

Avaliação de dois sistemas para coleta de sangue de carneiro utilizado no preparo de meios de cultura

Evaluation of two systems for sheep blood collection used for preparing culture media

José Augusto de R. BARBOSA ^{1*}
Evelyn O. SARMENTO ¹
José Eduardo de R. BARBOSA ¹
José Carlos FARACO ¹
Renata S. FONTES ¹

RIALA6/928

Barbosa; J. A. de R. et al. Avaliação de dois sistemas para coleta de sangue de carneiro utilizado no preparo de meios de cultura. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):127-130, 2002.

RESUMO. Hemoderivados de origem animal são amplamente empregados no preparo de meios de cultura utilizados em práticas laboratoriais de interesse em Saúde Pública. Para avaliação da qualidade deste produto foram testados dois sistemas de coleta de sangue em carneiro. O sistema tradicional, utilizando seringa, e um sistema em bolsa confeccionada em cloreto de polivinila (PVC) atóxico. Foram utilizados 40 carneiros adultos, machos e fêmeas, distribuídos de forma aleatória em dois grupos compostos por vinte animais cada. O sangue coletado para o estudo foi manipulado com assepsia em ambiente estéril, sendo posteriormente incubado a 37 °C durante 24 horas e semeado em placas com ágar Mueller Hinton sangue (MHS) e em tubos com caldo de infusão cérebro coração (BHI). Os dados obtidos demonstraram a conveniência do uso da bolsa em PVC, por não apresentar crescimento bacteriano em nenhuma das amostras testadas.

PALAVRAS-CHAVE. Bolsa de PVC; sangue desfibrinado; coleta de sangue de carneiro; contaminação; hemoderivados.

INTRODUÇÃO

Hemoderivados de origem animal são amplamente empregados no preparo de meios de cultura utilizados em práticas laboratoriais. Os meios são formulados com o intuito de permitir o desenvolvimento de bactérias de interesse biomédico, possibilitando sua identificação e o estudo de suas propriedades biológicas, entre elas a capacidade de produzir hemólise ^{1,3}. O enriquecimento de meios de cultura como ágar sangue e ágar

chocolate é freqüentemente obtido através da adição de sangue desfibrinado de carneiro⁵. A qualidade do sangue empregado para enriquecimento de meios de cultura é importante, sendo dependente de vários fatores entre os quais a saúde do animal, a presença de substâncias que podem causar interferência no crescimento de microorganismos, e os métodos utilizados para processamento do sangue durante a elaboração do produto⁶. Com o objetivo de avaliar a qualidade do sangue em relação à esterilidade, foram testados dois sistemas para a coleta de

¹ Instituto Adolfo Lutz - Serviço de Biotério

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo 355, 01246 - 902, Cerqueira César - São Paulo - SP, e- mail: jaraeffray@hotmail.com

sangue em carneiros. O sistema tradicional, em que a coleta é realizada através de seringa, e o sistema que utiliza bolsa confeccionada em cloreto de polivinila (PVC) atóxico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados 40 carneiros adultos saudáveis, sem raça definida, machos e fêmeas, submetidos a controle zootécnico e sanitário, distribuídos de forma aleatória em dois grupos compostos por 20 animais cada.

Os animais foram mantidos em instalação rural, em sistema semiconfinado recebendo ração balanceada, suplementação de sal mineral e água ad libitum.

Todos os procedimentos que envolveram os animais foram realizados de acordo com os princípios éticos que orientam a experimentação animal, com o intuito de evitar a dor e o sofrimento^{2,7}.

2. Materiais e Equipamentos

Foram utilizados dois sistemas para coleta de sangue:

Grupo A - sistema aberto, utilizando seringa hipodérmica de vidro estéril com capacidade para 50 mL, provida de agulha 40x12 (figura 1). Frascos de vidro estéreis com capacidade para 500 mL, contendo 80 gramas de pérolas de vidro e uso de Bico de Bunsen para transferência do sangue.

Grupo B - sistema fechado, utilizando bolsa confeccionada em PVC atóxico, medindo 145 mm x 250 mm, com capacidade total de 1000 mL e capacidade útil de 400 mL de sangue desfibrinado, contendo 80 gramas de pérolas de vidro, conectada a um tubo de silicone de 1 m de comprimento, provido de agulha 40x16, em aço eletropolido (figura 2). Este sistema foi esterilizado através de radiação gama e produzido por J.R.Comércio de Produtos Hospitalares Ltda. (Campinas-SP).

3. Procedimentos para sangria e controle de esterilidade

Os animais foram contidos em decúbito lateral para coleta do sangue. Foi realizada tricotomia na região da veia jugular externa e anti-sepsia com solução de álcool iodado previamente a venopunção⁴. O garrote foi aplicado na região do pescoço.

No grupo A, a venopunção foi feita com agulha 40x12 conectada a seringa para coleta do sangue. Após atingir o volume de 50 mL, a seringa foi desconectada e imediatamente outra seringa foi conectada a agulha inserida na veia do animal, retirando-se desta forma, alíquotas de 50 mL de sangue por vez.

