

Preparo e elaboração de meios de cultura – Ágar Sangue para Laboratórios de Análises Clínicas

Natacha Allgayer¹

Wagner de Aguiar Raupp¹

Vlademir Vicente Cantarelli²

¹Acadêmicos do curso de Biomedicina da Universidade Feevale.

²Farmacêutico bioquímico, doutor (PhD) em Ciências Farmacêuticas pelo Instituto de Doenças Microbianas (Biken) - Osaka University (2000) e Pós-doutorado pela mesma instituição (2004-2006). Atualmente é professor adjunto IV da Universidade Feevale. Também é consultor da American Society for Microbiology (ASM), atuando no Programa de Capacitação de Laboratórios de Microbiologia (LabCap). Contato: Wagner de Aguiar Raupp - raupp@feevale.br

Resumo

O cultivo e desenvolvimento de um micro-organismo particular só é possível se as suas necessidades são satisfeitas, através de uma mistura de nutrientes, colocadas em placas ou em tubos recebendo o nome de meio de cultivo. O objetivo central deste estudo foi avaliar aspectos relevantes no preparo e elaboração de meios de cultura, dando ênfase ao ágar sangue para laboratórios de análises clínicas. O presente estudo foi realizado através de um questionário e visitas aos laboratórios, no qual avaliamos como são preparados os meios de cultivos nos Laboratórios de Análises Clínicas do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul – Brasil. Observamos que 32% dos laboratórios utilizam meios comerciais já plaqueados. Nos 68% restantes, os meios são preparados no próprio laboratório *in house*, onde foram observadas diversas divergências no preparo e elaboração dos meios. Uma variedade de sangue de animais e sangue humano é utilizada para enriquecer os meios de cultura microbiológicos e para destacar características de crescimento, como hemólise. Muitos laboratórios ainda optam em usar sangue humano devido à dificuldade para obter o sangue de carneiro ou devido a razões financeiras, apesar das desvantagens relatadas por muitos pesquisadores.

Palavras-chave: meios de cultivo, ágar sangue, preparo, qualidade em diagnóstico.

Summary

To be able to culture microorganisms in vitro, it is necessary to provide all sorts of nutrients to support the microorganisms' growth, which is often provided as a mixture of nutrients, which ultimately will be poured into plates or tubes, then identified with the name of the culture media. The main objective of this study was to evaluate relevant aspects concerning media preparation; specially emphasizing the preparation of sheep blood agar used in the clinical microbiology laboratories. The present study consisted of a defined questionnaire and lab visits, during which the media preparation process by labs in the Vale dos Sinos Region, located in the Southernmost State of Brazil, was evaluated. Among the labs, 32% used ready-to-use commercially prepared media, while 68% still prepare the necessary media in the laboratory. Among these, different preparation procedures for the same medium were noted. A wide variety of animal and even human blood has been used to enrich blood agar medium and to observe hemolytic reactions on this medium. It is not rare to find microbiology labs that still use human blood into culture media due to difficulties in obtaining sheep blood, or due to costs related to the purchase of sheep blood, despite the fact that the use of human blood is no longer recommended by specialists.

Keywords: Culture media, blood agar, media preparation, quality of diagnosis.

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 (1,2).

O enriquecimento de meios de cultura como ágar sangue e ágar chocolate é frequentemente obtido através da adição de sangue desfibrinado de carneiro (3). 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 micro-

organismos, e os métodos utilizados para processamento do sangue durante a elaboração do produto (4).

Atualmente o ágar sangue humano está sendo amplamente utilizado como aditivo dos meios de cultivo nos países em desenvolvimento para o isolamento de bactérias de amostras clínicas, devido à acessibilidade e ao preço mais barato. Apesar da obtenção do sangue de carneiro exigir cuidados, esse normalmente é realizado por empresas especializadas, por outro lado, o uso de ágar sangue humano, segundo muitos pesquisadores, apresenta diversas desvantagens em seu uso, como: variação na produção de hemólise, devido à idade e composição dos glóbulos vermelhos presentes, resultando em erros de identificação; zonas de maior inibição nos testes de sensibilidade; a falta de morfologia colonial característica; presença de ácido cítrico como anticoagulante, antibióticos, anticorpos, ou outros agentes anti-infecciosos inibem o crescimento desejado das bactérias; além de representar risco biológico à saúde dos profissionais que trabalham nos laboratórios (5).

Devido ao custo e a dificuldade de conseguir o sangue de carneiro, há necessidade de desenvolver uma técnica alternativa para melhorar a utilização desse sangue como agente de enriquecimento. Uma alternativa seria a lavagem do sangue humano com solução fisiológica. É provável que lavar o sangue remova globulinas livres de soro (6). Além disso, o citrato, anticoagulante que interfere no crescimento de bactérias (5), é igualmente removido, resultando em um maior rendimento microbiano em todas as placas que usam sangue lavado.

Sangue fresco lavado humano produz uma beta hemólise parcial devido à remoção de interferentes, mas dificilmente pode mostrar hemólise beta total devido aos altos níveis de ATP que deixam a sobrevivência das células vermelhas do sangue mais elevadas.

