

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

**Análise microbiológica de Concentrados de Hemácias Lavadas e do
ambiente da Câmara de Fluxo Laminar**

RISEMBERG SOARES PEREIRA

Fortaleza-2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ

**Análise microbiológica de Concentrados de Hemácias Lavadas e do
ambiente da Câmara de Fluxo Laminar**

RISEMBERG SOARES PEREIRA

Monografia apresentada ao XVI Curso de
Hematologia e Hemoterapia da Universidade
Federal do Ceará, com' requisito final, para a
obtenção do ~~título~~ de especialista.

Orientadora:

Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira

Co-orientador:

Marcos Antônio Martins da Silva

Fortaleza-2002

A Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, a luz do meu caminho.
- Aos meus Pais, **Josiel e Magnólia**, pelo apoio e dedicação
- A **Dra. Nadia Accioly Pinto Nogueira**, Prof^ª. Adjunta de microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem/UFC, pelo auxílio e orientação na realização deste trabalho.
- Ao **Dr. Marcos Antônio Martins da Silva**, responsável pelo Laboratório de Controle de Qualidade do Hemoce-Fortaleza, pelo empenho e dedicação.
- Aos **funcionários** do Setor de Fracionamento do Hemoce-Fortaleza, cujo trabalho foi fundamental em nosso estudo.
- Ao **Dr. Gentil Claudino de Galiza Neto**, pela atenção.
- Aos **professores**, por compartilharem seus conhecimentos.
- A **Coordenação do Curso**, pela dedicação.

*A mente que se abre
A uma nova idéia
Jamais voltará ao
Seu tamanho natural...*

Albert Einstein.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------|----|
| LISTA DE TABELAS | 6 |
| LISTA DE FIGURAS | 7 |
| RESUMO | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 19 |
| 4. RESULTADOS | 23 |
| 5. DISCUSSÃO | 28 |
| 6. CONCLUSÃO | 33 |
| 7. SUMMARY | 35 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 37 |

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Qualidade microbiológica dos Concentrados de Hemácias lavadas e do ambiente da Câmara de Fluxo Laminar. **24**
- TABELA 2.** Frequência de culturas positivas para crescimento bacteriano de acordo com o componente sanguíneo. **29**

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Lavagem manual de hemácias **19**
- FIGURA 2.** Segmento do macarrão usado como contra-prova **19**
- FIGURA 3.** Câmara de Fluxo Laminar TROX-FLV **20**
- FIGURA 4.** Frequência de microrganismos no ambiente da Câmara de Fluxo Laminar **25**
- FIGURA 5.** Agar Sabouraud mostrando crescimento fúngico após 7 dias à temperatura ambiente. **26**
- FIGURA 6.** Número de Concentrados de Hemácias lavados no Setor de Fracionamento do Hemoce-Fortaleza no ano de 2001. **31**

RESUMO

RESUMO

Apesar dos grandes avanços da hemoterapia a transfusão de produtos sanguíneos ainda é cercada de grandes riscos. O concentrado de Hemácias Lavadas (CHL), por ser preparado em sistema aberto, está sujeito a ser contaminado por microrganismos do ambiente, por isso o processo de lavagem deve ser realizado em Câmara de Fluxo Laminar (CFL), a qual deve prover um ambiente estéril para execução desse procedimento. Em vista disso, este estudo propôs-se a avaliar a qualidade microbiológica dos CHL produzidos no Hemoce-Fortaleza e do ambiente da CFL onde é realizado o processo. Para este fim, foram analisados 33 Concentrados de Hemácias, antes e após sua lavagem, no período de 18/01/2001 a 01/03/2002, em aparelho Bact-Alert[®] (Organon teknika) e o ambiente interno da CFL através de meios de cultura (Agar Palte-Count e Agar Dextrose-Sabouraud 4%) colocados na área de trabalho durante o procedimento. Os CHL não mostraram contaminação, porém do ambiente da CFL foram isolados vários microrganismos. Dos 7 experimentos realizados, em 3 (43%) foram isoladas bactérias, em 4 (57%) bolores, em 4 (57%) leveduras e em 1 (14%) houve presença de colônias mistas (bactérias e fungos), sugerindo que, apesar do método de lavagem ter-se mostrado seguro, há um risco potencial aumentado relacionado à contaminação microbiana do ambiente da CFL.

1. INTRODUÇÃO

Os benefícios terapêuticos do sangue são reconhecidos há séculos. O primeiro registro real de uma transfusão de sangue na história ocorreu em 1492. Foi uma experiência mal sucedida na qual o Papa Inocêncio VII recebeu sangue de três jovens e que levou todos à morte.¹⁵ Até a descrição da circulação do sangue por William Harvey em 1613, o conceito da transfusão sanguínea não tinha nenhum fundamento científico. Nos anos que se seguiram muitas tentativas transfusionais foram feitas, inclusive com a utilização de sangue animal. Essa época foi marcada pelo grande insucesso da terapêutica transfusional.⁷

No início do século XX, Karl Landsteiner descobriu e classificou o primeiro sistema de grupo sanguíneo (o sistema ABO) e explicou as graves reações que ocorriam como resultado de transfusões incompatíveis, iniciando, assim, a era moderna da transfusão sanguínea.^{7, 15}

A primeira transfusão de hemácias lavadas foi feita por Hédon em 1902, em coelhos e cães, para provar que o sangue desfibrinado não era tão perigoso, conforme se acreditava na época.²¹

O Concentrado de Hemácias Lavadas (CHL) é definido pelo *Council of Europe Publishing* (1999) como sendo “um componente obtido pela centrifugação do sangue total e remoção do plasma, com subsequente lavagem das hemácias em uma solução isotônica”.

