal e não descreve a metodologia de cultura preconizada para este fim.²⁰

A prevalência da contaminação bacteriana neste estudo foi de 1,27% (1 de 79), semelhante ao estudo anterior por nós realizado no ano de 2009 e início de 2010, no qual detectamos 1,7% (5 de 292) de contaminação nos CPs do HEMORGS.² Já Cunha e cols (2006) detectaram uma contaminação menor em CPs, de 0,4% (8 de 2000), em estudo realizado em Goiânia (BRA).¹

A taxa de contaminação encontrada em nosso estudo, também quando comparada com pesquisas realizadas fora do Brasil, se encontra um pouco maior aos estudos de Walther-Wenke e cols (2010) que encontraram um valor de 0,3% de culturas contaminadas de CPs (169 de 52.243), estudo realizado em centros da Cruz Vermelha na Alemanha.²¹ E em outra pesquisa efetuada na Fundação do serviço de doação de sangue em Taiwan, Hsueh e cols (2009) obtiveram 0,34% (8 de 2.338) de contaminação em CPs.²²

No entanto, quando compararmos a prevalência de contaminação deste estudo com o descrito por Cunningham e cols (1973), realizado em um centro de transfusão no sudeste da Escócia, nossos valores se encontraram 5 vezes inferior a contaminação relatada (6,3% = 63 de 1000).²³

No que se refere aos marcadores metabólicos utilizados, a redução da concentração da glicose a limites não detectáveis, em 62,03% das amostras no segundo dia da análise, e de aproximadamente 84% no final do quarto e quinto dias, poderia sugerir a contaminação das

mesmas. Portanto, não foi possível estabelecer nenhuma relação da variação da glicose com a presença de bactérias nos CPs, já que a negatificação da glicose (83,55%) ocorreu numa taxa aproximadamente 66 vezes superior a prevalência bacteriana encontrada neste estudo (1,27%) não sendo um indicativo de contaminação bacteriana dos CPs. A redução do pH também não mostrou ser um parâmetro confiável na mesma detecção, uma vez que iniciou com 8,86% (7 das 79) das amostras com pH ácido; teve o maior pico no quarto dia, com 18,99% das amostras com este pH e baixando para 11,39% no quinto dia. Além do mais, a amostra em que foi isolado os *S. epidermidis* na cultura, não apresentou pH ácido.

Quando comparamos a metodologia do pH e da glicose com a cultura quantitativa, nossos resultados não demonstraram nenhuma relação da diminuição do pH e do consumo da glicose com a presença de bactéria na amostra de plaquetas analisada, estando em conformidade com o estudo realizado por Myhre e cols (1985) o qual também verificou que o pH pode diminuir, permanecer inalterado, ou, em alguns casos, até aumentar nas amostras com crescimento bacteriano.²⁴ Também está de acordo com demais estudos descritos na literatura internacional, como o executado por Tarrand e cols (2004) na Universidade do Texas (EUA) que afirma que as tiras reagentes são consistentemente insensíveis para detectar contaminação por *S. epidermidis* em plaquetas.²⁵

Estudo feito por Clark e cols (2006) na Universidade do Sistema de Saúde da Virgínia (EUA), também compararam os resultados da cultura com o pH e a glicose, e concluíram que as fitas reagentes não identificaram nenhuma amostra que foi positiva pela cultura microbiológica.¹⁴ Na pesquisa realizada por Werch e cols (2002) na Universidade do Texas (EUA), somente 2 de 30 CPs contaminados foram detectados pelas fitas reagentes, correlacionando-se pobremente com a contaminação bacteriana, demonstrando assim um baixo valor preditivo positivo.¹¹

Wagner e cols (1996) na Cruz Vermelha Americana (EUA) e Burstain e cols (1997) na Universidade da Carolina do Norte (EUA), também alertam que para as fitas detectarem a contaminação bacteriana por estes dois parâmetros são necessárias altas taxas de UFC/mL, em torno de 10^7 UFC / mL, o que demonstra sua baixa sensibilidade.^{10,26} Entretanto, Burstain e cols (1997) afirmam que as tiras reagentes podem ser utilizadas de forma rápida e barata para a detecção de contaminação bacteriana em CPs.²⁶ Isto é devido que estes testes são considerados simples, rápidos e de baixo custo, porém, podem apresentar uma altíssima taxa de falsos-positivos.²⁷

Os nossos resultados nos permitem concordar com a conclusão de Clark e cols (2006), o qual descreve que nenhuma técnica alternativa, que não a bacteriológica, para a detecção da contaminação bacteriana em CPs é efetiva.¹⁴ Yomtovian e cols (1993) em um estudo efetuado na Universidade da Reserva de Case Western (EUA), e a AABB (2004) relatam que o bacteriológico detecta bactérias à níveis de 10^2 UFC / mL e o bacterioscópico somente quando os níveis estão em $10^4 - 10^6$ UFC / mL.^{12,28} Além disso, a coloração ainda depende da prática do operador para a liberação do resultado, representando, portanto, uma análise não facilmente incorporável da rotina diária.¹⁴

Com as amostras ensaiadas neste estudo, não houve correlação entre as duas metodologias utilizadas na detecção da contaminação bacteriana dos CPs. Este estudo foi uma tentativa de avaliar o desempenho de uma nova metodologia (marcadores metabólicos) para investigar este tipo de contaminação, método já referido na literatura internacional destacando-se por sua facilidade na execução, pelo curto intervalo de tempo e por seu custo acessível.

Na prática, a mudança da cor da fita reagente na detecção do pH e concentração de glicose poderia representar uma metodologia rápida e de fácil interpretação por qualquer operador na rotina dos hemocentros, diferentemente das dificuldades na leitura do método que usa a coloração de Gram e/ou da cultura, a qual necessita de mais tempo para a liberação. No entanto, nossos resultados demonstraram ser este método não específico e pouco confiável para detectar bactérias em plaquetas.

Conclusão

Mesmo que haja melhorias no que se refere ao procedimento anterior à coleta, como por exemplo, na assepsia do local da punção, no questionário de triagem, na realização completa do leucograma e entre outros, no Brasil, permanece a necessidade de buscarmos aprimoramento das técnicas existentes e o uso de métodos automatizados para a detecção de contaminantes bacterianos principalmente em plaquetas. Destaca-se, em especial o Bact/Alert, o qual é considerado um sistema de detecção microbiana com tecnologia de ponta, destacando-se por sua alta sensibilidade e especificidade, rapidez e exatidão na obtenção dos resultados e além do mais por 95% de recuperação de microrganismos em até 24 horas. Só assim, será possível garantirmos maior segurança nas transfusões sanguíneas, já que os pacientes são únicos em suas necessidades.

Referências Bibliográficas

1. Cunha Júnior GS. Prevalência da contaminação bacteriana em concentrados de plaquetas do serviço de hemoterapia de um hospital universitário em Goiânia-GO. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.
2. Martini R, et al. Contaminação bacteriana em concentrados plaquetários: identificação, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e sepse associada à transfusão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010; 43: 682-685.
3. Goldman M, Blajchman MA. Blood product-associated bacterial sepsis. *Transfus Med Rev* 1991; 5: 73-83.
4. Blajchman MA, Goldman M. Bacterial contamination of platelet concentrates: incidence, significance, and prevention. *Semin Hematol* 2001; 38: 20-26.
5. Mitchell KMT, Brecher ME. Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. *Transfus Med Rev* 1999; 13: 132-44.
6. Pietersz RNI, Engelfriet CP, Reesink HW. Detection of bacterial contamination of platelet concentrates. *Vox Sang* 2003; 85: 224-239.
7. Morel P, Deschaseaux M, Bertrand X, Naegelen, Talon D. Transfusion et bactéries: risque résiduel et perspectives de prévention. *Transfus Clin Biol* 2003; 10: 192-200.
8. Blajchman MA, Goldman M, Baeza F. Improving the bacteriological safety of platelet transfusion. *Transfus Med Rev* 2004; 18: 11-24.
9. Murphy WG, Smyth J. Testing for bacteria in platelet concentrates: defining the parameters. *Transfus Apher Sci* 2001; 24: 247-249.

10. Wagner SJ, Robinette D. Evaluation of swirling, pH, and glucose tests for the detection of bacterial contamination in platelet concentrates. *Transfusion* 1996; 36: 989-993.
11. Werch JB, Mhaweck P, Stager CE, Banez EI, Lichtiger B. Detecting bacteria in platelet concentrates by use of reagent strips. *Transfusion* 2002; 42: 1027-1031.
12. American Association of Blood Banks Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 23rd ed, AABB, Bethesda, 2004, Section 5.1.5.1, p 11.
13. Hay SN, Brecher ME. Validation of pH and glucose determination for bacteria detection screening in platelet concentrates stored in the Terumo Teruflex XT612 platelet container. *Transfusion* 2004; 44: 1395.
14. Clark P, Parsons TM, Boyd JC, Dewey P, Mintz PD. Imported Platelets Demonstrate Decreased pH and Glucose by Reagent Strip Testing when Compared to Locally Derived Platelets. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2006; 36: 443-446.
15. Depcik-Smith ND, Hay SN, Brecher ME. Bacterial contamination of blood products: factors, options, and insights. *J Clin Apher* 2001; 16: 192-201.
16. Kopko PM, Holland PV. Mechanisms of severe transfusion reactions. *Transfus Clin Biol* 2001; 8: 278-281.
17. Guerin GD, Burter LP. Avaliação de Concentrados Plaquetários produzidos pelo serviço de Hemoterapia de Hospital de Santo Ângelo: implantação de um sistema de controle de qualidade. *Rev Bras Anal Clin* 2006; 38: 287-92.
18. Yomtovian RA, et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion* 2006; 46: 719-730.
19. Koneman EW, Stephen AD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008.
20. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução 153 de 13 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do Cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de Junho; Seção 1, 2004. p. 68.*
21. Walther-Wenke G, et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol* 2010; 89: 83-91.
22. Hsueh JC, et al. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. *Transfus Med* 2009; 19:350-356.
23. Cunningham M, Cash JD. Bacterial contamination of platelet concentrates stored at 20° C. *J Clin Pathol* 1973; 26: 401-404.
24. Myhre BA, Demianew SH, Yoshimori RN, Nelson EJ, Carmen RA. pH changes caused by bacterial growth in contaminated platelet concentrates. *Ann Clin Lab Sci* 1985; 15: 509-514.
25. Tarrand J, Sazama KJ, Lichtiger B. Reagent Strips May Not Detect *Staphylococcus epidermidis* Contamination of Platelet Concentrates. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 852-853.
26. Burstain JM, Brecher ME, Workman K, Foster M, Faber GH, Mair D. Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips: glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. *Transfusion* 1997; 37: 255-258.
27. Byrne KM, Grose LH, Renoud, KJ. Detecting Platelet Contamination: It's in the Bag. *Transfusion therapy is plagued by an onslaught of viral pathogens. ADVANCE for Medical Laboratory Professionals* 2004; 16:18.
28. Yomtovian R, Lazarus HM, Goodnough LT, Hirschler AM, Morrissey AM, Jacobs MR. A prospective microbiologic surveillance program to detect and prevent the transfusion of bacterially contaminated platelets. *Transfusion* 1993; 33: 902-909.