A transferência do sangue da seringa para o frasco estéril contendo pérolas de vidros, foi feita dentro da área de segurança proporcionada pelo bico de Bunsen (figura 3). Após a transferência, o frasco foi vedado com tampão estéril e agitado manualmente durante aproximadamente 15 minutos para o processo de desfibrinização do sangue.

No grupo B, após a venopunção com agulha 40x16 conectada de forma permanente ao sistema, o sangue foi

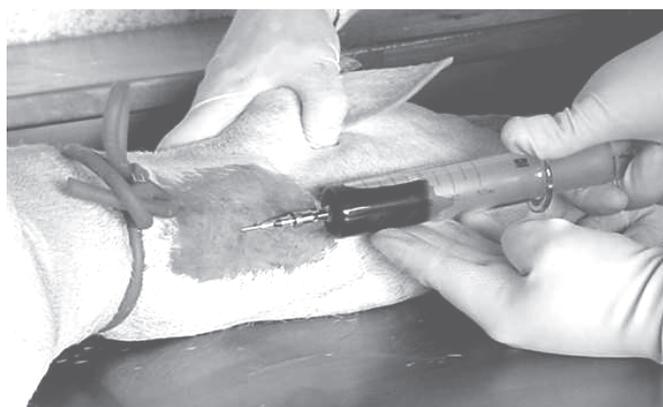


Figura 1. Grupo A - Sistema aberto de coleta de sangue com seringa.

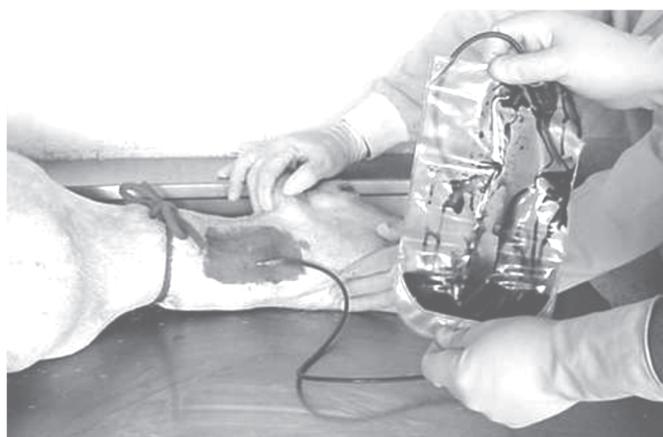


Figura 2. Grupo B - Sistema fechado de coleta de sangue com bolsa em PVC.

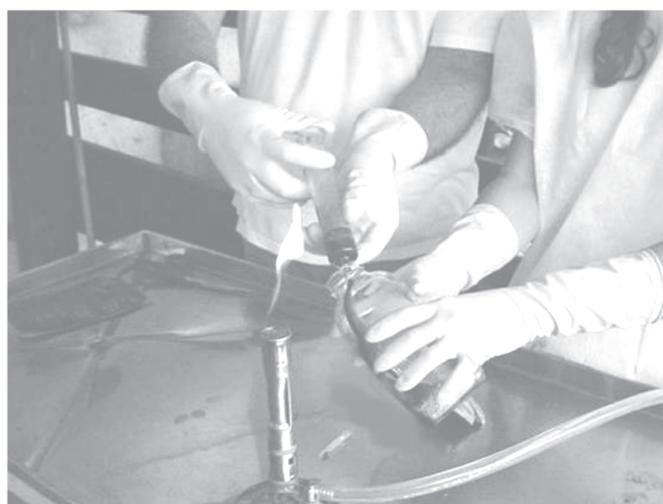


Figura 3. Grupo A - Transferência do sangue através de seringa para frasco estéril.

coletado diretamente para a bolsa em PVC, disposta em posição inferior ao animal, até que o volume necessário seja alcançado.

A vedação do sistema foi realizada manualmente através de um nó, feito no tubo de ligação entre a agulha e a bolsa, que foi agitada manualmente por 15 minutos para desfibrinização do sangue. Os frascos e bolsas com sangue foram identificados e transportados para o laboratório para monitoramento.

O sangue proveniente dos grupos A e B foi manipulado em ambiente estéril, sendo posteriormente incubado em estufa a 37 °C durante 24 horas para ser semeado com assepsia em placas com ágar Mueller-Hinton, enriquecidas com 5% de sangue de carneiro (MHS) e tubos contendo 3 mL de caldo de infusão cérebro e coração (Brain Heart Infusion Broth - BHI).

Para verificação de esterilidade, as placas MHS e os tubos BHI foram incubados a 37 °C por 24 e 48 horas respectivamente. A partir do crescimento bacteriano observado, foram feitos esfregaços em lâmina para serem posteriormente corados pelo método de Gram.

4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Fisher para determinação de eventuais diferenças significantes entre os grupos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos após os respectivos períodos de incubação, demonstraram que o sistema que utiliza bolsa em PVC não apresentou contaminação detectável pela metodologia empregada. O sistema aberto, que utiliza seringa, revelou a

presença de contaminação em 35 e 40 % das amostras testadas, conforme os resultados apresentados nas tabelas I e II, respectivamente.