O processo de lavagem, dependendo do protocolo utilizado, consegue remover cerca de 99% das proteínas plasmáticas, eletrólitos e anticorpos e a maioria dos leucócitos presentes na bolsa de sangue, havendo uma perda de até 20% do total das hemácias durante o procedimento.^{1, 26}

A lavagem de hemácias foi utilizada por muito tempo com a finalidade de remover leucócitos, porém há pouco mais de 15 anos surgiram filtros especiais

para essa finalidade. Enquanto os filtros mais modernos conseguem retirar de 99,99% a 99,999% dos leucócitos presentes em uma bolsa de sangue, o processo de lavagem retira cerca de 90% dos leucócitos contidos no hemocomponente, restando aproximadamente 2 a 3 x 10⁸ leucócitos por bolsa ao final do procedimento. Este nível de leucorredução é suficiente para prevenir as reações febris não hemolíticas conseqüentes à presença de anticorpos pré-formados dirigidos contra o sistema HLA (Antígeno Leucocitário Humano) e também devidas as citocinas liberadas pelos leucócitos durante a estocagem, porém não é capaz de evitar a formação desses anticorpos (aloimunização) em pacientes que ainda não os possuam.^{1, 2, 6} Assim, a lavagem de hemácias não é mais recomendada para o propósito de leucorredução, pois existem meios mais eficientes para este fim.²

Atualmente o CHL é de utilização bem restrita e está indicado somente para pacientes que necessitam de transfusão, mas possuem anticorpos contra proteínas plasmáticas, especialmente anti-IgA, ou mostraram reações alérgicas severas com a transfusão de produtos sanguíneos.¹¹ Também é citada em algumas publicações a indicação para pacientes com Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN),^{21, 26} devido ao fato de que, nesses pacientes, as hemácias são muito susceptíveis à lise pelo complemento e são destruídas *in vitro* pela interação de antígenos leucocitários e anticorpos,^{21, 35} mas este uso tem sido questionado.^{6, 10, 26} Em um estudo de revisão realizado de 1950 a 1987 foram analisados 23 pacientes com HPN, transfundidos com vários produtos derivados do sangue (sangue total, concentrado de hemácias, concentrado de hemácias pobre em leucócitos, hemácias lavadas, hemácias congeladas e hemácias recuperadas em procedimentos intra-operatórios). Nenhuma reação hemolítica pós-transfusional relacionada à HPN foi verificada, concluindo-se que a lavagem de hemácias é desnecessária para esses pacientes.⁶

Apesar dos grandes avanços da hemoterapia, a transfusão de hemocomponentes (concentrado de hemácias, “pool” de plaquetas, plaquetas de doador único, plasma fresco congelado e crioprecipitado) ainda é cercada de grandes riscos. Uma das maiores complicações imediatas da transfusão de componentes sanguíneos é o risco de contaminação bacteriana,^{2, 23, 30, 33} sendo que a sepse bacteriana está associada com uma alta mortalidade devida ao choque séptico causado pela liberação de endotoxinas por bactérias gram negativas, com 18 mortes relatadas pelo sistema de hemovigilância francês em um período de 5 anos.^{13, 23} Porém muitos casos de infecção (freqüentemente causados por bactérias gram positivas) são provavelmente mal diagnosticados ou não são notados, o que resulta na subestimação da extensão exata do problema.^{13, 22} A transfusão de plaquetas, quando comparada à transfusão de hemácias, geralmente está associada a um maior risco de infecção. Foi constatado que a taxa de bacteremia transmitida por transfusão (em eventos/milhão de unidades) é cerca de 9,98 para plaquetas de doador único, 10,64 para “pool” de plaquetas e de apenas 0,21 para concentrado de hemácias; para reações fatais as taxas foram de 1,94, 2,22 e 0,13, respectivamente.¹⁹ De 51.278 transfusões realizadas pelo *Dana-Farber Cancer Institute* em um período de cinco anos, 2.208 (4,3%) mostraram reações transfusionais, sendo que 7 (0,32%) destas tiveram como causa a transfusão de hemácias e/ou outros hemocomponentes (plaquetas de doador único, “pool” de plaquetas e plasma fresco congelado) contaminados por bactérias.³ Um dado importante que deve ser notado, é que atualmente o risco de infecção pós-transfusional por contaminação bacteriana possivelmente exceda àquele por agentes virais.¹⁹

A lavagem de hemácias, por ser realizada em sistema aberto e envolver a adição de outras substâncias dentro da bolsa de sangue (soro fisiológico 0,9%), possui um risco de contaminação aumentado que é inerente ao procedimento. Como as hemácias são lavadas três vezes, o equipo do frasco de soro fisiológico

também deve ser conectado três vezes à bolsa de hemácias. No momento dessa conexão o sistema é exposto a um possível contaminante do ambiente. Por isso, caso não se disponha de uma lavadora de células, a introdução e a retirada do líquido de lavagem das bolsas deve ser feita em fluxo laminar.²

Qualquer que seja a técnica adotada, as hemácias lavadas e estocadas entre 2 e 6 °C devem ser utilizadas no prazo máximo de 24 horas, porque além da preparação envolver abertura do sistema estéril, também há a retirada da solução anticoagulante-preservativa, comprometendo o tempo de preservação, a função e viabilidade das células.^{1, 2, 11} Se a estocagem for à temperatura ambiente (20 a 24 °C) o CHL deve ser utilizado no máximo em 4 horas.¹