Rosiéli Martini — Rua Floriano Peixoto 1321 ap 202, Centro, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Telefone: (55)30251275

E-mail: rosifarma@gmail.com

Recebido em 31 de janeiro de 2011.

Aprovado em 07 de abril de 2011.

3.3 Manuscrito 1 - Bacteriological analysis of platelets and cases of septic reactions associated with transfusion of contaminated samples.¹

¹ Manuscrito submetido para publicação para o Jornal Transfusion and Apheresis Science em 17/08/2011.

Cover Letter

Dear Journal Editorial Team

We enclose a manuscript titled “**Bacteriological analysis of platelets and cases of septic reactions associated with transfusion of contaminated samples**” for consideration in the section manuscript.

I confirm all authors have seen and agree with the contents of the manuscript and confirm the work has not been submitted or published elsewhere in whole or in part.

Sincerely,

Rosmari Hörner

*Manuscript

Type of Contribution:

The propose of this study was to verify the bacterial contamination in platelets through the screening bacteriological of all samples, in order to ensure greater patient safety and thereby reduce morbidity and mortality of the recipients.

Date of preparation:

January of 2011

Number of text pages:

19

Number of tables:

0

Number of figures:

1

Names of authors:

Rosiéli Martini^{1,2}, Rosmari Horner^{2,3}, Mônica de Abreu Rodrigues^{1,2}, Cláudia Barbisan Kempfer^{1,2}, Máisa Kraulich Tizotti^{1,2}, Viviane Ratzlaff^{2,4}

1- Pharmaceutical and masters students of Post-Graduation in Pharmaceutical Sciences Program, Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

2- Bacteriology Laboratory and Department of Clinical and Toxicology Analyses of the Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

3- Doctor teacher of Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

4- Pharmaceutical quality control of Hemocenter of the State of Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS, Brazil.

Complete postal address(es) or affiliations:

Campus of UFSM, 97015-900 Santa Maria, RS, Brazil

Full telephone, Fax N°. and E-mail address of the corresponding author:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Miss. Rosiéli Martini. Bacteriology Laboratory and Department of Clinical and Toxicology
Analyses of the Federal University of Santa Maria. Building 26, Room 1201,
Telephone/Fax: (55) (55) 3220-8751
email': rosifarma@gmail.com

BACTERIOLOGICAL ANALYSIS OF PLATELETS AND CASES OF SEPTIC REACTIONS ASSOCIATED WITH TRANSFUSION OF CONTAMINATED SAMPLES.

ABSTRACT

Introduction: For years, platelet transfusion therapy has been playing an important role in controlling patients with hematological and oncological diseases. However, platelet transfusion represents a serious risk for bacterial sepsis. This study aimed to verify the bacterial contamination index in platelet concentrates (PCs) obtained from the Blood Center of the State of Rio Grande do Sul (HEMORGS). **Methods:** All 612 samples of PCs from HEMORGS were analyzed in August 2009 and January 2010. We used a qualitative methodology which was modified manually in order to detect bacterial contamination. The patients who received the platelet units with confirmed positive cultures had their medical records analyzed. After the prospective study, a retrospective analysis of the samples of PCs checked by the bacteriological control from HEMORGS since its foundation (2008) until 2010 was made. **Results:** 480 samples (10 monthly samples of plateletpheresis and 10 of whole blood-derived platelets) were analyzed in order to compare the contamination index for both studies. Of 1092 samples, 15 were found to be contaminated (6 of retrospective analysis

1 and 9 of prospective). In prospective study, isolated microorganisms were nine
2 *Staphylococcus epidermidis*, but in retrospective two *Staphylococcus* sp., two glucose non-
3 fermenting gram negative bacilli, one *Streptococcus* sp. and one *Proteus mirabilis*. We report
4 3 feasible cases of bacterial sepsis associated with the transfusion of CPs analyzed by
5 prospective study. **Conclusion:** Bacterial sepsis associated with platelet transfusion is today
6 the most frequent infectious complication of transfusion medicine. Although complex, it is
7 important to recognize transfusion sepsis in patients to reduce morbidity and mortality.
8
9

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19 **Keywords:** Platelet, Transfusion, Transfusion reactions.
20
21
22
23
24
25

26 INTRODUCTION

27
28
29
30

31 The transfusion of platelet concentrates (PCs) units is an essential support in treating
32 platelet deficient patients who are mainly from the hematology-oncology unit [1]. Of all
33 blood-derived products, platelets are the blood component preparations most susceptible to
34 contamination from bacteria [2]. This contamination is one of the main causes of death from
35 sepsis after transfusion [3].
36
37
38
39
40
41
42

43 The current prevalence of bacterial infection due to PCs contamination is much greater
44 (1 in 2000 units) than other types of infection transmitted by transfusion, such as the Human
45 Immunodeficiency Virus (HIV) or Hepatitis C (1 in 2 million transfused units) [4-6]. Gram-
46 positive cocci are the most frequent contaminants of platelets, with *Staphylococcus* sp. and
47 *Streptococcus* sp. the most prevalent. Coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) are the
48 leaders in transfusion reactions in platelet bags [7]. *Staphylococcus epidermidis* stands out for
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 causing chronic infections in hospitalized patients due to their capacity to form biofilms, their
2 main virulence mechanism [7-9].
3

4 According to a study by Krishnan and Brecher, *S. epidermidis* inoculation in a platelet
5 unit resulted in 10^4 colony forming units per milliliter (CFU/mL) after 3 days and 10^8
6 CFU/mL after 6 days [10]. Furthermore, the minimal concentration required to cause fatal
7 reactions would be 10^8 CFU/mL [10]. In 2008, Jacobs et al report that a concentration of 10^3
8 CFU/mL would be responsible for transfusion reactions and 10^6 CFU/mL for serious
9 reactions, potentially fatal and fatal [11].
10
11

12 A septic transfusion reaction can be characterized by signs and symptoms like: fever
13 (increase in temperature from 1 to 2 °C), chills, shakes, tachycardia, hypotension, redness,
14 nausea, vomiting and shock [12]. This reaction may be immediate, when it occurs within 24
15 hours after transfusion, or late, after 24 hours [12]. However, clinical severity of transfusion
16 reactions depends greatly on the species involved, the bacterial load and the clinical
17 conditions of the recipients and their base diseases [13].
18
19

20 Since the foundation of the Hemocenter of the State of Rio Grande do Sul
21 (HEMORGS), in Santa Maria, in May 2008, bacteriological control has been conducted on
22 whole blood-derived platelets (10 monthly samples) and apheresis platelets (10 monthly
23 samples). This quality control follows the norms recommended by Collegiate Board
24 Resolution (RDC) no. 153, of June 14, 2004 [14]. All samples obtained by HEMORGS are
25 sent to the University Hospital of Santa Maria (HUSM).
26
27

28 We report 3 potential cases of transfusion reactions associated with whole blood-
29 derived platelets contaminated by *S. epidermidis* (detected by prospective study) in patients
30 admitted at HUSM, in August 2009 and January 2010. The cases refer to 2 patients with
31 Acute Myeloid Leukemia (AML), 16 to 23 years old, and a newborn, 1 month old, diagnosed
32 with cholestasis.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

METHODS

Collection of platelets by apheresis system and whole blood-derived platelets

The platelet units were routinely collected by apheresis and by whole blood-derived platelets from voluntary donors at, after washing the donor's arms with soap and water and asepsis with alcohol 70 % in the puncture site. The prospective study was made during 6 months. The first month (August 2009) and the last (January 2010) were chosen for collecting the samples and the bacteriological analysis in order to eliminate any seasonal interference. 100% of the production in the chosen months were collected, totalizing 612 samples (21 of plateletpheresis and 591 random ones), 320 samples in August and 292 in January. The samples which presented bacterial growth were verified whether they were transfused, and if so there was an analysis of the recipient's medical records.

Besides the prospective study, there was a parallel retrospective research with the data of the bacteriological control from HEMORGS, concerning 2 years (from May 2008 to May 2010), totalizing 480 samples of platelets (240 of plateletpheresis and 240 random ones).

The bacteriological control from HEMORGS is made according to the current legislation in Brazil (RDC n. 153, June 14, 2004), which praises the bacteriological analysis in 10 samples of plateletpheresis and 10 samples of whole blood-derived platelets a month, chosen randomly.

