

## DETERMINAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA EM SANGUE ESTOCADO ATRAVÉS DA DOSAGEM DE GLICOSE COM TIRA REAGENTE.

BRUNO SOERENSEN \*, MARY EMI YOSHIO \*\* E MARILDA CASEMIRO DA ROCHA\*\*

(Laboratório Clínico-Veterinário da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu).

**RESUMO** — Os autores estudam a aplicabilidade de novo método para a determinação da contaminação bacteriana de sangue estocado colhido com solução A.C.D. e preservado a 4-6°. O método consiste na dosagem de glicose com tira reagente, tomando como base que elevada porcentagem das bactérias que interessam a Banco de Sangue desdobram a glicose.

A glicólise observada foi a seguinte: 250 mg% de glicose no dia da colheita e 130 mg% após 20 dias de estocagem. Quanto às amostras de sangue contaminados propositalmente com 24 cepas isoladas de sangue estocado, após 15 a 20 dias de observação revelaram 83% dos sangues quantidade inferior a 130 mg% de glicose, portanto diante dos resultados, os valores inferiores a 130

mg% indicariam a possibilidade de contaminação e os valores compreendidos entre 130 e 250 mg% seriam devido a glicólise, independente de qualquer contaminação bacteriana.

Finalmente concluem que o método apresenta a vantagem de ser rápido e cômodo, mas deverá ser aplicado apenas quando as condições não permitam o auxílio do microscópio, portando, o consideram nos seus resultados como sendo inferior aos métodos de bacterioscopia pré-transfusional.

**UNITERMOS** — Contaminação bacteriana em banco de sangue; Determinação da contaminação bacteriana em sangue estocado. Desdobramento de glicose por bactérias contaminantes de sangue estocado.

A frequência dos acidentes transfusionais fatais por sangue contaminado justifica o controle bacteriológico sistemático. Braude (1), examinando 1967 frascos encontrou 2,21% contaminados; entre nós, Russi (10) em 3.000 frascos de plasma examinados pela bacterioscopia pré-transfusional encontrou 3,3% de frascos suspeitos e Soerensen (11), pela bacterioscopia em lâmina corada pelo azul de metileno encontrou, em 2194 frascos examinados, 23 contaminados (1,0%).

Diversos métodos foram recomendados para a realização da bacterioscopia pré-transfusional. Assim a microscopia por contraste de fase foi indicada

\* Diretor Substituto da Divisão de Microbiologia e Imunologia do Instituto Butantan e Professor das Disciplinas de Laboratório Clínico Veterinário e Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

\*\* Alunas do 5.º ano do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.

por Faria (4-5), Discombe e Meyer (3), a bacterioscopia em lâmina corada pelo azul de metileno e pelo método de Gram por Petzelt (8), sendo preconizada ainda por Soerensen (11) uma técnica para a execução da bacterioscopia pré-transfusional, conseguindo-se assépticamente, do frasco, uma amostra de sangue, a feitura de esfregaço em lâmina com a própria agulha de punção e a coloração pelo azul de metileno.

Indubitavelmente, os métodos de bacterioscopia pré-transfusional quando executados por profissional capaz, são plenamente satisfatórios, porém existem condições que impedem que o sangue seja selecionado adequadamente para a transfusão, nos referimos especialmente aos casos em que não se dispõe de auxílio do microscópio.

Ainda os métodos culturais foram recomendados para controle de esterilidade de sangue e plasma (2-7-12), mas o consideramos pouco práticos e antieconômicos.

Grande número de bactérias que contaminam sangue estocado desdobram a glicose sendo este o fato que nos levou à realização do presente trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente afim de estudar a glicólise foram colhidos em separado amostras de sangue procedentes de 3 doadores (frascos A.C.D. Baxter com 3,30 g de glicose), sendo mantidos a 4-6.°C durante 20 dias.

A glicólise foi avaliada com tira reagente "Dextrostix", logo após a colheita e aos 20 dias de conservação, período este correspondente ao tempo máximo de estocagem recomendado para o uso de sangue integral. A técnica obedida foi a seguinte: 1) Agitar o frasco com cuidado e retirar asépticamente uma pequena amostra de sangue. 2) Depositar o sangue sobre a tira de maneira a cobrir totalmente a área reagente. 3) Aguardar exatamente 60 segundos utilizando o ponteiro de segundos de um crômetro. 4) Lavar rapidamente o sangue da tira com um jato fino de água, usando um frasco de lavagem, tomando cuidado de evitar uma lavagem incompleta ou ainda a insistência em demasia na lavagem. 5) Ler o resultado imediatamente após a lavagem, comparando a área de prova com a tabela de cores. Quando a reação na tira corresponder exatamente a um dos blocos coloridos em referências, ler o valor diretamente ou se a cor obtida na tira for intermediária entre duas cores, interpolar o resultado ou indicar o valor como sendo dentro dos valores designados pelas duas cores.