O controle de qualidade, que deve ser realizado em todos os CHL, consiste de cultura para bactérias e fungos, dosagem de proteínas, inspeção visual e/ou dosagem de hemoglobina livre no sobrenadante para detectar a presença de hemólise, e dosagem de hemoglobina.²

A Câmara de Fluxo Laminar (CFL) é uma área especial de trabalho que proporciona a manipulação segura de materiais infecciosos, protegendo tanto o ambiente do laboratório como o operador e material manipulado.^{1, 7, 18} Essa área de trabalho é continuamente varrida por um fluxo de ar estéril, que passa verticalmente sobre o produto manipulado numa velocidade controlada.¹⁶

A CFL deve ser instalada em áreas livres de correntes de ar e funcionar durante 15 minutos antes de ser utilizada. Deve-se evitar a presença de objetos desnecessários na área de trabalho e fazer a limpeza da lâmpada germicida e da câmara antes e após sua utilização. Além disso devem ser realizados, periodicamente, controle microbiológico (mensal) e contagem de partículas (trimestral) no ambiente do fluxo.^{7, 11} O controle microbiológico consiste em expor placas de Petri, contendo meios de cultura (placas-controle), ao ar circulante da CFL durante 10 a 15 minutos. Depois da incubação não deve aparecer mais que uma colônia ocasional nas placas.¹⁶

Os problemas que podem levar a uma contaminação significativa das placas-controle são:

- Dano ou montagem incorreta dos filtros da CFL;
- Limpeza inadequada da área de trabalho;
- Não criação de uma circulação de ar estéril antes do início da operação;
- Condições inadequadas da sala onde a CFL esteja instalada, como as ocasionadas por fortes correntes de ar ou por más condições de limpeza.¹⁶

Quando se trabalha em CFL é importante não se utilizar os 15 centímetros próximos ao operador, porque nesse local são geradas turbulências no fluxo de ar pelo choque do ar filtrado com o ar do ambiente externo.⁷ Essas turbulências também são geradas por movimentos rápidos dentro e fora da câmara. O rompimento do fluxo laminar aumenta o número de partículas e microrganismos no interior da câmara. Portanto é fundamental que o operador conheça bem o funcionamento da CFL.^{1,7}

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o risco de contaminação de Concentrado de Hemácias durante sua lavagem em Câmara de Fluxo Laminar.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a qualidade microbiológica de Concentrados de Hemácias Lavadas (“papa de hemácias”) produzidos no Setor de fracionamento do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce-Fortaleza).
2. Avaliar a qualidade microbiológica do ambiente da Câmara de Fluxo Laminar utilizada para preparação de “papa de hemácias” em sistema aberto.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

No período de 18/01/2002 a 01/03/2002 foram lavados, no setor de fracionamento do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, 33 (trinta e três) concentrados de hemácias com a finalidade de avaliar sua qualidade microbiológica (esterilidade) (**FIGURA 1**).

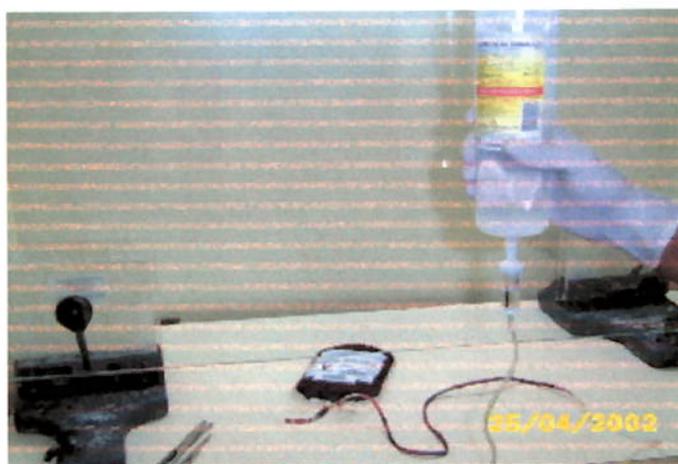


FIGURA 1. Lavagem manual de hemácias.

Antes da violação do sistema da bolsa de hemácias, foi transferida uma alíquota de 10 ml para uma bolsa de transferência utilizando-se uma conectora estéril de bolsas (Compodock, NPDI), com a finalidade de descartar contaminação prévia. Também foi retirado um segmento do “macarrão” da bolsa (**FIGURA 2**) para, caso necessário, seu conteúdo ser utilizado como contra-prova. Esses procedimentos foram repetidos após o término do processo de lavagem.

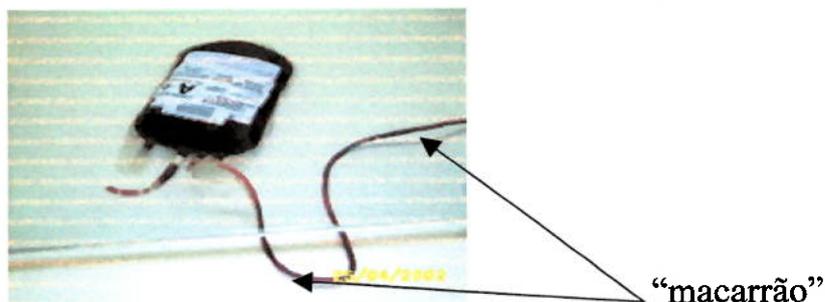


FIGURA 2. Segmento do macarrão usado como contra-prova.

