

MONITORAMENTO DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA OCORRIDAS EM CONCENTRADO DE PLAQUETAS – APLICAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN.

Pereira, A.¹; Callera, F.¹; Lobo, A. O.²; Martin, A. A.²; Martinho, H.²

¹Serviço de Hemoterapia e Hematologia de São José dos Campos
R: Antonio Sais, 425 Centro São José dos Campos-SP, Brasil

²Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica – UniVap
Av: Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova São José dos Campos-SP, Brasil
alexandre@univap.br

Resumo- A contaminação bacteriológica em concentrado de plaquetas (CP) se apresenta como uma das principais causas de morte associada à transfusão. Os métodos convencionais de identificação hoje existentes, fundamentais para o controle de qualidade de CP, têm suas limitações principalmente pela falta de sensibilidade, de especificidade. Recentemente, técnicas ópticas, como a espectroscopia Raman (ER), têm sido aplicadas na caracterização de vários tipos de amostras biológicas. O objetivo do presente trabalho é utilizar a ER na identificação de contaminação bacteriológica em CP. Foram coletados espectros em três grupos diferentes de CP, normais (CPN), filtradas (CPF) e contaminadas (CPC). Os resultados demonstraram uma mudança no padrão espectral entre os grupos CPN e CPC, com diferenças espectrais nos picos entre 700 á 1000 cm^{-1} correspondente ao DNA e RNA, o que infere o aumento da atividade metabólica ocorrida em processos iniciais de contaminação. Desta forma a ER apresenta-se como um método importante na identificação de CPC com a vantagem de obter resultados em tempo real, de forma não-invasiva e com alta sensibilidade, possibilitando sua aplicação no controle de qualidade e identificação bacteriana ocorrida em CP.

Palavras-chave: Hemoterapia, Espectroscopia Raman, plaquetas, contaminação bacteriológica.

Área do Conhecimento: Engenharias

Introdução

A utilização de hemoderivados constituiu-se em uma modalidade terapêutica de fundamental importância no exercício da medicina. Dentre os diversos hemocomponentes que podem ser utilizados, o concentrado de plaquetas (CP) é indicado em situações de distúrbios hemorrágicos [1]. A contaminação bacteriana em CP se apresenta hoje como uma das principais causas de morte associada à transfusão. Constatou-se que nos Estados Unidos e Canadá o hemocomponentes mais sujeito à contaminação e, portanto, à transmissão de infecção bacteriana é o CP, numa prevalência de 7% [2].

Na reunião anual *Center for Biologics Evaluation and Research/ American Association of Blood Banks* [3] realizada em novembro de 2001, ocorreram 63 mortes devido a contaminação bacteriana ocorridas em CP no decurso de 2001, correspondendo a 15,3% dos acidentes fatais. O aumento destas situações, quando comparadas com relatos anteriores podem corresponder à maior atenção que lhes tem vindo a ser prestada [4]. Várias técnicas têm sido utilizadas para detectar a contaminação bacteriana em componentes e evitar reações transfusionais graves. O método mais utilizado é o da inspeção visual antes da administração. Entretanto, este

método, não se apresenta como sendo um método completamente eficaz, tendo em vista que a comparação entre a coloração de uma unidade infectada ou não depende de que tenha ocorrido tempo suficiente para se desenvolver uma grande proliferação bacteriana [5]. A avaliação do movimento de turbilhão (swirling), a medida do pH e dos níveis de glicose no plasma, têm sido apontados como indicadores para determinação de possível contaminação bacteriana nos concentrados de plaquetas. Entretanto, seu nível de sensibilidade é baixo quando comparado com a observação microscópica. A aceitação destes métodos tem sido contestada, principalmente, pela falta de sensibilidade, de especificidade, de recursos humanos, assim como, pelos custos implicados. [6].

Recentemente, técnicas ópticas, como a espectroscopia Raman (ER), têm sido aplicadas com muito sucesso na caracterização e estudo de vários tipos de amostras biológicas, incluindo estudo de vários tipos de câncer, lesões hepáticas, processos inflamatórios e metabólicos. Particularmente, no caso da espectroscopia vibracional Raman, uma de suas grandes vantagens reside na aquisição de uma maior riqueza de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracionais frente aos níveis de energia eletrônicos.[7,8].

Outra grande vantagem reside na possibilidade de se realizar experimentos 'in situ', sem a necessidade de preparação prévia das amostras em estudo. Particularmente em sistemas biológicos esta vantagem permite realizar estudos não invasivos em tempo real. A identificação dos modos vibracionais de CP durante seu armazenamento através da espectroscopia Raman, poderão fornecer informações importantes sobre as estruturas moleculares existentes podendo identificar a contaminação bacteriana ocorridas durante o processo de estocagem.

Materiais e Métodos

Para a caracterização do padrão espectral dos grupos de CP, foram analisados 150 unidades dividida estas em três grupos diferentes. Coletaram-se espectros de amostras dos três grupos de CP: normais (CPN), filtrados (CPF) e contaminados não filtrados com cepas de *S. Aureus* nas concentrações $x = 6 \times 10^8$ cél/ml e $y = 300 \times 10^8$ cél/ml (CPCx e CPCy). Os CP foram mantidos em agitação horizontal, a 22°C por 5 dias e os sinais Raman foram obtidos diariamente.