Após a determinação da glicólise, procedemos a colheita de 500 ml. de sangue em solução A.C.D. e a seguir foi distribuído em 24 tubos esterilizados, 10 ml por tubo e contaminado propositadamente cada tubo com cepas bacterianas psicrófilas isoladas de sangue estocado, ficando um tubo como controle.

Os tubos foram conservados em geladeira (4-6°C) pelo período de 20 dias. Após 15 dias de conservação procedemos a dosagem de glicose com tira

reagente, sendo repetida após 20 dias. Nas duas oportunidades procedemos a bacterioscopia em lâminas coradas pelo azul de metileno e pelo método de Gram a fim de certificarmos do desenvolvimento bacteriano.

Determinamos o grau de toxidez dos sangues depois de ter transcorrido 20 dias de conservação, com a finalidade de relacionar com os resultados da dosagem de glicose. Para esta prova foi seguida a técnica empregada por Geller e Jawetz (6), inoculando 0,5 ml de sangue correspondente a cada cepa contaminante por via intraperitoneal em 10 camundongos Swiss machos pesando 12 a 18 g.

## RESULTADOS

1) A determinação da glicólise das 3 amostras de sangue levaram aos seguintes resultados: logo após a colheita: 250 mg% e após 20 dias de estocagem foram encontrados valores compreendidos entre 130 e 150 mg%, independente de qualquer contaminação bacteriana.

2) Todos os sangues contaminados mostraram-se positivos pela bacterioscopia, coincidindo as características morfológicas e tintoriais com as das cepas contaminantes.

3) A determinação da glicose através da tira reagente e o grau de toxidez das amostras de sangue contaminados, assim como do sangue controle não contaminado podem ser avaliados pela observação da Tabela I.

## DISCUSSÃO

A glicólise de sangue citratado conservado a 4°C, conforme Rivera (9) pode ser observada no período compreendido entre o décimo e trigésimo dias podendo ser notada diferenças apreciáveis entre as amostras de sangue. O mesmo autor referindo-se a sangue estocado em soluções estabilizadoras contendo glicose afirma que a glicólise é intensificada.

Os nossos resultados mostram que a glicólise que se processa, avaliada pela tira reagente é a partir de 250 mg% no dia da colheita do sangue, até 180 a /150 mg% após /20 dias de estocagem a 4-6°C.

Quanto à dosagem de glicose em sangue contaminados, verificamos que 20 sangues apresentaram taxas de glicose inferiores a 130 mg%, coincidindo com a capacidade de desdobramento da glicose pela cepa contaminante correspondente ao sangue.

A prova de toxidez das diferentes amostras de sangue contaminado, realizada em camundongo, demonstrou ainda que a maioria das cepas são toxígenas, coincidindo de certa maneira com a capacidade de desdobramento da glicose.

## CONCLUSÃO

1) O sangue conservado a 4-6° C colhido em solução A. C. D. sofre uma glicólise que avaliada através de tira reagente se encontra compreendida entre 250 mg% no dia da colheita do sangue e 130 a 150 mg% após 20 dias de estocagem.

2) Aproximadamente 83% (20 amostras) dos sangues contaminados revelou quantidade inferior a 130 mg% de glicose, podendo ser detectado através da dosagem de glicose com tira reagente. Os valores compreendidos entre 130 e 250 mg% seriam devido a glicólise independente de qualquer contaminação bacteriana, portanto quando a quantidade de glicose for inferior a 130 mg%, poderá indicar uma contaminação bacteriana.

3) Finalmente, o método apresenta a vantagem de ser rápido e cômodo, mas deverá ser aplicado apenas quando as condições não permitiam o auxílio de microscópio, portanto o consideramos nos seus resultados como sendo inferior aos métodos de bacterioscopia pré-transfusional.

*SUMMARY* — The authors study the applicability of a new method for the determination of bacterial contamination of a stored blood, harvested with an A.C.D. solution, and preserved at 4-6°C. The method consists of the dosage of glucose by the aid of a reagent strip (band), based on the fact that the high percentage of bacteria, which is of interest to the Blood Bank, unfolds glucose.

The observed glycolysis is the following: 250 mg% of glucose at the day of harvesting, and 130 to 150 mg% after 20 days of storage. As to the blood samples, deliberately contaminated with 24 strains isolated from stored blood, after 15 to 20 days of observation, 83% of the samples revealed less than 130 mg% of glucose. In view of these results, there-

fore, the values lower than 130 mg% indicate a possibility of contamination, while the values between 130 and 250 mg% would be due to glycolysis, independent of any bacterial contamination.

The authors conclude that this method presents the advantage of being rapid and easy, that it should, however, be applied only when the conditions do not permit the use of a microscope. Judged by the results it is, therefore, considered inferior to the pretransfusional bacterioscopy methods.