Investigation of bacterial contamination

1 We use a modified manual qualitative methodology [15,16] in prospective study to
2 detect bacterial contamination. Approximately 300 μ L, removed from the platelet bag tubing,
3
4 was cultured in 2 mL of Mueller Hinton broth (MHB) and incubated at 35 °C \pm 2 °C, ambient
5
6 air. After 5 days of incubation, 10 μ L of the broth containing the PC sample were sub-cultured
7
8 on Blood Agar (BA), and the plates were incubated in the same conditions. Bacterial
9
10 identification and the Antimicrobial Sensitivity Test (AST) of the isolated contaminant were
11
12 conducted using conventional (Kirby-Bauer) and automation methodology (MicroScan®) [17].
13
14
15
16
17
18

19 **Confirmation of bacterial contamination through reculture**

20
21
22
23
24 Those samples that within 24-48 hours demonstrated bacterial growth in the were
25
26 peaked from initial MHB to new plaques of BA and incubated at the same previous conditions
27
28 to exclude false positive recultures. When the culture was positive and with isolation of the
29
30 same bacteria from the first sub-culture, the sample was defined as "positive-confirmed".
31
32
33
34
35

36 **Cases reported of transfusion reactions**

37
38
39
40
41 The patients who received the platelet units with confirmed positive cultures had their
42
43 medical records analyzed [18]. The signs and symptoms described in ANVISA's Hemo-
44
45 Surveillance Technical Manual [12] were evaluated and the cases were classified as per the
46
47 parameters found in Bone et al. [19], considering: sepsis, the presence of two or more of the
48
49 following conditions: temperature > 38 °C or < 36 °C, heart rate > 90 bpm, respiratory rate >
50
51 20 ipm or pCO₂ < 32 mmHg, leukocyte count > 12,000/mm³ or < 4,000/mm³, or 10% of
52
53 immature forms; serious sepsis, sepsis associated with organ malfunction, hypoperfusion or
54
55 hypotension, septic shock, hypotension induced by sepsis. Furthermore, when possible, blood
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 samples were collected from patients who received contaminated platelets to verify the
2 possible condition of bacteremia and compare the isolated agent in this blood culture with the
3 one in the platelet bag.
4
5
6
7
8

9 **Genotypic identification**

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Detection of the *mecA* and *icaD* gene was then conducted using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The methodology previously described by Kearns, et al. [20] was used for the *mecA* gene. The following pair of primers was employed: SA-1 (5' CGG TAA CAT TGA TCG CAA CGT TCA 3') and SA-2 (5' CTT TGG AAC GAT GCC TAA TCT CAT 3') (Ludwig Biotec®). Presence of the *mecA* gene was seen through the amplification of the fragment with 214 base pairs, confirmed by the positive control (*S. aureus* strain ATCC 43330) and by the molecular weight marker. For detecting the *icaD* gene, which codifies biofilm formation [7], descriptions were followed. The following primers were used: (seicaDF) 5'-AAG CCC AGA CAG AGG CAA TAT CCA-3' and (seicaDR) 5'-AGT ACA AAC AAA CTC ATC CAT CCGA-3'. Presence of the *icaD* gene was seen through amplification of the fragment with 239 base pairs, confirmed by the positive control (*S. epidermidis* strain ATCC 35984). This technique was used in the blood sample of only one patient and in a positive bag of platelets which was transfused to himself because the other two patients had fatal outcome.

51 **Ethical concepts**

52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

This study was approved by the Research Ethics Committee (CEP) at the Federal University of Santa Maria (UFSM), under number 0285.0.243.000-09.

RESULTS

Rate of bacterial contamination of all samples of August 2009 and January 2010.

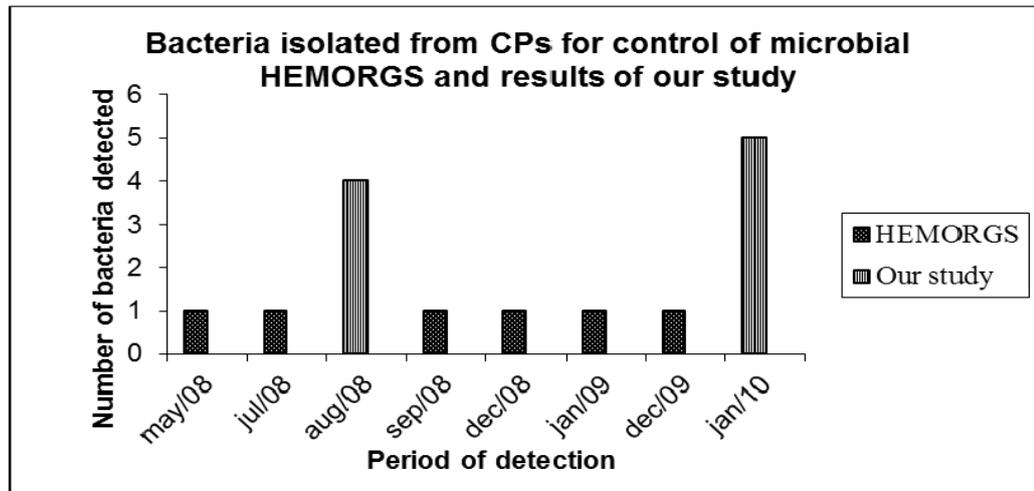
A total of 612 platelet units were analyzed through a prospective study and among them 9 (1.47%) had bacterial growth with *S. epidermidis* (4 of 9 – 44.4% in August 2009 and 5 of 9 – 55.6% in January 2010) (Table 1). Bacterial contamination was detected in the whole blood-derived platelets.

Rate of bacterial contamination found in HEMORGS control routine

From May 2008 to May 2010, a total of 480 platelet units were analyzed at the HEMORGS bacteriological screening. Of that total, 6 samples (1.25%) presented bacterial growth (2/6 – 33.33% whole blood-derived platelets and 4/6 – 66.67% apheresis platelet samples), 1/6 – 16.66% in each month: May, July, September and December of 2008, January and December of 2009 (Table 1). Among the contaminants: *Staphylococcus* sp. (2 of 6); glucose non-fermenting gram negative bacilli (GNF-GNB) (2 of 6); *Streptococcus* sp. (1 of 6) and *Proteus mirabilis* (1 de 6).

When HEMORGS detects bacterial growth in a PC sample during routine bacteriological control, it immediately informs the HUSM with the objective, if any, of avoiding transfusion with the sample in question.

TABLE 1: Bacteria isolated in PCs by the HEMORGS microbiological control and by prospective study.



21
22
23
24
25

Investigation of possible septic reactions prospective study

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

The analysis of patients' records was performed only in the prospective study, and through this, it was found that the nine contaminated samples (*S. epidermidis*) were transfused, and three of them went to the same recipient. Among the patients who received contaminated bags, 3 presented clinical symptoms of septic transfusion reaction while the other recipients did not present such symptoms.

38
39
40
41
42
43
44

The following reports are about feasible cases of septic transfusion reaction detected in the prospective study. The cases 1 and 2 are already part of a recent publication made by our research group [21]:

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Case 1. Youngster admitted to the hematology-oncology unit, male, 23 years old, patient with AML, in antimicrobial therapy with cephepime, vancomycin and meropenem, received a bag of contaminated random PC. The transfusion occurred due to thrombocytopenia resulting from underlying disease and did not show clinical symptoms of transfusion reaction. 7 days after the first transfusion the patient received five bags of random platelets, in which two of them were contaminated. After 16 hours the patient had persistent

1 fever, ranging from 38° C to 39.5° C. The patient died due to infection of the lower
2 respiratory tract, with septic shock, as recorded in the medical report
3

4 **Case 2.** Natural birth female newborn, one month old, with a clinical diagnosis of
5 neonatal cholestasis, was admitted to the neonatal intensive care unit at HUSM, taking
6 cefotaxime, vancomycin, amikacin and meropenem. She was given one contaminated PC
7 bag and after 6 hours had developed a fever of 39.8 ° C, which remained at that level. That
8 same day, the patient died of septic shock and extreme cholestasis.
9

10 **Case 3.** 16-year-old male was admitted at HUSM suspected to have AML and interned
11 at the Center for treatment of children with cancer. After three days, the diagnosis of AML
12 type M4 was confirmed and the treatment with chemotherapy and antibiotics started
13 (cefepime, trimethoprim-sulfamethoxazole, vancomycin and meropenem). In the following
14 week platelet transfusions were performed and among these transfusions the patient received
15 a contaminated sample. At the end of the transfusion the patient had high temperature (38.1°
16 C) and tachycardia. Blood culture was requested, which was positive with *S.epidermidis*. In
17 this period we collected a blood sample from the patient, the bacteria isolated from blood
18 culture showed the same sensitivity profile of the isolated strain from contaminated bag of
19 PCs. The two isolates (from the bag of PCs and from the blood culture) were sent for
20 genotypic testing. The two isolated strains proved to be negative *mecA* gene and positive
21 *icaD*.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **DISCUSSION**

52
53
54
55

56 In this study, we report on 3 possible cases of septic transfusion reactions that
57 occurred after infusion of platelet bags by *S. epidermidis*. As described by Goldman et al. [22]
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the bacteria, present in a transfused platelet bag, caused fatal septic shock in an
2 immunodepressed patient due to its opportunistic nature. Furthermore, the virulence
3 mechanisms this microorganism can present, such as the formation of biofilm, hamper the
4 evolution of therapy with antimicrobials [23].
5
6
7
8

9
10 *S. epidermidis* is part of the skin's normal microbiota [24], frequently isolated in
11 contaminated PCs bags [8,9]. Recent research reports the formation of biofilm during platelet
12 storage, indicating that the storage environment (ambient temperature) may trigger the
13 expression of this virulence and intensify the potential of this species to cause serious septic
14 transfusion reactions [25]. The capacity for biofilm production reported in hospital strains has
15 also already been observed in commensal community strains of *S. epidermidis* [26-28].
16
17
18
19
20
21
22
23

24 After blood transfusions contaminated by bacteria, recipients may remain
25 asymptomatic with imperceptible or insignificant clinical reports, and end up not being
26 investigated [29]. Others may present characteristic symptoms of septic transfusion reactions
27 in accordance with ANVISA's Hemo-Surveillance Technical Manual [12] and also fit the
28 parameters for bacteremia described by Bone et al. [19]. The clinical presentation varies and
29 depends on multiple factors, such as: the patient's immunological situation, the use of
30 antibiotics during transfusion, the number of infused CFU/mL and contaminant virulence
31 [10,30].
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 Clinically, most PCs contaminations is poorly recognized, since neutropenic patients
45 susceptible to fevers and infections may present similar clinical reports and variable
46 symptoms [10,30,31], hampering the diagnosis of septic transfusion reactions.
47
48
49
50

51 In our study, patients 1 and 2 represent possible cases of septic reaction due to the
52 persistent fever presented immediately after transfusion with contaminated bags. Insufficient
53 clinical data in medical charts hampered a more detailed analysis for confirming sepsis, and
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

furthermore, in case 1, death occurred the day after platelet transfusion thus making it impossible to draw blood.

Considering the parameters of bacteremia described by Bone et al, in 1992, the case could represent a transfusion sepsis [19], since the patient was febrile with tachycardia at the end of the transfusion, transfusion reaction was considered immediate. Moreover, bacteria which were isolated concurrently from PC and from the patient's blood culture, suggest that bacteremia was caused by the strain present in the transfused bag [12], since these bacteria also showed the same antimicrobial sensitivity profile, negative *mecA* and positive *icaD*.