O sistema óptico utilizado para aquisição dos sinais Raman foi spectrometer RFS 100 (Bruker) obedecendo os seguintes parâmetros de análise, demonstrado na Tabela 1:

Tabela 1: Parâmetros de aquisição dos Sinais Raman.

FT-Raman RFS 100	Parâmetros
Resolução	4 cm^{-1}
Laser Nd:YAG	1064 nm
Abertura do feixe	7 mm
Potência do laser	300 mW
Scans	300
Potência na amostra	160 mW

A geometria de coleta utilizada foi de retroespalhamento, devido ao alto grau de rejeição contra o Espalhamento Rayleigh. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 5mm.

Resultados

Os sinais Raman obtidos do grupo CPN apresentaram uma mudança no padrão espectral à partir de 72 horas após a coleta na região de 700 a 1200 cm^{-1} (vide Figura 1). Nestes resultados observam-se alterações nas bandas de 813 cm^{-1} e 788 cm^{-1} que correspondente ao RNA e DNA respectivamente. Nos grupos CPF e CPC nas 72 horas não observamos esta mudança quando comparado com o grupo CPN (vide figura2).

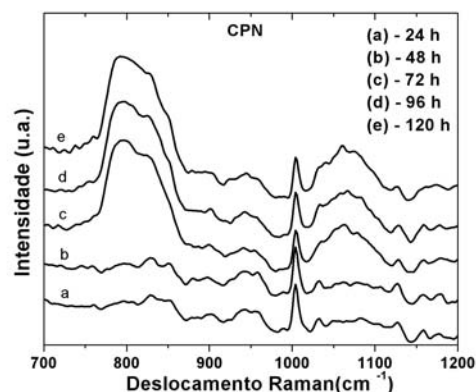


Figura 1- Espectro coletados de 50 do grupo CPN durante o período de armazenamento, onde (a) corresponde a média dos espectros após 24 hs de coleta, (b) após 48 hs, (c) após 72 hs, (d) após 96 hs (e) após 120 hs.

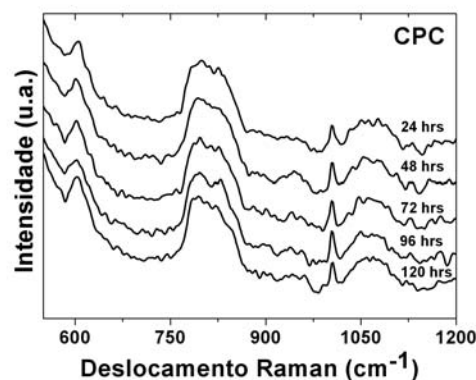


Figura 2 - Espectro coletados de 50 unidades do grupo CPC e CPF durante o período de armazenamento.

Discussão

No Grupo CPF e CPC não observamos esta mudança ao longo do período de armazenamento o que pode estar relacionada primeiramente com a presença de células brancas. Esta mudança, podemos inferir, que está relacionada com a presença de células brancas presentes nas 48 horas de armazenamento que depois de decorrido este tempo os leucócitos liberam seu material nuclear modificando o padrão espectral. Outro ponto a ser destacado que o aumento do padrão espectral observado no grupo CPC e CPF pode estar relacionada também com o aumento da atividade metabólica ocorrida em processos iniciais de contaminação ou exaustão metabólica, fazendo-se necessário um estudo mais apurado deste grupo.

Conclusão

Certamente, enquanto os novos métodos de identificação se direcionam para um possível uso clínico, há a necessidade de um novo método

de controle seguro na administração de CP. Através dos resultados encontrados podemos afirmar que a espectroscopia Raman pode identificar mudanças metabólicas ocorridas em CP, apresentando-se como um potencial método de identificação de CPC com a vantagem de obter resultados em tempo real, de forma não-invasiva e com alta sensibilidade, possibilitando sua aplicação no controle de qualidade e identificação bacteriana ocorrida em CP, diminuindo de forma significativa os riscos de acidentes transfusionais fatais.

Referências

- [1] - Neiva T.J.C, Machado M.J, Hoehn, M. Evaluation of platelet aggregation in platelet concentrates (PCs): Storage implications Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2003;25 (4)207-212.
- [2] - Green M. Contaminations bacterially in the platelets concentrates. Transf Med Rev 1991; 5: 243.
- [3] - Epstein JS, Willians AE, Biswas R. FDA Update. Office of Blood Research and Rev. CBER, FDA. CBER-AABB Annual meeting, 2001.
- [4] - Sazama K. Reports of 355 transfusions-associated deaths: 1976 through 1985. Transfusion 1990; 30: 583-590.[9]
- [5] - Kim D.M, Brecher M.E, Bland L.A. Visual identification of bacterially contaminated red cells. Transfusion 1992; 32: 221-225
- [6] - Mitchell K.M, Brecher M.E, Approaches to the detection of bacterial contamination in cellular blood products. Transfus Med Rev 1999; 13: 132-144.
- [7] - Faria, D. L. A; Santos, L. G.C. A demonstração sobre o espalhamento inelástico da luz: repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, n.20, v.3, p.319-23, 1997.
- [8] - Fitzwater DA, Thomasson KA, Glinski RJ . A Modular Raman-Spectroscopy System using a Helium-Neon laser that is also suited for emission spectrophotometry experiments Journal of Chem. Ed. 1995; 72: 187-189.