No estudo de *Russell et al* (2006) foi visto que a incubação anaeróbica permite um maior número de isolados de *Streptococcus* beta hemolítico em ágar sangue humano e em ágar sangue de carneiro. Este provavelmente relacionado com a produção de estreptolisina O, que tem sua ação na ausência de oxigênio, o que aumentaria a hemólise de *Streptococcus*. Também determinou que a incubação por 48 horas permite um maior número de isolados em ambos os meios.

Há variações no uso de sangue animal para a preparação de ágar sangue, por exemplo para o isolamento de *Haemophilus influenzae* o sangue preferido é o de cavalo que não tem nenhum efeito inibitório sobre esta bactéria e é uma rica fonte de fator de crescimento X. É aconselhável o sangue humano para o isolamento e identificação de *Gardnerella vaginalis*, que é hemolítica no sangue humano, mas não em ágar sangue de animais (7). Sangue de carneiro desfibrinado, cavalo, porco ou de cabra são recomendados para o isolamento de *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Notando que, para o isolamento de um micro-organismo específico é necessário considerar que este pode ter afinidade para um determinado fluido biológico permitindo seu melhor desenvolvimento.

Metodologia

A pesquisa ocorreu no primeiro semestre de 2012, sendo realizada em 13 cidades do Rio Grande do Sul, Brasil. Estas cidades pertencem à Região do Vale do Rio dos Sinos. Os laboratórios que estão localizados nesta região foram identificados através da base de dados do DATASUS. Todos os laboratórios com cadastro no DATASUS foram visitados e cerca de 70% destes participaram da pesquisa, o que é estatisticamente significativo. Foi estabelecido que a participação seria voluntária e que as respostas teriam garantia de sigilo. Os laboratórios que participaram receberam informações e esclarecimentos sobre a pesquisa e concordaram em assinar o termo de autorização para divulgação dos dados. A obtenção dos dados ocorreu através de questionário estruturado. E após a coleta, os dados foram submetidos à análise estatística.

Resultados

Participaram da pesquisa 22 laboratórios. Destes, 32% (n=7) utilizam meios comerciais já plaqueados. Nos demais, 68% (n=15), os meios são preparados dentro do próprio laboratório, *in house*. Aos laboratórios que preparam os meios, foi questionado sobre a formação do profissional responsável, pelo preparo e elaboração dos meios, onde foi obtido o seguinte resultado: em 54% (n=8) dos laboratórios, o profissional responsável possui nível superior; os 46% (n=7) restantes responderam que esta atividade é desenvolvida por um auxiliar de laboratório. Também foi questionado aos laboratórios que preparam seus meios de cultura, sobre a origem do sangue utilizado no meio de ágar sangue, onde foi obtido o seguinte

resultado: 40% (n=6) relataram utilizar sangue humano, coletado para este fim, no dia do preparo do meio; 33,3% (n=5) não responderam; 13,3% (n=2) relataram utilizar sangue total, obtido de fonte comercial e 13,3% (n=2) não especificaram a origem do sangue utilizado no preparo dos meios de ágar sangue.

Discussão

Observamos que muitos laboratórios utilizam sangue humano no preparo e elaboração dos meios. Se levarmos em consideração que esta prática não vai ao encontro do estabelecido e recomendado pelas bibliografias, podemos destacar alguns fatores de relevância ao caso.

Um dos fatores que merece destaque é a questão dos custos. A utilização de sangue humano não gera uma redução significativa nos custos, além de ter todos os custos da coleta e gerar resíduo perfuro-cortante, que por si só já está associada a questões ambientais e de biossegurança. Ainda existem os custos subjetivos, que são os inerentes à qualidade e normas técnicas, afinal qualquer conduta que não siga as normas e padrões estabelecidos por protocolos e bibliografias especializadas colocam em dúvida a qualidade do serviço. Pode-se ainda destacar que caso o laboratório seja envolvido em uma ação judicial onde haja confronto de resultados entre laboratórios a não utilização de técnicas e protocolos consagrados pode se tornar um fator desfavorável e agravante ao laboratório.

Desta forma, com base nos resultados obtidos, concluímos que a utilização do sangue de carneiro como aditivo e fonte de enriquecimento dos meios de cultivo não recebe a devida importância apresentada pelas bibliografias e preconizada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através de seu manual de "Descrição dos meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos - Módulo IV".

Referências Bibliográficas

1. Antunes GS. 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. Moura RA. Meios de cultura. In: Moura, R.A., coord. Técnicas de Laboratório. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p.169-179.
4. Nash P, Krenz MM. Culture media. In: Ballows, A. Manual of Clinical Microbiology. 5 ed. Washington: ASM Press; 1991. p.1226-1288.
5. Russell FM et al. As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Agar Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 3346–3351, set. 2006.
6. Satzke C et al. Comparison of Citrated Human Blood, Citrated Sheep Blood, and Defibrinated Sheep Blood Mueller-Hinton Agar Preparations for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 3770-3772, out. 2010.
7. ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica – Módulo IV e V. Brasília: ANVISA, 2004.