The therapeutic refractoriness of this patient in relation to antibiotic therapy can be attributed to the strain's capacity to produce biofilm, which provides a protection against antimicrobials and reduces detection of the bacteria by the innate immune system [24,32].

HEMORGS's routine screening to detect bacterial contamination in platelets demonstrated contamination in 1.25% (6 of 480) from 2008 to 2010. In prospective study, in which we analyze 100% of the platelets obtained in August 2009 and January 2010, we obtained a contamination rate of 1.47%. These percentages can be considered high when compared to the values found in the USA, which varied from 0.05% - 0.03% (1:2000 - 1:3000) [18,33], and in the American Association of Blood Banks (AABB), which standard is to limit and detect bacteria in platelet components [34]. Analyzing these findings, we propose that bacteriological screening in Brazil be conducted on all platelet bags, since the methodology used is sensitive and fast, aiming to avoid transfusion from contaminated bags.

In relation to the bacteria found in prospective study, it can be concluded that the origin was probably from the donor's skin, since it was part of the resident skin's flora. Of the strains isolated in the HEMORGS PCs bacteriological control, some may have originated from the skin and others not, as in the case of glucose's GNF-GNB and the family Enterobacteriaceae (*P. mirabilis*).

1 Septic transfusion reaction cases associated with the infusion of platelet bags
2 contaminated by different bacteria were reported in several studies [1,35-39]. Reactions
3 specifically caused by *S. epidermidis* were also described by several authors [22,40-42],
4 ranging from sepsis to fatal septic shock.
5
6
7
8

9
10 Transfusion medicine is a relatively young field with greater development after the
11 second half of last century. Together with this new therapeutic approach, there were
12 associated problems, such as incompatible blood cells and plasma between donors and
13 recipients and the possibility of transfusion transmitted infections (TTI). Patients and
14 clinicians used to accept TTI as inevitable, although today, due to technological
15 advancements, there is a higher expectation of safety for obtaining and using blood derivate
16 products.
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 The emergence of bacterial infection as the major cause of mortality related to
27 infections associated with transfusion is partly due to the reduction in other risks, such as viral
28 infections. In this context, the bacteriological screening in all samples of PCs through
29 sensitive and fast methods will assure the patient more safety and this way reducing morbidity
30 and mortality of PC recipients.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **ACKNOWLEDGMENTS**

44
45
46
47

48 The authors wish to thank the quality coordination and control team at the Hemocenter
49 of the State of Rio Grande do Sul, Santa Maria, RS.
50
51
52
53
54
55
56

57 **CONFLICT OF INTEREST**

58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 The authors affirm there was no conflict of interest while elaborating this manuscript.
3
4
5
6
7
8

9 **REFERENCES**
10

- 11
12
13
14 [1] Niu MT, Knippen M, Simmons L, Holness LG. Transfusion transmitted *Klebsiella*
15 *pneumoniae* Fatalities 1995 to 2004. Transfus Med Rev 2006;20:149-157.
16
17
18 [2] Ramirez-Arcos S, Goldman M, Blajchman MA. Bacterial contamination. In:
19 Popovsky M, editor. Transfusion reactions. 3rd ed. Bethesda (MD): AABB Press; 2007;163-
20 206.
21
22
23 [3] Green M. Contaminations bacterially in the platelets concentrates. Transf Med Rev
24 1991;5:243.
25
26
27 [4] Vasconcelos E, Seghatchian J. Bacterial contamination in blood components and
28 preventative strategies: an overview. Transfus Apheresis Sci 2004;31:155-163.
29
30
31 [5] Goodnough LT, Sander A, Brecher ME. Transfusion medicine: looking to the
32 future. Lancet 2003;361:161-169.
33
34
35 [6] Jacobs MR, Palavecino E, Yomtovian R. Don't bug me: the problem of bacterial
36 contamination of blood components challenges and solutions. Transfusion 2001;41:1331-
37 1334.
38
39
40 [7] Greco C, Mastronardi C, Pagotto F, Mack D, Ramirez-Arcos S. Assessment of
41 biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated
42 platelet preparations in Canada. Transfusion 2008;48:969-977.
43
44
45 [8] Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin
46 Microbiol Rev 2005;18:195-204.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 [9] Larsen CP, Ezligini F, Hermansen NO, Kjeldsen-Kragh J. Six years' experience of
2 using the BacT/ALERT system to screen all platelet concentrates, and additional testing of
3 outdated platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. *Vox Sang*
4 2005;88:93-97.
5
6
7

8
9
10 [10] Krishnan LA, Brecher ME. Transfusion-transmitted bacterial infection. *Hematol*
11 *Oncol Clin North Am* 1995;9:167-185.
12

13
14 [11] Jacobs MR, Good CE, Lazarus HM, Yomtovian RA. Relationship between
15 bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially
16 contaminated platelets. *Clin Infect Dis* 2008;46:1214-1220.
17
18
19

20
21 [12] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
22 (ANVISA). Hemovigilância: Manual técnico para investigação das reações transfusionais
23 imediatas e tardias não infecciosas, Brasília, DF, 2007. (Brazil. Ministry of Health. National
24 Health Surveillance Agency. Hemovigilance: Technical Manual for investigation of
25 transfusion reactions early and late non-infectious, Brasilia, 2007).
26
27
28
29

30
31 [13] Public Health Agency of Canada (PHAC). Transfusion Transmitted
32 Diseases/Infections: Bacterial Contamination. Available in: <http://www.phac-aspc.gc.ca/hcai-iamss/tti-it/ttdi-eng.php> (Accessed in 20/05/2010).
33
34
35
36
37
38
39
40

41 [14] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária
42 (ANVISA). Resolução 153 de 13 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para
43 os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o
44 armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus
45 componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea.
46 Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 de Junho; Seção 1:68, 2004. (Brazil.
47 Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. Resolution 153 of June 13, 2004).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- [15] Cunningham M, Cash JD. Bacterial contamination of platelet concentrates stored at 20° C. *J Clin Pathol* 1973;26:401-404.
- [16] Cunha GS, Leão L, Pimenta F. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. *Transfusion* 2008;48:282-285.
- [17] Koneman EW, Allen SD, Janda WM.; Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2008.
- [18] Yomtovian RA, Palavecino EL, Dysktra AH, et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. *Transfusion* 2006;46:719-730.
- [19] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-1655.
- [20] Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect* 1999;43:33-37.
- [21] Martini R, Kempfer CB, Rodrigues MA, Kuhn FT, Rigatti F, Ratzlaff V, Segala Z, Hörner R. Bacterial contamination on platelet concentrates: identification, antimicrobial susceptibility profile and transfusion-related sepsis. *RSBMT* 2010;43:682-685.
- [22] Goldman M, Delage G, Beauregard P, Ismail J, Robillard P. A fatal case of transfusion-transmitted *Staphylococcus epidermidis* sepsis. *Transfusion* 2001;41:1075-1076.
- [23] Cramton S, Götz F. Biofilm development in *Staphylococcus*. In *Microbial Biofilms*. Ghannoum MA, OToole GA (eds). Washington, DC.: ASM Press 2004;64-84.
- [24] von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002;2:677-685.

1 [25] Greco C, Martincic I, Gusinjac A, Kalab M, Yang AF, Ramírez-Arcos S.
2 *Staphylococcus epidermidis* forms biofilms under simulated platelet storage conditions.
3
4 Transfusion 2007;47:1143-1153.
5
6

7 [26] Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial
8 insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus*
9 *epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides.
10 Infect Immun 2004;72:1210-1215.
11
12
13
14
15
16

17 [27] de Araujo GL, Coelho LR, de Carvalho CB, Maciel RM, Coronado AZ,
18 Rozenbaum R, Carvalho BTF, Figueiredo AMS, Teixeira LA. Commensal isolates of
19 methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on
20 polystyrene surfaces. J Antimicrob Chemother 2006;57:855-864.
21
22
23
24
25

26 [28] Satorres SE, Alcaraz LE. Prevalence of *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus*
27 *aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from patients and hospital staff. Cent
28 Eur J Public Health 2007;15:87-90.
29
30
31
32
33

34 [29] Burns KH, Werch JB. Bacterial contamination of platelet units: a case report and
35 literature survey with review of upcoming american association of blood banks requirements.
36 Arch Pathol Lab Med 2004;128:279-281.
37
38
39
40

41 [30] Blajchman MA, Goldman M. Bacterial contamination of platelet concentrates:
42 incidence, significance, and prevention. Semin Hematol 2001;38:20-26.
43
44
45

46 [31] Goldman M, Blajchman MA. Bacterial contamination of platelets. In: *Platelet*
47 *therapy*. Current status and future trends. Seghatchian J, Snyder EL, Krailadsiri P, eds.
48 Elsevier Science 2000;401-414.
49
50
51
52

53 [32] Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, Otto
54 M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against
55 major components of the human innate immune system. Cell Microbiol 2004;6:269-275.
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 [33] Kleinman SH, Kamel HT, Harpool DR, Vanderpool SK, Custer B, Wiltbank
2 TB, Nguyen KA, Tomasulo PA. Two-year experience with aerobic culturing of apheresis and
3 whole blood-derived platelets. *Transfusion* 2006;46:1787-1794.
4

5
6 [34] American Association of Blood Banks (AABB) Standards for Blood Banks and
7 Transfusion Services, 23rd ed, AABB, Bethesda, 2004, Section 5.1.5.1, p 11.
8
9

10 [35] Goldman M, Blajchman MA. Blood product-associated bacterial sepsis. *Transfus*
11 *Med Rev* 1991;5:73-83.
12
13

14 [36] Chang AH, Kirsch CM, Mobashery N, Johnson N, Levitt LJ. *Streptococcus bovis*
15 Septic Shock Due to Contaminated Transfused Platelets. *Am J Hematol* 2004;77:282-286.
16
17

18 [37] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal bacterial infections
19 associated with platelet transfusions - United States, 2004. *Morbidity and Mortality Weekly*
20 *Report (MMWR)* 2005;54:168-170.
21
22

23 [38] Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, Geis G, Burkhart
24 J, Höchsmann B, Sireis W, Schmidt M, Seifried E, Gebauer W, Liebscher UM, Weinauer
25 F, Müller TH. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of
26 bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol*
27 2010;89:83-91.
28
29

30 [3]. Coutinho H, Galloway A, Ajdukiewicz K, Cleeve V. A case of *Staphylococcus*
31 *aureus* septicaemia following platelet transfusion. *J Clin Pathol* 2010;63:262-263.
32
33

34 [40] Muder RR, Yee YC, Rihs JD, Bunker M. *Staphylococcus epidermidis* bacteremia
35 from transfusion of contaminated platelets: application of bacterial DNA analysis.
36 *Transfusion* 1992;32:771-774.
37
38

39 [41] Fang CT, Chambers LA, Kennedy J, Strupp A, Fucci MC, Janas JA, Tang
40 Y, Hapip CA, Lawrence TB, Dodd RY. Detection of bacterial contamination in apheresis
41 platelet products: American Red Cross experience, 2004. *Transfusion* 2004;45:1845-1852.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[42] Hsueh JC, Ho CF, Chang SH, Pan FZ, Chen SC, Shi MD, Chien ST. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. Transfus Med 2009;19:350-356.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

4 MATERIAL E MÉTODOS ADICIONAIS

4.1 Técnica do Crescimento Diário

4.1.1 Coleta, destino e preparação das amostras

Analisaram-se 79 amostras de CPs de até 24 h, coletadas no HEMORGS, durante os meses de setembro e outubro de 2010, 74 CPs randômicos e 5 plaquetaféreses. A coleta foi realizada a partir da porção tubular das bolsas e as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da UFSM. As amostras foram manipuladas em cabine de segurança biológica, classe II, tipo B2, sendo que a porção tubular desinfetada com álcool 70%.