*UNITERMS* — Bacterial contamination in a blood bank. Determination of the bacterial contamination in stored blood. Breaking of glucose by bacteria contaminants of stored blood.

SOERENSEN, B., YOSHIO, M. E. e ROCHA, M. C. — Determinação da contaminação bacteriana em sangue estocado através da dosagem de glicose com tira reagente. *Mem. Inst. Butantan*, 36: 51-56, 1972.

TABELA I

Determinação da glicose através da tira reagente e do grau de toxidez das amostras de sangue contaminados.

	Identificação da cepa contaminante do sangue	Dosagem de glicose com tira reagente	Inoculação Experimental do sangue em grupos de 10 camundongos
<i>Pseudomonas</i>	1919	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	3192	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	0010 (1)	= 40 mg%	Mortos em 8 horas
	4436 (1)	± 90 mg%	Mortos em 8 horas
	6504 (1)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	6679 (2)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	6785 (2)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	7076 (2)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	7583 (2)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	33960 (2)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	1910 (3)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	3863 (4)	±170 mg%	Mortos em 8 horas
<i>Enterobacter</i>	1323 (5)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	1530 (5)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	1533 (5)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	6892 (5)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	7860 (5)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	4011 (6)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	4979 (6)	< 40 mg%	Mortos em 8 horas
	7582 (6)	< 40 mg%	Mortos em 1 hora
<i>Bacillus</i>	1044	>250 mg%	Vivos após 48 horas
	9223	>250 mg%	Vivos após 48 horas
	9437	±100 mg%	Mortos em 8 horas
	33992	>250 mg%	Vivos após 48 horas
	Sangue não contaminado (Contrôle)	>250 mg%	Vivos após 48 horas

(1) *Pseudomonas*, Sp não correspondendo as características de *P. aeruginosa*; *P. fluorescens*; *P. putida*; *P. stutzeri*; *P. multivorans*; *P. maltophilia*; *P. pseudomallei*. (2) *Pseudomonas* Sp. similar, mas, não idêntica à *P. stutzeri*. (3) *Pseudomonas multivorans* (4) *Pseudomonas fluorescens*. (5) *Enterobacter liquefaciens*. (6) *Enterobacter aerogenes*.

SOERENSEN, B., YOSHIO, M. E. e ROCHA, M. C. — Determinação da contaminação bacteriana em sangue estocado através da dosagem de glicose com tira reagente. *Mcm. Inst. Butantan*, 36: 51-56, 1972.

---

#### BIBLIOGRAFIA

1. BRAUDE, A. I.; SANFORD, J. P.; BARTLETT, J. E. and MALLERY, O. T. Effects and clinical significance of bacterial contaminants in transfused blood. — *J. Lab. Clin. Med.*, 39: 902-916, 1952.
2. CUBONI, E. — Controllo della sterilità dei tubi per transfusione. — *Boll. Ist. Sieroter. Milan*, 41: 340-353, 1962.
3. DISCOMBE, G.; MEYER, H. — Zur frage der bakteriologischen Kontrol von blutkonserven — *Deuts. Med. Wschr.* 79: 891-892, 1954.
4. FARIA, R. — Aspectos microbiológicos na hemoterapia — *Rev. Clín de São Paulo*, 33: 6-20, 1957.
5. FARIA, R. — A bacterioscopia direta pré-transfusional e sua importância clínica — *Arq. Biol.* 44 (330): 89-98, 1960.
6. GELLER, P. and JAWETZ, E. — Experimental studies on bacterial contamination of bank blood. — *Jour. Lab. Clin.* 43 (5): 696-706, 1954.
7. LOGAN, W. R. — Note on the testing of transfusion fluids for contamination — *Brit. M. J.* 1: 854, 1941.
8. PETZELT, K. — Zur Vermeidung von transfusionsschaden bei verwendung von blutkonserven — *Deuts. Med. Wschr.* 78: 1505-1506, 1963.
9. RIVERA, B. J. — Transfusion de sangre — Editorial Marban. Nuevas Gráficas S/A — pag. 329, Madrid, 1967.
10. RUSSI, A. A. CIT. FARIA, R. — A bacterioscopia direta pré-transfusional e sua importância clínica. — *Arq. Biol.*, 44(330): 89-98, 1960.
11. SOERENSEN, B. — A bacterioscopia pré-transfusional em lâmina corada pelo azul de metileno. Técnica para a sua execução. — *Rev. Bras. Cir. (Boletim Oncologia)*, 50(4): 245-249, 1965.
12. WALTER, C. W.; Kundsinn, R. B. and BULTON, L.N. — New technic for detection of bacterial contamination in a blood bank using plastic equipment. *New. Engl. J. Med.* 257: 364-369, 1957.

Recebido para publicação em 30 julho/72

Aceito para publicação em 6 set./72