De cada alíquota de 10 ml, retirou-se uma amostra de 3,5 ml que foi imediatamente injetada em um frasco de cultivo Bact/ALERT® PF. Esta amostra foi enviada ao setor de microbiologia do laboratório Emílio Ribas e analisada em aparelho Bact/ALERT® (Organon teknika), para detecção de bactérias e fungos.

Foram consideradas positivas para crescimento microbiológico (contaminação relacionada ao processo de lavagem) as bolsas que apresentaram negatividade da amostra retirada antes da lavagem e positividade da amostra retirada depois da lavagem, sendo esta confirmada pela contra-prova da amostra contida no macarrão.

A lavagem dos concentrados de hemácias foi realizada em câmara de fluxo laminar (TROX do Brasil, Modelo FLV, série 417) (FIGURA 3).



FIGURA 3. Câmara de fluxo laminar TROX-FLV.

Antes do início do processo de lavagem das hemácias, a câmara de fluxo laminar foi limpa com álcool a 70% e sua lâmpada germicida ligada por 15 (quinze) minutos.

Durante cada procedimento de lavagem foram colocadas no interior da câmara duas placas, uma contendo Agar Plate-Count (OXOIDE[®]) e uma contendo Agar Sabouround (DIFCO[®]). Terminado o processo de lavagem, a placa com Agar Plate-Count (usada para crescimento de bactérias) foi deixada em estufa por 48 horas a 37°C juntamente com uma placa não utilizada (controle negativo) e a placa com Agar Dextrose-Sabouraud 4% (usada para crescimento de fungos) foi mantida à temperatura ambiente (~30°C) por 7 (sete) dias, também com seu respectivo controle negativo.

Também foram colocados meios de cultura no interior da câmara, sem que esta estivesse sendo utilizada, durante uma hora por dia em três dias consecutivos.

Os meios de cultura foram preparados e analisados no Setor de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os meios, depois de preparados, foram vedados com fita adesiva, deixados em estufa por 24 horas para atestar sua esterilidade e, em seguida, armazenados em geladeira (~8°C).

Todos os concentrados de hemácias utilizados neste estudo foram desprezados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Das 33 amostras de pré-lavagem analisadas, nenhuma mostrou contaminação.

Das 33 amostras de pós-lavagem, duas mostraram positividade para *Staphylococcus aureus*, mas suas respectivas contra-provas não apresentaram contaminação.

O ambiente da Câmara de Fluxo Laminar (CFL) apresentou-se contaminado durante o processo de lavagem, de onde foram isolados bactérias (Agar Plate-count) e fungos (Agar Dextrose-Sabouraud 4%). Dos 7 experimentos realizados, em 3 (43%) foram isoladas bactérias, em 4 (57%) bolores, em 4 (57%) leveduras e em 1 (14%) houve presença de colônias mistas (bactérias contaminando colônias de fungos) que não puderam ser identificadas. No entanto, quando se avaliou a possibilidade de contaminação do ambiente da câmara quando não se realizava a lavagem de hemácias, não foi constatada a presença de microrganismos.

A TABELA 1 mostra os resultados obtidos nas análises microbiológicas dos CHL e do ambiente da CFL.

A FIGURA 4 expressa a frequência com que os microrganismos apareceram durante os 7 experimentos realizados.

A FIGURA 5 mostra o crescimento de várias espécies de fungos em Agar Dextrose-Sabouraud 4% colocado na CFL durante a lavagem, após 7 dias à temperatura ambiente.

TABELA 01: Qualidade microbiológica dos Concentrados de Hemácias Lavadas e do ambiente da Câmara de Fluxo Laminar.

| Nº do experimento | Nº de funcionários | Nº de bolsas | Análise microbiológica | | | |
|-------------------|--------------------|--------------|------------------------|---|--------------|---|
| | | | Amostras pré-lavagem | Amostras pós-lavagem | Contra-prova | Ambiente da câmara no momento da lavagem |
| 1º | 2 | 4 | - | - | 0 | Bacilos Gram ⁻ ; Cocos Gram ⁺ em cachos; Colônias características de Fungos filamentosos*; Leveduras; |
| 2º | 2 | 6 | - | <i>Staphylococcus aureus</i> (em duas amostras) | - | Bacilos Gram ⁻ ; Cocos Gram ⁺ isolados, em par, em cadeia e em cachos; Leveduras. |
| 3º | 1 | 3 | - | - | 0 | <i>Aspergillus niger</i> *; <i>Aspergillus sp</i> *; <i>Penicilium sp</i> * |
| 4º | 1 | 3 | - | - | 0 | Leveduras; <i>Aspergillus niger</i> *. |
| 5º | 2 | 7 | - | - | 0 | Presença de colônias mistas ** |
| 6º | 2 | 6 | - | - | 0 | Cocobacilos Gram ⁻ ; Cocos Gram ⁺ em cachos; Leveduras |
| 7º | 2 | 4 | - | - | 0 | <i>Aspergillus niger</i> * |

Legenda: +, positivo; -, negativo; 0, análise não realizada; * Bolores (Fungos Filamentosos); ** bactérias contaminando colônias de fungos.