4.1.2 Semeadura em Caldo Mueller Hinton

Realizou-se a técnica qualitativa descrita por Cunningham e Cash (1973) e Cunha et al. (2008), modificada por Martini et al. (2010). Ensaio no qual, aproximadamente 200 µL da porção tubular da bolsa de plaquetas, com o auxílio de seringa e agulha estéreis, foram transferidos para um tubo de vidro esterilizado e rosqueado contendo 2 mL de Caldo Mueller Hinton (CMH) e incubados por 5 dias a 35 °C ± 2 °C (CUNNINGHAM e CASH, 1973; CUNHA et al., 2008, MARTINI, 2010).

4.1.3 Semeadura diária em placa de Ágar sangue de Carneiro a 5%

Após procedeu-se a sequência do ensaio. Técnica quantitativa, descrita por Guerin e Burtet (2006) e Yomtovian et al. (2006) com algumas modificações e denominada Técnica do

Crescimento Diário. A cada 24 h de incubação 10 μ L de cada amostra foi repicado em Ágar Sangue (AS), com o auxílio de pipeta automática, e as placas incubadas em estufa bacteriológica (35 °C \pm 2 °C com 5 % de CO₂ por 24 – 48 h).

Na sequência, efetuaram-se as subseqüentes sementeiras até o quinto dia de incubação, com intervalo de 24 h em cada análise, totalizando 4 sementeiras, em 24, 48, 72 e 96 h após a incubação (GUERIN e BURTET, 2006; YOMTOVIAN et al., 2006).

4.1.4 Análise das sementeiras

As amostras que em 48 h não demonstraram nenhum crescimento de colônias foram liberadas como negativas, e as amostras que tiveram crescimento bacteriano (positivas), foram repicadas novamente para exclusão de uma possível contaminação durante a manipulação das amostras. Com as amostras positivas confirmadas foram realizadas coloração de Gram e identificação fenotípica convencional (KONEMAN, 2008) e automação (MicroScan®-SIEMENS).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ADICIONAIS

Das 79 amostras analisadas, um total de 7 (8,86%) apresentaram contaminação bacteriana no final das 96 h de incubação (quarto repique); todos de CPs randômicos. Em relação ao período de incubação diário, o que demonstrou maior índice de detecção bacteriana foi o de 24 h (3/7 - 42,86%). Os índices de contaminação e os referidos períodos encontram-se descritos na Tabela 1. Todas as amostras que apresentaram crescimento bacteriano, independente do dia do repique, demonstram também nos subseqüentes repiques presença de bactérias, confirmando a contaminação bacteriana.

Tabela 1 – Distribuição dos índices de contaminação bacteriana em amostras de plaquetas randômicas de acordo com o dia de incubação no CMH.

	PERÍODO DE INCUBAÇÃO			
	24 h	48 h	72 h	96 h
ÍNDICE DE CONTAMINAÇÃO	3/7 - 42,86%	1/7 - 14,28%	1/7 - 14,28%	2/7 - 28,58%

O índice de contaminação bacteriana identificada por este estudo é considerada elevada, quando comparada aos demais estudos atuais citados na literatura (CUNHA et al., 2008; HSUEH et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2010; WALTHER-WENKE et al., 2010). Entretanto, este ensaio foi realizado com um pequeno número de amostras de CPs, a coleta das mesmas foi de forma aleatória, onde apenas algumas amostras obtidas no dia eram separadas para esta análise. Isto se deve ao fato também que o objetivo desta técnica era analisar sua execução e seu desempenho e não a prevalência de contaminação bacteriana em CPs.

A realização desta técnica foi cansativa, demorada, necessitando de uma grande equipe e de um grande espaço físico para a sua realização, ocasionando um elevado custo, tanto de meios quanto dos demais materiais, mas apresentou boa sensibilidade. Já, no que se refere a

sua possível implementação na rotina do controle microbiológico do HEMORGS ela se torna inadequada devido aos fatores relatados acima.

Além do mais, nosso grupo de pesquisa executou esta técnica diariamente com um número de amostras pequeno, quando comparado ao índice de amostras coletadas na rotina do HEMORGS. Esse fato enfatiza a inadequação desse ensaio, uma vez que são coletadas aproximadamente 20 amostras diárias.

6 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo demonstrou uma prevalência de 1,47% de contaminação bacteriana em CPs oriundos do HEMORGS. O índice encontrado é elevado quando comparado a pesquisa realizada por Cunha et al. em Goiânia (Goiás), que descreveram 0,4% de contaminação de bactérias em plaquetas (CUNHA et al., 2008). A prevalência do nosso estudo foi maior também à dos estudos internacionais recentes, tais como Hsueh et al., que relataram 0,34%, Martínez, et al., 0,31% e Walther-Wenke et al., 0,3% (HSUEH et al., 2009; MARTÍNEZ, et al., 2010; WALTHER-WENKE et al., 2010).

Essas amostras de CPs positivas representam um grande risco para os receptores, visto que todas as amostras positivas neste estudo foram de plaquetas randômicas. Esse risco se deve ao fato que essas plaquetas sempre são transfundidas na forma de *pool* (em torno de 7 unidades), para obtenção da dose ideal para uma transfusão. Dessa maneira, o risco de receber uma bolsa de CPs com uma carga bacteriana mais elevada, é grande. Quanto maior a carga bacteriana, maiores são as chances de desencadear uma reação séptica transfusional.

Os microrganismos identificados neste estudo foram oriundos da flora normal da pele, identificados como *S. epidermidis*, resultado que concorda com outros estudos (HSUEH et al., 2009; WALTHER-WENKE et al., 2010). No entanto, não identificamos nenhuma contaminação por bactérias GN, contrapondo-se ao estudo brasileiro realizado por Cunha et al., que descreveram uma taxa de 62,5% (5/8) de contaminação de CPs por bactérias GN (CUNHA et al., 2008).

Através da hemovigilância passiva, com a análise dos prontuários, foi possível avaliar as reações sépticas transfusionais associadas aos receptores das bolsas de CPs consideradas positivas para o crescimento bacteriano. Sendo assim, apenas pudemos confirmá-la em um receptor, em que a bactéria presente na bolsa contaminada (*S. epidermidis*, *mecA* negativo e *icaD* positivo) foi a mesma isolada da hemocultura do paciente e identificada nas duas amostras (bolsa de CPs e sangue do receptor). Martínez et al., também identificaram uma reação transfusional séptica, ocorrida em um receptor de plaquetas, sendo identificado com SCoN (MARTÍNEZ, et al., 2010).

Sabe-se que *S. epidermidis* é um importante patógeno que está relacionado a endocardite bacteriana. Portanto, é importante que a identificação dessa bactéria nos CPs

contaminados deve ser considerada como um fator de risco para a endocardite (HSUEH et al., 2009). Enfatiza-se este caso devido a deficiência de defesas do sistema imunológico do paciente deste estudo, portador de leucemia mielóide aguda, imunocomprometido com maior suscetibilidade à apresentação de complicações clínicas relevantes.

No entanto, há algumas semelhanças entre a contaminação bacteriana de CPs com os problemas de infecções nos setores de hematologia-oncologia, ou seja, relacionada ao cateter, onde, em ambas as situações, a fonte mais comum da bactéria é a pele. A contaminação bacteriana dos produtos de sangue é principalmente devido às bactérias da pele ter acesso à unidade de coleta de sangue, ocorrendo também, migração de bactérias da pele no local da inserção do cateter cutâneo. Dessa maneira, em ambas as situações, bactérias da flora da pele, como *S. epidermidis* são os contaminantes predominantes; mas cada caso deve ser analisado de maneira criteriosa. Sendo assim, nos pacientes trombocitopênicos, em especial os das unidades de hematologia-oncologia, com neutropenia concomitante, a contaminação bacteriana dos produtos de sangue deve ser considerada como causa potencial de episódios febris. Além disso, é imprescindível a identificação e notificação das reações sépticas transfusionais (WALTHER-WENKE et al., 2010).

Todos os membros da equipe transfusional de cada centro hospitalar devem ser treinados periodicamente sobre os efeitos secundários relacionados a uma transfusão e acompanhar o paciente, por um período adequado, uma vez que a reação séptica pode ser aguda ou tardia (após as 24 h).

Já no que se refere a melhor metodologia para a detecção da contaminação bacteriana em CPs, parece ser importante a combinação de métodos de cultura, realizados no início do período de armazenamento e com o acompanhamento até a sua transfusão. O desenvolvimento de um método adequado para detectar bactérias em CPs para uso na rotina dos bancos de sangue continua um desafio. A associação de metodologias de cultura reduzirá os riscos de transfusões de CPs contaminados e irá minimizar as reações sépticas transfusionais. Bolsas de CPs com carga bacteriana elevada podem ser detectadas pela metodologia quantitativa. Constitui consenso que o número de UFC/mL tem grande influência para desencadear uma reação séptica. Assim também como o risco delas ocorrerem não pode ser totalmente afastado, e que, a equipe médica e paramédica deve ser capacitada a identificá-las.