A partir das colônias bacterianas obtidas das placas e tubos que apresentaram contaminação, foram feitos esfregaços em lâminas, que corados pelo método de Gram indicaram a presença de cocos Gram positivos. Neste estudo, não foi realizada a identificação dos microrganismos.

Para análise estatística foi utilizado o teste de Fisher, que afasta a hipótese de casualidade, uma vez que o resultado observado ($p < 0,01$) comprovou existir diferença significativa entre os métodos utilizados.

CONCLUSÕES

A obtenção de sangue de carneiro para elaboração de produtos biológicos apresenta dificuldades operacionais, pois além de ser um material extremamente vulnerável a contaminação por microrganismos, é coletado em condições de campo, geralmente distante de instalações adequadas.

Com o objetivo de obter um produto de qualidade, indispensável às práticas laboratoriais voltadas ao diagnóstico e pesquisa, foi desenvolvida uma bolsa em PVC atóxico, que por se constituir em um sistema fechado e estéril, proporciona condições ideais para a execução de sangria em animais, praticamente independente das condições ambientais.

Neste trabalho demonstrou-se que no sistema aberto, usado tradicionalmente, além da possibilidade de incidência de contaminação freqüente, ocorrem prejuízos financeiros e de atendimento ao cronograma das atividades decorrentes, chegando a determinar a contaminação de 40% das amostras

Tabela I. Distribuição do número e percentual de amostras semeadas em MHS segundo a presença de contaminação.

| AMOSTRAS | Nº | GRUPOS | | | |
|------------------|----|--------|----|-----|--|
| | | A | | B | |
| | | % | Nº | % | |
| Contaminadas | 7 | 35 | - | - | |
| Não contaminadas | 13 | 65 | 20 | 100 | |
| Total | 20 | 100 | 20 | 100 | |

$p=0,00416$

Tabela II. Distribuição do número e percentual de amostras semeadas em BHI segundo a presença de contaminação.

| AMOSTRAS | Nº | GRUPOS | | | |
|------------------|----|--------|----|-----|--|
| | | A | | B | |
| | | % | Nº | % | |
| Contaminadas | 8 | 40 | - | - | |
| Não contaminadas | 12 | 60 | 20 | 100 | |
| Total | 20 | 100 | 20 | 100 | |

$p=0,00163$

coletadas. No sistema fechado, que utiliza bolsa em PVC, não foi detectada contaminação, bastando a simples tricotomia e desinfecção da região onde foi efetuada a venopunção.

O aumento na qualidade do sangue obtido, aliado à

redução de custos, bem como à praticidade operacional, indica a vantagem da utilização do sistema fechado proporcionado pela bolsa de PVC na produção de insumos destinados a testes diagnósticos e pesquisas de interesse em Saúde Pública.

RIALA6/928

Barbosa; J. A. de R. et al. Evaluation of two systems for sheep blood collection used for preparing culture media. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 61(2):127-130, 2002.

ABSTRACT. Animal-origin hemoderived products are largely employed for culture media that account for laboratory practice of interest for Public Health. In order to evaluate the quality of this product, two systems of blood collection were tested, the traditional system that makes use of syringe, and a bag system made of atoxic polyvinyl chloride (PVC). Forty adult sheep, males and females, distributed at random in two groups of twenty animals each, were used. Blood used in this study was collected with asepsis, in a sterile environment, incubated at 37 °C for 24 hours, and then streaked out on Mueller Hinton blood agar plates and seeded in tubes with Brain Heart Infusion Broth (BHI). Our data showed that the PVC bags did not present any bacterial growth in the tested samples, indicating to be better than the traditional system.

KEY WORDS. PVC blood bag; defibrinated blood; sheep blood collection; contamination; hemoderivatives.

REFERÊNCIAS

1. Antunes G.S. Meios de Cultura. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS; 1998. p. 242-266.
2. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos na Experimentação Animal. [<http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm>] 03 março 2000.
3. Forney, J.E. Quality control of culture media. In: Lennette, E.H., editor. **Manual of Clinical Microbiology**. 4th ed. Washington: ASM Press; 1985. p.1037 – 1050.
4. Morton, D.B et al. Removal of blood from laboratory mammals and birds. **Lab. Anim.**, 27:1-22, 1993.
5. Moura, R.A. Meios de cultura. In: Moura, R.A., coord. **Técnicas de Laboratório**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p.169-179.
6. Nash, P.; Krenz, M.M. Culture media. In: Ballows, A., editor. **Manual of Clinical Microbiology**. 5th ed. Washington: ASM Press; 1991. p. 1226-1288.
7. Russell, W.M.S; Bush, R.L. **The Principles of Humane Experimentation Technique**. Special Edition. Potters Bar, UK: UFAW; 1992. 238 p.

Recebido em 02/09/2002; Aprovado em 05/12/2002