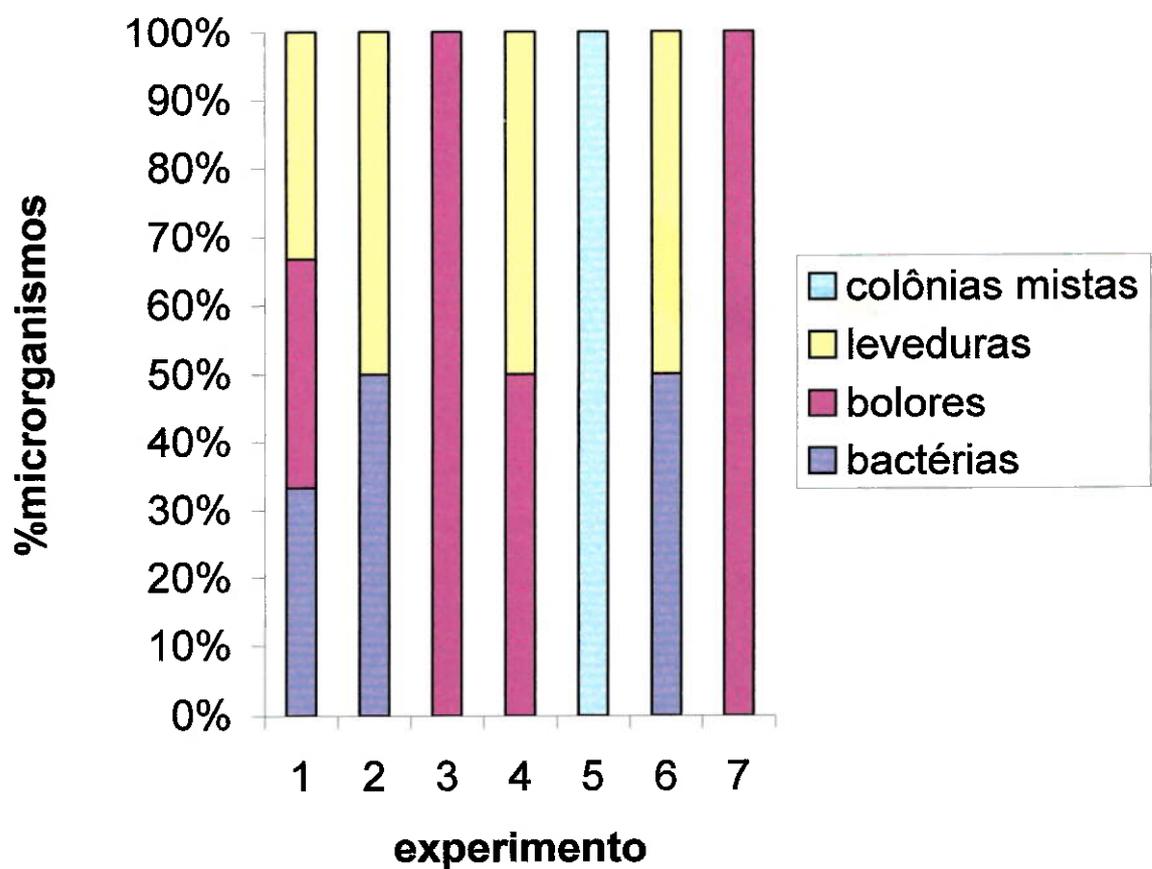


FIGURA 4: frequência de microrganismos no ambiente da Câmara de Fluxo Laminar durante a lavagem.



FIGURA 5: Agar Dextrose-Sabouraud 4% mostrando acentuado crescimento fúngico após 7 dias à temperatura ambiente.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Há duas vias pelas quais os produtos sanguíneos podem ser contaminados, uma endógena, na qual a contaminação provém de uma bacteremia assintomática do doador, e uma exógena, na qual a contaminação pode ocorrer no momento da flebotomia (flora normal da pele) ou durante o processamento, armazenagem ou transporte da unidade de sangue.^{14, 22}

O Concentrado de Hemácias Lavadas (CHL) apresenta um risco adicional de contaminação microbiológica, devido à necessidade de violação do sistema estéril da bolsa no momento da lavagem, sendo necessário que o procedimento seja realizado em Câmara de Fluxo Laminar (CFL) para evitar-se ao máximo a sua exposição aos contaminantes do ambiente.²

Em nosso estudo observamos positividade para contaminação de duas amostras de pós-lavagem (TABELA 01), porém não podemos afirmar que essa contaminação tenha ocorrido durante o processo de lavagem, porque não foi preenchido um dos critérios de positividade preestabelecidos, ou seja, positividade das respectivas contra-provas. Isto nos leva a crer que a contaminação possa ter-se dado durante a retirada ou inoculação das amostras nos meios de cultura. A ocorrência de falsos positivos devido à contaminação do produto durante a obtenção da amostra para o cultivo é freqüente.¹⁴ Entretanto são necessários mais estudos, porque é possível que a cultura do seguimento da bolsa de sangue seja negativa, mesmo o componente sanguíneo estando contaminado (falso negativo).⁹ Isto ocorre quando a contaminação inicial é extremamente baixa.¹⁴

Estudos realizados em concentrados de hemácias congeladas reconstituídas, as quais também foram lavadas em sistema aberto, não verificaram contaminação significativa, mesmo após 72 horas de estocagem a 4°C,^{17, 25, 31} mas há vários relatos de contaminação bacteriana em

hemocomponentes com taxas muito variáveis de um estudo para o outro, de acordo com o produto sanguíneo avaliado e com a técnica de pesquisa utilizada (TABELA 02). As plaquetas, por serem estocadas à temperatura ambiente, apresentam os maiores índices de contaminação. A incidência de reações adversas secundárias a contaminação bacteriana de componentes sanguíneos transfundidos pode ser tão alta quanto 1 em 700 concentrados de “pool” de plaquetas, 1 em 4.000 concentrados de plaquetas de doador único e 1 em 31.000 concentrados de hemácias,^{20, 24} com uma taxa de mortalidade em torno de 10%³⁴ a 26%.^{1, 33}