7 CONCLUSÕES

- A investigação da contaminação bacteriana foi realizada em 691 CPs, 96,2% (665/691) de plaquetas randômicas e 3,8% (26/691) de plaquetaféreses;
- A prevalência bacteriana foi de 1,47% (9/612), determinada através da técnica de cultura qualitativa;
- Pela técnica de cultura quantitativa foi possível demonstrar que uma das amostras apresentou incontáveis UFC/mL (1/79) e a outra com 10^2 UFC/mL (1/292);
- *S. epidermidis* foi a bactéria identificada em todos os CPs contaminados e a provável fonte de contaminação bacteriana pode ter sido a pele;
- As diferentes metodologias testadas neste estudo foram: cultura qualitativa (612 amostras – 88,6%), cultura quantitativa (371 amostras – 53,7%), cultura qualitativa de crescimento diário (79 amostras – 11,4%) e marcadores metabólicos (79 amostras – 11,4%);
- O ensaio de marcadores metabólicos demonstrou-se inespecífico para a pesquisa de bactérias em CPs, contrapondo-se a outros estudos realizados;
- Foi possível comunicar ao HEMORGS a presença de contaminação bacteriana no decorrer da manipulação das 691 amostras. Duas amostras que demonstraram crescimento bacteriano pela metodologia quantitativa foram descartadas do processo de transfusão;
- A hemovigilância passiva dos receptores dos CPs considerados positivos pelo estudo prospectivo foi realizada. As reações transfusionais foram caracterizadas de acordo com a metodologia citada e dessa maneira nós pudemos relatar a ocorrência de uma reação séptica transfusional;
- Além disso, suspeitamos de outras três prováveis reações sépticas transfusionais associadas a infusão dos CPs contaminados que não foi possível a sua confirmação, devido a falta de dados nos prontuários e a dificuldade em associar as mesmas como reações sépticas transfusionais;
- Os demais receptores dos CPs contaminados com bactérias, detectados neste estudo prospectivo, não demonstraram sinais clínicos evidentes de uma reação séptica transfusional ou seu prontuário não estava preenchido adequadamente ou ainda

recebeu a bolsa de CPs e logo recebeu alta hospitalar. Fatos que dificultaram o monitoramento de todos os receptores dos CPs positivos;

- A dificuldade na execução da técnica do crescimento diário, com 8,86% de detecção de contaminação, inviabiliza essa metodologia na utilização rotineira pelo HEMORGS, aliado ao número de amostras coletadas;
- Concluimos que não existe uma metodologia ideal, mas sim uma associação, que poderia ser realizada entre a técnica já utilizada (cultura qualitativa) com a cultura quantitativa.
- Dessa maneira, esta associação seria viável e passível de utilização no HEMORGS. Além disso, os CPs com elevada carga bacteriana seriam, possivelmente, detectados pela metodologia quantitativa e descartados do setor de transfusão antes mesmo da sua infusão. Com isso, poderíamos reduzir as reações sépticas transfusionais;
- A técnica utilizada no Controle Microbiológico do HEMORGS, devido a sua complexidade, não pode ser utilizada para todas as amostras.

REFERÊNCIAS

AABB - American Association of Blood Banks. **Bacterial contamination of blood components**. Bulletin 96-6. Bethesda, MD, 1996.

_____. **Comprehensive report on blood collection and transfusion in the United States in 2001**. National Blood Data Resource Center, Bethesda, MD, 2003.

_____. **Guidance on implementation of new bacteria and reduction standard**. Bulletin 04-07. Bethesda, MD, 2004.

ABREU, J.; MOREIRA, R. M. Avaliação da qualidade em Concentrados de Plaquetas: Estudos de possíveis causas da lesão de armazenamento. **ABO. Revista de Medicina Transfusional**. n. 16, p. 6-11, 2003.

ANDREU, G. et al. Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. **Transfusion**. v. 42, n.10, p.1356-1364, 2002.

ÁSTER, R. H.; JANDL, P. H. Platelet sequestration in man. I. Methods. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 43, n. 5, p. 843-855, 1964.

AUBUCHON, J. P. et al. Experience with universal bacterial culturing to detect contamination of apheresis platelet units in a hospital transfusion service. **Transfusion**. v. 42, n. 7, p. 855-861, 2002.

AUBUCHON, J. P. Pathogen reduction technologies: what are the concerns? **Vox Sanguinis**. v. 87, n. 2, p. 984-989, 2004.

BERKOW, R. et al. **Manual merck de informação médica: saúde para família**. 2003, cap. 153, seção 14.

BLAJCHMAN, M. A. Bacterial contamination of blood products and the value of pretransfusion testing. **Immunological Investigations**. v. 24, n. 1-2, p. 163-170, 1995.

BLAJCHMAN, M. A. Incidence and significance of the bacterial contamination of blood components. **Developmental Biology**, v. 108, p. 59-67, 2002.

BLAJCHMAN, M. A. Bacterial contamination of cellular blood components: risks, sources and control. **Vox Sanguinis**. v. 87, n. 1, p. 98-103, 2004a.

BLAJCHMAN, M. A.; GOLDMAN, M. Bacterial contamination of platelet concentrates: incidence, significance, and prevention. **Seminars in Hematology**. v. 38, n. 4, p. 20-26, 2001.

BLAJCHMAN, M. A.; GOLDMAN, M.; BAEZA, F. Improving the bacteriological safety of platelet transfusions. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 18, n. 1, p. 11-24, 2004b.

BLOOD-BOOK, 2003. **The history of blood transfusion and blood transfusion medicine**. Blood transfusion history, in date order - links to blood transfusion information. Disponível em: <<http://www.bloodbook.com/trans-history.html>>. Acesso em: 10 out. 2011.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**. v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.

BORDEN, C.; HALL, W. H. Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. **The New England Journal of Medicine**. v. 245, n. 20, p. 760, 1951.

BRASIL. Lei nº 1075, de 27 de março de 1950. Dispõe sobre doação voluntária de sangue. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, 12 abr. 1950. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L1075.htm>. Acesso em: 10 out. 2011.

_____. Lei nº 4701, de 28 de junho de 1965. Dispõe sobre o exercício da atividade hemoterápica no Brasil e dá outras providências. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, 01 jul. 1965. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/leis/4701_65.htm>. Acesso em: 10 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Coordenação Nacional de DST e Aids. Preparação de hemocomponentes. Brasília, 1998. (Serie TELELAB).

_____. Hemovigilância: Manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2007. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/17386000474581698db3dd3fbc4c6735/manual_tecnico_hemovigilancia_08112007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 out. 2011.

_____. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, nº 241 – Seção 1, p. 119, 17 dez. 2010a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/anexo/anexo_res0057_16_12_2010.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011.

_____. Guia para o Uso de Hemocomponentes 2010. Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2010b. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_uso_hemocomponentes.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011.

_____. Portaria nº 1.353, de 13 de junho de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, 14 jun. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/anexo/anexo_prt1353_13_06_2011.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011.

BRECHER, M. E. et al. Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: an analysis with 15 contaminating organisms. **Transfusion**. v. 41, n. 4, p. 477-482, 2001.

BRECHER, M. E. et al. Evaluation of a new generation of culture bottle using an automated bacterial culture system for detecting nine common contaminating organisms found in platelet components. **Transfusion**. v. 42, n. 6, p.774-779, 2002.

BRECHER, M. E.; HAY, S. N. Bacterial contamination of blood components. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 1, p. 195-204, 2005.

BRECHER, M. E.; HAY, S. N.; ROTHENBERG, S. Validation of BacT/Alert plastic culture bottles for use in testing of whole-blood-derived leukoreduced platelet-rich-plasma-derived platelets. **Transfusion**. v. 44, n. 8, p. 1174-1178, 2004a.

BRECHER, M. E.; HAY, S. N.; ROTHENBERG, S. Evaluation of a new generation of plastic culture bottles with an automated microbial detection system for nine common contaminating organisms found in platelet components. **Transfusion**. v. 44, n. 3, p. 359-363, 2004b.

BURNS, K. H.; WERCH, J. B. Bacterial contamination of platelet units: a case report and literature survey with review of upcoming american association of blood banks requirements. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. v. 128, n. 3, p. 279-281, 2004.

BURSTAIN, J. M. et al. Rapid identification of bacterially contaminated platelets using reagent strips glucose and pH analysis as markers of bacterial metabolism. **Transfusion**. v. 37, n. 3, p. 255-258, 1997.

CARNEIRO, A. R.; LOPES, M. E. D. **Coletânea de Legislação em Hemoterapia e Hematologia**. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 1. ed. Rio de Janeiro, 2002.

CHAMONE, D. A. F. et al. **Manual de transfusão sanguínea**. São Paulo: Rocca, 2001. cap. 1, p. 1-08.

CHANEY, R.; RIDER, J.; PAMPHILON, D. Direct detection of bacteria in cellular blood products using bacterial ribosomal RNA-directed probes coupled to electrochemiluminescence. **Transfusion Medicine**, v. 9, n. 3, p. 177-188, 1999.

CLAWSON, C. C.; WHITE, J. G. Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors. **American Journal of Pathology**. v. 65, n. 2, p. 367-380, 1971.

CUNHA, G. S. **Prevalência da contaminação bacteriana em concentrados de plaquetas do serviço de hemoterapia de um hospital universitário em Goiânia-GO**. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

CUNHA, G. S.; LEAO, L.; PIMENTA, F. Bacterial contamination of random-donor platelets in a university hospital in the midwestern region of Brazil. **Transfusion**. v.48, n. 2, p. 282-285, 2008.

CUNNINGHAM, M.; CASH, J. D. Bacterial contamination of platelet concentrates stored at 20° C. **Journal of Clinical Pathology**. v. 26, n. 6, p. 401-404, 1973.

DE KORTE, D. et al. Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. **Vox Sanguinis**. v. 83, n. 1, p. 13-16, 2002.

DE KORTE, D. et al. Effects of skin disinfection method, eviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. **Transfusion**. v. 46, n. 3, p. 476-485, 2006.

DEPCIK-SMITH, N. D.; HAY, S. N.; BRECHER, M. E. Bacterial contamination of blood products: factors, options, and insights. **Journal of Clinical Apheresis**. v. 16, n. 4, p. 192-201, 2001.

DODD, R. Y. Bacterial contamination and transfusion safety: experience in the United States. **Transfusion Clinique et Biologique**. v. 10, n. 1, p. 6-9, 2003.