TABELA 02: Frequência de culturas positivas para crescimento bacteriano de acordo com o componente sanguíneo.

| Componente Sanguíneo | Culturas Positivas (%) | Referência |
|--------------------------|------------------------|------------|
| concentrado de plaquetas | 0-10 | 4, 8, 12 |
| “pool” de plaquetas | 0,14-0,3 | 3, 4, 8 |
| plaquetas de aférese | 0-4,9 | 3,12 |
| concentrado de hemácias | 0-0,003 | 3 |
| hemácias descongeladas | 0-0,2 | 12, 25 |

O fato de um hemocomponente apresentar cultura positiva, não significa que o paciente irá desenvolver sepse. Os sintomas secundários à contaminação do produto sanguíneo podem variar desde um quadro completamente assintomático até choque endotóxico e morte e irão depender das condições imunológicas do paciente, da quantidade e do tipo de produto transfundido e da virulência e número de microrganismos envolvidos.¹⁴

Várias espécies de bactérias têm sido identificadas como causadoras de reações pós-transfusionais. Algumas bactérias gram negativas, como a *Yersinia enterocolitica* e espécies de *Pseudomonas*, têm a habilidade de multiplicar-se a baixas temperaturas, contaminando mais freqüentemente os concentrados de

hemácias. Cocos gram positivos, como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e alguns bacilos gram negativos, como *Salmonella*, *Escherichia* e *Serratia*, têm sido relatados em concentrados de plaquetas.⁹

A *Yersinia enterocolitica*, um dos mais importantes contaminantes de hemocomponentes, foi implicada em 21 casos de sepse entre os anos de 1985 e 1996.¹ Essa bactéria usa citrato (um anticoagulante largamente utilizado em bancos de sangue) como fonte de energia e multiplica-se melhor na presença de ferro. Dessa forma, o concentrado de hemácias é o seu meio de crescimento ideal, sendo essa bactéria responsável por cerca de 51% dos casos de sepses relacionadas à contaminação bacteriana em hemácias.^{14, 36} As espécies de *Pseudomonas* estão envolvidas em cerca de 28% das reações adversas pós-transfusionais causadas por bactérias.²² Além destas, a *Serratia liquefaciens* também é considerada uma importante causa de sepse e choque endotóxico relacionados à transfusão de componentes sanguíneos, com cinco casos relatados ao CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) entre junho de 1992 e janeiro de 1999.^{5, 32}

O ambiente da Câmara de Fluxo Laminar (CFL), no momento da lavagem, mostrou-se contaminado por inúmeros microrganismos (**TABELA 01, FIGURAS 4 e 5**). Esses microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza, em sua maioria fazendo parte da micoflora aérea, predominando os esporos de bolores (Ex.: *Aspergillus* e *Penicillium*).²⁹ As leveduras são disseminadas por insetos vetores, pelo vento e pelas correntes aéreas. Os cocos gram positivos (Ex.: *Staphylococcus ssp.* e *Streptococcus ssp.*) são mais comumente encontrados nas vias aéreas superiores, no intestino e na pele, como parte da flora normal.²⁸ Os bacilos gram negativos (Ex.: *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Proteus*), por outro lado, são encontrados de forma escassa na pele humana, porém estão presentes de forma abundante no intestino e no ambiente natural, incluindo as roupas.⁷

Entretanto quando a câmara não estava sendo utilizada não houve contaminação. Estes achados podem indicar uma possível participação humana na contaminação microbiológica do ambiente da CFL, visto que erros no momento da utilização da câmara, como excesso de movimento e/ou movimentos rápidos na sala ou no interior da CFL geram turbulências no fluxo de ar, reduzindo a eficiência dos filtros e favorecendo a presença de microrganismos e partículas.^{1,7}

No Hemoce-Fortaleza, durante o ano de 2001, foram produzidos 259 CHL (FIGURA 6). Em vista das indicações atualmente aceitas para a utilização desse hemocomponente,¹¹ esse número pode ser considerado relativamente elevado, ressaltando mais uma vez o risco potencial de contaminação desse produto sanguíneo, principalmente se levarmos em consideração o nível de contaminação verificado na CFL.

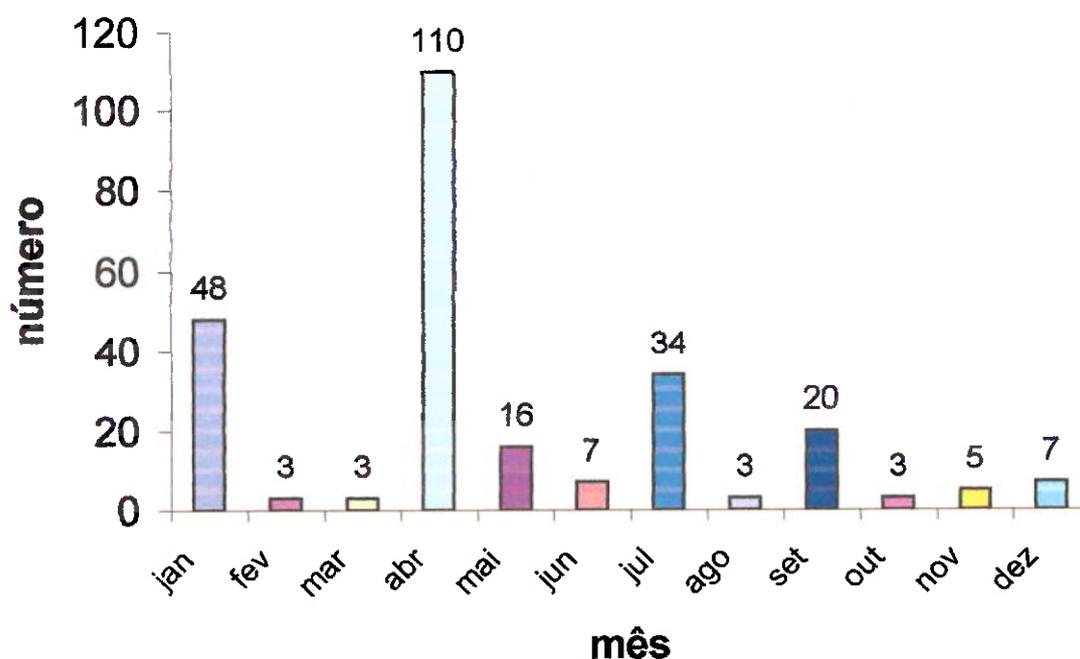


FIGURA 6: Número de Concentrados de Hemácias Lavadas no Setor de Fracionamento do Hemoce-Fortaleza durante o ano de 2001.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

1. O processo de lavagem de Concentrados de Hemácias realizado no Hemoce-Fortaleza mostrou-se seguro quanto à qualidade microbiológica desse hemocomponente.
2. A contaminação da Câmara de Fluxo Laminar provavelmente foi determinada por falhas nas técnicas de manuseio desse equipamento, uma vez que esse ambiente não apresentou contaminação microbiana quando não utilizado
3. A contaminação encontrada no ambiente da CFL representa um aumento no risco potencial de contaminação do CHL.
4. Recomendamos que:
 - 4.1. Todos os objetos utilizados no interior da CFL sejam previamente desinfetados.
 - 4.2. Sejam observadas as boas práticas de trabalho em CFL pelo pessoal que utiliza esse equipamento.
 - 4.3. Sejam treinados, periodicamente, todos os funcionários que utilizam a CFL.
 - 4.4. Sejam realizados os teste para revalidação da CFL.

SUMMARY

7. SUMMARY

In spite of the great progresses of the hemotherapy the transfusion of blood products is still surrounded of great risks. The concentrate of Washed red blood cell (WRBC), for being prepared in open system, it is subject to be contaminated by microorganisms of the atmosphere, for that the wash process should be accomplished in Laminar flow cabinetry (LFC), which should provide a sterile atmosphere for execution of that procedure. In view of that, this study intended to evaluate the microbiological quality of WRBC produced at the Hemoce-Fortaleza and of the atmosphere of LFC used in the process. For this end, were analyzed 33 washed red blood cell, before and after your wash, in the period from 01/18/2001 to 03/01/2002, in Bact-Alert (Organon teknika) apparel and of the atmosphere intern of LFC through culture means (Agar Plate-Count and Agar Dextrose-Sabouraud 4%) placed in the work area during the procedure. WRBC didn't show contamination, however of the atmosphere of LFC they were isolated several microorganisms. Of the 7 accomplished experiments, in 3 (43%) were isolated bacteria, in 4 (57%) moulds, in 4 (57%) yeasts, and in 1 (14%) there was presence of mixed colonies (bacteria and fungus), suggesting that, in spite of the wash method to have shown safe, there is an increased potential risk related to the microbial contamination of the atmosphere of LFC

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ASSOCIATED OF BLOOD BANKS. **Technical manual**. 13Th. ed. Bethesda, MD, 1999. 798p.
2. AMORIN FILHO, L. Procedimentos especiais em hemoterapia. In: ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂCIO. **Textos de apoio em hemoterapia: série trabalho e formação em saúde**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. v. 2, cap. 9, p. 41-59.
3. BARRETT, B. B.; ANDERSEN, J. W.; ANDERSON, K. C. Strategies for the avoidance of bacterial contamination of blood components. **Transfusion**, v. 33, n. 3, p. 228-233, Mar. 1993.
4. BLAJCHMAN, M. A. Bacterial contamination of blood products and the value of pre-transfusion testing. **Immunol. Invest.**, v. 24, n. 1-2, p. 163-170, Jan.-Feb. 1995.
5. BRECHER, M. E.; FOSTER, M.; MAIR, D. Glucose and hemolysis as a rapid screen for contamination of red blood cells with *Yersinia* and *Serratia*. **Vox Sang.**, v. 81, p. 136-138, 2001.
6. BRECHER, M. E.; TASWELL, H. F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the transfusion of washed red cells: a myth revisited. **Transfusion**, v. 29, n. 8, p. 681-685, Oct. 1989.
7. CAMPOS, A. S.; BAPTISTA, J. M. **Equipamentos de fluxo unidirecional e cabine de segurança biológica**. Rio de Janeiro, 1998. Apostila (Curso Calibração de Instrumentos. Teórico com Demonstração Prática).