DZIK, W. H. Leukocyte counting during process control of leukoreduced blood components. **Vox Sanguinis**. v. 78, n. 2, p. 223-226, 2000.

ENGELFRIET, C. P. et al. Bacterial contamination of blood components. **Vox Sanguinis**, v. 78, n. 1, p. 59-67, 2000.

FDA. **Food and Drug Administration**. EUA, 2004. Disponível em: < <http://www.fda.org/>>. Acesso em: 10 out. 2011.

GARCIA-ERCE, J. A. et al. Bacterial contamination of blood components due to *Burkholderia cepacia* contamination from chlorhexidine bottles. **Vox Sanguinis**. v. 83, n. 1, p. 70-71, 2000.

GIBSON, T.; NORRIS, W. Skin fragments removed by injection needles. **The Lancet**. v. 2, n. 7054, p. 983-985, 1958.

GOLDMAN, M. et al. Evaluation of donor skin disinfection methods. **Transfusion**. v. 37:309-312, 1997.

GOLDMAN, M; BLAJCHMAN, M. Bacterial contamination: transfusion reactions. **Bethesda, AABB Press**, 2 nd, 2001, p. 129-150, 2001.

GOLDMAN, M; SHER, G; BLAJCHMAN, M. Bacterial contamination of cellular blood products: the Canadian perspective. **Transfusion Science**. v. 23, p. 17-19, 2000.

GOLDMAN, M. Bacterial contamination of platelet concentrates: where are we today? **Vox Sanguinis**. v. 87, n. 2, p. 90-92, 2004.

GOMES, E. F. P.; ALBIERO, A. L. Transfusão de plaquetas. **Manual de transfusão sanguínea**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001, cap. 5, p. 53-65.

GUERIN, G. D.; BURTET, L. P. Avaliação de concentrados plaquetários produzidos pelo serviço de Hemoterapia do Hospital Santo Ângelo: implantação de um sistema de controle de qualidade. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 38, n. 4, p. 287-292, 2006.

GUERRA, C. C. C. 50 anos da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 22, n. 2, p. 6, 2000.

HALL J, LAJOIE C, COLPAS G. The use of platelet PGD test for determination of bacterial contamination of cell therapy culture systems. **AABB**, 2004 (Abst).

HARMENING-PITTLIO, D.; HARRISON, C. R.; WRIGHT, N. E. **Preservação do sangue: Aspectos históricos, revisão do metabolismo e perspectivas**. In: Modern Blood Banking and Transfusion Practices. HARMENING, D.; CALHOUN, L.; POLESKY, H. F. (eds). 2nd ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, 1992. p.1-24.

HAY, S. N.; BRECHER, M. E. Validation of pH and glucose determination for bacteria detection screening in platelet concentrates stored in the Terumo Teruflux XT612 platelet container. **Transfusion**. v. 44, n. 9, p.1395, 2004.

HELTBERG, O. et al. Nosocomial epidemic of *Serratia marcescens* septicaemia ascribed to contaminated blood transfusion bags. **Transfusion**. v. 33, n. 3, p. 221-227, 1993.

HILLYER, C. D, et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation. **Hematology**. p. 575-589, 2003.

HÖGMAN, C. F.; FRITS, H.; SANDBERG, L. Posttransfusion *Serratia marcescens* septicaemia. **Transfusion**. v. 33, n. 3, p. 189-191, 1993.

HSUEH, J. C. et al. Blood surveillance and detection on platelet bacterial contamination associated with septic events. **Transfusion Medicine**. v. 19, n. 6, p. 350-356, 2009.

JAFARI, M. et al. *Salmonella* sepsis caused by a platelet transfusion from a donor with a pet snake. **The New England Journal of Medicine**. v. 347, n. 14, p. 1075-1078, 2002.

JUNQUEIRA, P. C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. História da hemoterapia no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 27, n. 3, p. 201-207, 2005.

KAUFMAN, R. M. Platelets: testing, dosing and the storage lesion--recent advances. **American Society of Hematology**. p. 492-496, 2006.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. Tradução de Eiler Fritsch Toros. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KUEHNERT, M. J. et al. Transfusion-transmitted bacterial infections in the United States, 1998 through 2000. **Transfusion**. v. 41, n. 12, p. 1493-1499, 2001.

LEE, C. K. et al. Impact of donor arm skin disinfection on the bacterial contamination rate of platelet concentrates. **Vox Sanguinis**. v. 83, n. 3, p. 204-208, 2002.

MARCONDES, J. V. **Transfusão de Sangue**. Tese apresentada à Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro, p. 73-77, 1879.

MARTÍNEZ, F.; TARRAND, J.; LICHTIGER, B. Impact on Patient Outcome Following Transfusion of Bacterially Contaminated Platelets. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 134, n. 2, p. 207-212, 2010.

MARTINI, R. et al. Contaminação bacteriana em concentrados plaquetários: identificação, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e sepse associada à transfusão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 6, p. 682-685, 2010.

MCDONALD, C. P. et al. Fatal *Clostridium perfringens* sepsis from a pooled platelet transfusion. **Transfusion Medicine**. v. 8, n. 1, p. 19-22, 1998.

MCDONALD, C. P. et al. Evaluation of the BacT/Alert automated blood culture system for detecting bacteria and measuring their growth kinetics in leucodepleted and non-leucodepleted platelet concentrates. **Vox Sanguinis**. v. 81, n. 3, p. 154-160, 2001.

MCDONALD, C. P. et al. Evaluation of the 3D BacT/Alert automated culture system for the detection of microbial contamination of platelet concentrates. **Transfusion Medicine**. v.12, n. 5, p. 303-309, 2002.

MCDONALD, C. P. et al. Relative values of the intervention of diversion and improvement of donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. **Vox Sanguinis**. v. 86, n. 3, p. 178-182, 2004.

MERTENS, G.; MUYLLE, L. False-positive and false-negative results of sterility testing of stored platelet concentrates. **Transfusion**. v. 39, n. 5, p. 539-540, 1999.

MITCHELL, K. M.; BRECHER, M. E. Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 13, n. 2, p. 132-144, 1999.

MOHAMMADI, T. **Bacterial Contamination of Platelet Concentrates: Molecular Tools and Applications**. 2006. 140f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Livre de Amsterdã, Amsterdã, Holanda, 2006.

MOHAMMADI, T. et al. Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 10, p. 4796-4798, 2003.

MOHR, H. et al. Basics of flow cytometry-based sterility testing of platelet concentrates. **Transfusion**. v. 46, n. 1, p. 41-49, 2006.

MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. Oxford: Blackwell Scientific Publications (New York). 9th ed. 1993.

NIU, M. T. et al. Transfusion-transmitted *Klebsiella pneumoniae* fatalities, 1995 to 2004. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 20, n. 2, p. 149-157, 2006.

NOVAK, M. Preservation of stored blood with sulfanilamide. **Journal of the American Medical Association**. v. 113, n. 25, p. 2227-2229, 1939.

ORTOLANO, G. A. et al. Detection of bacteria in WBC-reduced platelet concentrates using percent oxygen as a marker for bacteria growth. **Transfusion**. v 43, n. 9, p. 1276-1285, 2003.

PIETERSZ, R. N. I. et al. Detection of bacterial contamination of platelet concentrates. **Vox Sanguinis**. v. 93, n. 3, p. 260-277, 2007.

PUNSALANG, A.; HEAL, J. M.; MURPHY, P. J. Growth of Gram positive and Gram negative bacteria in platelet concentrates. **Transfusion**. v. 29, n. , p. 596-599, 1989.

RHAME, F. S. et al. *Salmonella* septicemia from platelet transfusions. Study of an outbreak traced to a hematogenous carrier of *Salmonella choleraesuis*. **Annals of Internal Medicine**. v. 78, p. 633-641, 1973.

RIBEIRO, A. A. F.; KUTNER, J. M. Prevenindo a contaminação bacteriana de componentes sangüíneos. **Revista Einstein**. v. 1, p. 126-128, 2003.

RIDER, J.; NEWTON, A. Electrochemiluminescent detection of bacteria in blood components. **Transfusion Medicine**. v. 12, n. 2, p. 115-129, 2002.

ROCK, G, et al. The use of a bacteria detection system to evaluate bacterial contamination in platelet concentrates. **Transfusion**. v. 44, n. 3, p. 337-342, 2004.

ROOD, I. **Detection and origin of bacteria in platelet concentrates**. 2011. 133f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Livre de Amsterdã, Amsterdã, Holanda, 2011.

SANTOS, M. Q. et al. Avaliação do processo anti-séptico em sitio de punção venosa de doadores de sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 4, p. 293-295, 2008.

SCHMIDT, M. et al. Optimized Scansystem platelet kit for bacterial detection with enhanced sensitivity: detection within 24 h after spiking. **Vox Sanguinis**. v. 89, n. 3, p. 135-139, 2005.

SCHMIDT, M. et al. A comparison of three rapid bacterial detection methods under simulated real-life conditions. **Transfusion**. v. 46, n. 8, p. 1367-1373, 2006a.

SCHMIDT, M. et al. FACS technology used in a new rapid bacterial detection method. **Transfusion Medicine**. v. 16, n. 5, p. 355-361, 2006b.

SEAVER, M. et al. First results using automated epifluorescence microscopy to detect *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* in WBC-reduced platelet concentrates. **Transfusion**. v. 41, n. 11, p. 1351-1355, 2001.

SEN, K. Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5_u nuclease PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v 38, n. 5, p. 1953-1958, 2000.

SHERIDAN, G. E. C. et al. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 4, p. 1313–1318, 1998.

SEGHATCHIAN, J. Bacterial contamination of blood components. **Transfusion Apheresis Science**. v. 25, n. 2, n. 2, p. 147-150, 2001.

SHEPPARD, C. A.; JOSEPHSON, C. D.; HILLYER, C. D. Bacterial contamination of platelets for transfusion: recent advances and issues. **Laboratory Medicine**, v. 36, n. 12, p. 767-772, 2005.

SHOT. Serious hazards of transfusion, **SHOT Annual Report 2002**. Disponível em: <<http://www.shotuk.org>>. Acesso em: 10 out. 2011.

STAINSBY, D. et al. Serious hazards of transfusion. (SHOT). **SHOT Annual Report**. p.1-88, 2003.

STORMER, M.; KLEESIEK, K.; DREIER, J. High-volume extraction of nucleic acids by magnetic bead technology for ultrasensitive detection of bacteria in blood components. **Clinical Chemistry**. v. 53, n.1, p. 104-110, 2007.