8. CHIU, E. K. W.; YUEN, K. Y.; LIE, A. K. W. et al. A prospective study of symptomatic bacteremia following platelet transfusion and of its management. **Transfusion**, v. 34, n. 11, p. 950-954, Nov.-Dec. 1994.
9. DAVENPORT, R. D. Management of transfusion reactions. In: MINTZ, P. D. (Ed.). **Transfusion therapy: clinical principles end practice**. Bethesda, MD: AABB PRESS, 1999. cap. 18, p. 359-378.
10. FRIEDBERG, R. C. Transfusion therapy in hematopoietic stem cell transplantation. In: MINTZ, P. D. (Ed.). **Transfusion therapy: clinical principles end practice**. Bethesda, MD: AABB PRESS, 1999. cap. 12, p. 233-249.
11. GUIDE to the preparation, use and quality assurance of blood components. 5Th. ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing, 1999. 227p.
12. GOLDMAN, M.; BLAJCHMAN, M. A. Blood product-associated bacterial sepsis. **Transf. Med. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 73-83, Jan, 1991.
13. GOTLIEB, T. Hazards of bacterial contamination of blood products. **Anaesth. Intensive Care**, v. 21, n. 1, p. 20-23, Feb. 1993.
14. GUDINO, M. D.; . Contaminación Bacteriana de los Componentes de la Sangre. In: ENCUENTRO DE INMUNOHEMATOLOGIA Y MEDICINA TRANSFUSIONAL, Houston. 1998.
15. HARMENING-PITTIGLIO, D.; HARRISON, G. R.; WRIGHT, N. E. Preservação do sangue; aspectos históricos, revisão do metabolismo e perspectivas atuais. In: HARMENING. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2. ed: Rio de Janeiro: Revinter, 1992. cap. 2, p. 1-24.

16. INSTRUÇÕES: Operação e manutenção de fluxo laminar FLV-Q (classe especial – 100% exaustão). Curitiba: TROX[®] technik, 1995.
17. KAHN, P. A.; MERYMAN, H. T.; SYRING, R. L.; FLINTON, L. J. The fate of bacteria in frozen red cells. **Transfusion**, v. 16, n. 3, p. 215-220, May-Jun. 1976.
18. KRUSE, R. H.; PUCKETT, W. H.; RICHARDSON, J. H. Biological Safety Cabinetry. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, n. 2, p. 207-241, Apr. 1991.
19. KUEHNERT, M. J.; ROTH, V. R.; GREGORY, K. R. *et al.* Transfusion-transmitted bacterial infection in the united states, 1998 through 2000. **Transfusion**, v. 41, n. 12, p. 1493-1499, Dec. 2001.
20. MILLER, J. P.; AUBUCHON, J. P. Leukocyte-reduced and cytomegalovirus-reduced-risk blood components. In: MINTZ, P. D. (Ed.). **Transfusion therapy: clinical principles end practice**. Bethesda, MD: AABB PRESS, 1999. cap. 16, p. 313-339.
21. MOLLISON, P. L.; ENGELFRIET, C. P.; CONTRERAS, M. **Blood transfusion in clinical medicine**. 10Th. ed. Londres: Blackwel Science, 1997. 754 p.
22. MORDUCHOWICZ, G.; PITLIK, S. D.; HUMINER, D. *et al.* Transfusion reactions due to bacterial contamination of blood and blood products. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, n. 2, p. 307-314, Mar.-Apr. 1991.
23. MOREL, P.; LECONTE DES FLORIS, M. F.; BARDIACK, L. *et al.* Blood transfusion and bacterial risk. **Transfus. Clin. Biol.**, v. 7, suppl 1, p. 55s-62s, June 2000.

24. MORROW, J. F.; BRAIN, H. G.; KICKLER, T. J. *et al.* Septic reactions to platelet transfusions: a persistent problem. **JAMA**, v. 266, n. 4, p. 555-558, 1991.
25. MYHRE, B. A.; NAKASAKO, Y. Y.; SCHOTT, R. Studies on 4 °C stored frozen-reconstituted red blood cells: bacterial growth. **Transfusion**, v.17, n. 5, p. 454-459, Sept.-Oct. 1977.
26. NAVARETTI, M. C. Z.; FONTES, B. M. O. Transfusão de concentrado de hemácias e sangue total. In: CHAMONE, D. A. F. *et al.* **Manual de transfusão sanguínea**. São Paulo: ROCA, 2001. cap. 4, p. 35-65.
27. OBERMAN, H. The history of transfusion medicine. In: PETZ, L. D. *et al.* (Ed). **Clinical practice of transfusion medicine**. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. cap. 2, p. 11-32.
28. PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. v. 1, p. 285, 351.
29. PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1981. v. 2, p. 867.
30. PUCKETT, A.; DAVISON, G.; ENTWISTLE, C. C. BARBARA, J. A. Post transfusion septicaemia 1980-1989: importance of donor arm cleansing. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 2, p. 155-157, Feb. 1992.
31. RADCLIFFE, J. H.; DENHAM, M. A.; GAYDOS, G.; SIMPSOM, M. B. Bacteriological sterility of washed deglycerolized red blood cells after 72 hours storage. **Transfusion**, v. 18, n. 3, p. 365-366, May-Jun. 1978.

32. ROTH, V. R.; ARDUINO, M. J.; NOBILETTI, S. C. *et al.* Transfusion-related sepsis due to *Serratia liquefaciens* in the United States. **Transfusion**, v. 40, p. 931-935, Aug. 2000.
33. SAZAMA, K. Bacteria in blood for transfusion: a review. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 118, n. 4, p. 350-365, Apr.1994.
34. SAZAMA, K. Reports of 355 transfusion associated deaths: 1976 through 1985. **Transfusion**, v. 30, n. 7, p. 583-590, Sept. 1990.
35. SIRCHIA, G.; FERRONE, S.; MERCURIALI, F. Leukocyte antigen-antibody reaction and lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes. **Blood**, v. 36, n. 3, p. 334-336, Sept. 1970.
36. TIPPLE, M. A.; BLAND, L. A.; MURPHY, J. J. *et al.* Sepsis associated with transfusion of red cells contaminated with *Yersinia enterocolitica*. **Transfusion**, v. 30, n. 3, p. 207-213, Mar.-Apr. 1990.