STRUMIA, M. M.; MCGRAW, J. J. Frozen and dried plasma for civil and military use. **The Journal of the American Medical Association**. v. 116, n. 21, p. 2378-2382, 1941.

SVAOOR, A. et al. The Intercept blood system for platelets inactivates anaerobic bacteria. **AABB**, 2002 (Abst).

TARRAND, J.; SAZAMA, K. J.; LICHTIGER, B. Reagent Strips May Not Detect *Staphylococcus epidermidis* Contamination of Platelet Concentrates. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. v. 128, n. 8, p. 852-853, 2004.

THORPE, T. C, et al. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 28, n. 7, p. 1608-1612, 1990.

TIPPLE, M. A. et al. Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. **Transfusion**. v. 30, n. 3, p. 207-213, 1990.

TYNELL, E. **Prevention of transfusion transmitted infections. Donor screening and characteristics of recipient populations.** 2005. 52 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Karolinska, Stockholm, Suécia, 2005.

UHC - University Health System Consortium. **UHC technology assessment.** Platelet transfusion guidelines, 1998. Disponível em: <http://www.uhc.org>>. Acesso em: 20 out. 2011.

VAN DER MEER, P. F. et al. Automated separation of whole blood in top and bottom bags into components using the compomat G4. **Vox Sanguinis.** v. 76, n. 2, p. 90-99, 1999.

VASCONCELOS, E.; FIGUEIREDO, A. C.; SEGATCHIAN, J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. **Transfusion Apheresis Science.** v. 29, n. 1, p. 13-16, 2003.

VASSALLO, R. R.; MURPHY, S. A critical comparison of platelet preparation methods. **Current Opinion in Hematology,** v. 13, n. 5, p. 323-330, 2006.

WAGNER, S. J.; FRIEDMAN, L. I.; DODD, R. Y. Transfusion-Associated Bacterial Sepsis. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 7, n. 7, p. 290-302, 1994.

WAGNER, S. Transfusion related bacterial sepsis. **Current Opinion in Hematology.** v. 4, n. 6, p. 464-469, 1997.

WALTHER-WENKE, G. et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical followup. **Annals of Hematology.** v. 89, n. 1, p. 83-91, 2010.

WERCH, J. B. et al. Detecting bacteria in platelet concentrates by use of reagent strips. **Transfusion.** v. 42, n. 8, p. 1027-1031, 2002.

WONG, P. Y, et al. Validation and assessment of a blood-donor arm disinfectant containing chlorhexidine and alcohol. **Transfusion.** v. 44, n. 8, p. 1238-1242, 2004.

YOMTOVIAN, R. Bacterial contamination of blood: lessons from de past and road map for the future. **Transfusion.** v. 44, n. 3, p. 450-460, 2004.

YOMTOVIAN, R. A. et al. Evolution of surveillance methods for detection of bacterial contamination of platelets in a university hospital, 1991 through 2004. **Transfusion.** v. 46, n. 5, p.719-730, 2006.

ZBIGNIEW, R. et al. A novel technique for preparing improved buffy coat platelet concentrates. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 21, n. 1, p. 25-33, 1995.

ANEXOS

ANEXO A – RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC - NÚMERO Nº 57 DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010. Determina o Regulamento Sanitário para Serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais.

[...]

Seção V

Controle de Qualidade dos Hemocomponentes

Art. 64. Todo serviço de hemoterapia que produza hemocomponentes deve realizar controle de qualidade sistemático de todos os tipos de hemocomponentes produzidos, em laboratório específico de controle de qualidade.

Parágrafo único. Os serviços de hemoterapia que terceirizem o controle de qualidade de hemocomponentes devem assegurar que os serviços terceirizados sejam regularizados junto ao órgão de vigilância sanitária competente e os procedimentos sejam realizados conforme a legislação vigente.

Art. 65. Os protocolos do controle de qualidade devem conter o tipo de controle a ser realizado em cada hemocomponente, a amostragem e os parâmetros mínimos exigidos neste Regulamento, sem prejuízo do disposto pelo Ministério da Saúde.

Parágrafo único. O método utilizado para a realização do controle de qualidade não deve comprometer a integridade do produto, a menos que este seja desprezado após ser utilizado como controle de qualidade.

Art. 66. O controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção ou 10 (dez) unidades / mês (o que for maior).

Parágrafo único. Na avaliação de contaminação microbiológica todos os casos positivos devem ser devidamente investigados, adotadas as medidas corretivas e preventivas, mantendo-se os respectivos registros.

[...]

ANEXO B - PORTARIA MS Nº 1.353, DE 13 DE JUNHO DE 2011 - DOU 1 DE 14 DE JUNHO DE 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos.

[...]

Seção V
Do Controle de Qualidade dos Hemocomponentes

Art. 61. Os serviços de hemoterapia deverão realizar o controle de qualidade sistemático de todos os tipos de hemocomponentes que produzirem.

Parágrafo único. Devem ser observados critérios técnicos e científicos relativos à amostragem para o controle de qualidade, como:

I - o controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção ou 10 unidades por mês (o que for maior);

[...]

ANEXO C – Registro no Comitê de Ética em Pesquisa

 <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p> 
--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Proposta de metodologia para controle bacteriológico das amostras de concentrados plaquetários obtidas pelo HEMORGS de Santa Maria - RS

Número do processo: 23081.015516/2009-48

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0285.0.243.000-09

Pesquisador Responsável: Rosmari Horner

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/2011 - Relatório parcial

Janeiro/2012 - Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 22/12/2009

Santa Maria, 23 de Dezembro de 2009.


Elisete Medianeira Tomazetti
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-UFSM
Registro CONEP N. 243.

ANEXO D – Resumos Publicados em Congressos

- MARTINI R, KUHN FT, RIGATTI F, KEMPFER CB, RODRIGUES MA, HORNER R. Paciente do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) com leucemia mielóide aguda (LMA) apresenta estado febril após infusão de concentrado plaquetário (CP) contaminado. In: V Congresso Brasileiro de Farmacêuticos em Oncologia, 16 a 18 de abril de 2010. Espaço Estação Embratel, Curitiba, Paraná, 2010.

- HORNER R, MAYER LE, MARTINI R, KEMPFER CB, TIZOTTI MK, RODRIGUES MA, SOUSA LU, SANTOS SO, UTTO T, MIELKE TP. Análise bacteriológica em concentrados plaquetários obtidos pelo HEMORGS de Santa Maria. In: II Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 29 de setembro a 02 de outubro de 2010. Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

- KUHN FT, HORNER R, RODRIGUES MA, SOUSA LU, MIELKE TP, VEIT AR, KRONBAUER M. Investigação do crescimento de bactérias em amostras de plaquetas semeadas em caldo Mueller Hinton. In: II Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 3 a 5 de novembro de 2010. Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, 2010.

- SOUSA LU, HORNER R, MARTINI R, RODRIGUES MA, SOARES AOE, GINDRI L, JUNG CH, RIGATTI F, KEMPFER CB, MAYER LE, TIZOTTI MK, SANTOS SO, KUHN FT, MIELKE TP, KRONBAUER M. Avaliação de parâmetros metabólicos na detecção de contaminação bacteriana em concentrados plaquetários. In: II Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 3 a 5 de novembro de 2010. Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, 2010.

- MARTINI R, RODRIGUES MA, KEMPFER CB, SOARES AOE, TIZOTTI MK, MAYER LE, HORNER R. Prevalência da contaminação bacteriana em plaquetas randômicas e em plaquetaféreses no Hemocentro do Estado do Rio Grande do Sul. In: I Congresso Internacional de Ciências pela Vida - Humanização e Inovação, 9 a 12 de novembro de 2010. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

- SANTOS SO; MARTINI R; KEMPFER CB; RODRIGUES MA; TIZOTTI MK; HÖRNER R. Avaliação da contaminação bacteriana em bolsas de plaquetas e de hemácias provenientes do HEMORGS. In: 25º Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 9 a 12 de novembro de 2010. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

- MARTINI R, RODRIGUES MA, GINDRI L, KEMPFER CB, KUHN FT, JUNG CH, TIZOTTI MK, VEIT AR, SANTOS SO, HORNER R. *Staphylococcus epidermidis* em plaquetas: relato de casos. In: XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos - FARMAPOLIS, 12 a 14 de novembro de 2010. Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

- MARTINI R, RODRIGUES MA, JUNG CH, KUHN FT, TIZOTTI MK, KEMPFER CB, SANTOS SO, MAYER LE, MIELKE TP, HORNER R. Comparação do índice de contaminação e das bactérias isoladas de plaquetas entre bancos de sangue nacionais e internacionais. In: XIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos - FARMAPOLIS, 12 a 14 de novembro de 2010. Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A – Técnica da Microdiluição em Caldo – Vancomicina

Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M7-A6- NCCLS/CLSI 2003 para o antimicrobiano vancomicina. Para esta técnica empregaram-se placas de 96 poços onde foram distribuídos 100 µL de caldo Mueller Hinton (Himedia®) em cada poço e 20µL do antimicrobiano foi dispensado no primeiro poço, onde se obteve a concentração de 512µL/mL. Nos poços subsequentes realizaram-se diluições para a obtenção das seguintes concentrações: 256µL, 128µL, 64µL, 32µL, 16µL, 8µL, 4µL, 2µL, 1µL e 0,5µL/mL.

O inóculo bacteriano correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland foi lido em espectrofotômetro a 625 nanômetros, obtendo-se uma absorbância entre 0,08 e 0,1. Após o ajuste do inóculo, 100µL do mesmo foram dispensados em cada poço.

Após o período de incubação de 24 horas a 35 2 °C, dispensou-se em cada poço 15µL do corante 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT) 1% para facilitar a leitura visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Este corante é incolor e quando reduzido torna-se vermelho pela formação do trifenilformazam indicando que há crescimento bacteriano, a ausência de crescimento bacteriano caracteriza a CIM. O teste foi realizado em triplicata.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Caldo MH (µL)	180	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antimicrobiano 1024µL/mL (µL)	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diluição anterior (µL)	Retira 100 para o 2º	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 retira 100
Inóculo (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Volume final (µL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Concentração final (µg/mL)	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

Quadro 1 - Representação da técnica de microdiluição em caldo utilizada para a determinação da CIM do antimicrobiano vancomicina.