

DISPOSITIVO PARA COLETA ASSEPTICA DE SANGUE PARA MEIOS DE CULTURA

D. Saraiva (*)

Os meios enriquecidos, com sôro ou mesmo com sangue integral, contam-se como os mais valiosos em Microbiologia. O ágar sangue é de uso praticamente universal dado ao fato de quase todos os germes nêle crescerem. Muitas vezes nêle produzem alterações, macroscópicamente visíveis, que possibilitam um diagnóstico presuntivo sobre a espécie bacteriana cultivada.

Em nossa atividade profissional temos observado as dificuldades encontradas no preparo do ágar-sangue, especialmente quanto à coleta do sangue a êle destinado. Vimos casos em que 50% das placas não puderam ser utilizadas, por estarem contaminadas.

Na maioria das vezes, as contaminações processam-se por ocasião da coleta do sangue. Em parte, as dificuldades radicam-se na técnica defeituosa por ocasião da sangria mas também derivam da aparelhagem usada nesse trabalho.

Os autores de técnicas de laboratório também não são muito explícitos quanto à técnica de coleta de sangue. Assim, Kolmer (7) sugere o uso de agulha forte de 2 polegadas de comprimento a que um pedaço curto de borracha pode ser ligado à mesma e o sangue é coletado num frasco ou vaso, onde é desfibrinado com pérolas de vidro.

Gradwohl (5) dá a técnica da coleta de sangue de coelho que é feita por seringa esterilizada no forno a 170° C por 2 horas. A região é previamente preparada por raspagem a navalha e a desinfecção feita com tintura de iodo. Para obter sangue de ovino, recomenda frasco de boca larga e a coleta é feita no matadouro, por ocasião do abate.

Wadsworth (9) recomenda agulha de 3,5 cm unida por um tubo de borracha, a um frasco onde deverá ser desfibrinado o sangue colhido. Não dá mais pormenores.

(*) Professor Titular, da Disciplina de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos de Curso de Veterinária da UFSM. Bolista do Conselho Nacional de Pesquisas.

Bray (2), ao descrever o preparo do ágar-sangue, indica apenas a adição de sangue estéril ao ágar fundido, sem mais pormenores.

Hauduroy (6) refere a sangria em coelho por meio de agulha e extração, provavelmente, por seringa (Não é declarado).

Névot (8) descreve a coleta do sangue em balão, com substâncias anticoagulantes ou pérolas de vidro mas não dá mais informações.

Bier (1) indica, para o coelho, a punção cardíaca (provavelmente com seringa e agulha). Quanto ao carneiro, refere a punção da jugular com agulha de diâmetro adequado e a coleta do sangue em frasco com pérolas de vidro ou citrato (Solução de Alsever), não dando mais pormenores.

Cassagne (4) refere a obtenção do sangue de cavalo por punção venosa e coleta em frasco estéril, já contendo, como anticoagulante, 1 ml. de citrato de sódio a 20% para 50 ml. de sangue. Não dá mais informes.

Carter (3) descreve a técnica da coleta com aparelhagem semelhante à usada nos bancos de sangue. Sobre a jugular do animal é preparado um campo, convenientemente desinfetado com tintura de iodo e aí é feita a punção.

Na maioria dos laboratórios, a coleta é feita com seringa grande e agulha adequada à espécie animal as quais são esterilizadas por ebulição, tal como é feito para a aplicação de injeções, com maior ou menor sucesso.

Em laboratórios biológicos, em cujo corpo técnico o veterinário é um dos componentes, é geralmente dada a este a tarefa de obtenção de sangue ou sôros assépticos para enriquecimento dos meios de cultura.

Já temos sido consultados muitas vezes, por jovens colegas que se encontravam embaraçados quanto à maneira de obter sangue de maneira absolutamente estéril. Por esta razão, decidimos relatar um método que usamos com sucesso há mais de 6 anos, em quase uma centena de coletas.

Embora o uso durante esse tempo já tenha sancionado o método, decidimos submeter o mesmo a um estudo experimental para que pudessemos recomendar seu emprego.

Para esse fim, de um ano para cá, o sangue por nos coletado foi submetido a uma série de provas que serão indicadas mais adeante.

MATERIAL E MÉTODOS

O dispositivo é constituído por um frasco de 250 ml. contendo pérolas de vidro (ou pedaços de bastão de vidro cortados com 1-2 cm de comprimento por 2-3 mm de diâmetro). Quaisquer frascos servem para isso: Erlenmeyers, balões de fundo chato, frascos utilizados em transfusões de sangue nos hospitais, frascos vazios de soluções injetáveis de glicose, sôro fisiológico, etc.

O frasco é fechado por uma rôlha de borracha com dois orifícios, por onde passam dois pequenos sifões de vidro. Um dos sifões é fechado com algodão não absorvente e o outro é continuado exteriormente por um tubo de borracha, de 25-30 cm de comprimento, terminado por uma agulha 45/12. A agulha é protegida por um tubo de ensaio, fechado por rôlha de algodão. O desenho da Figura 1 mostra o conjunto montado e esclarece melhor o que foi dito anteriormente.

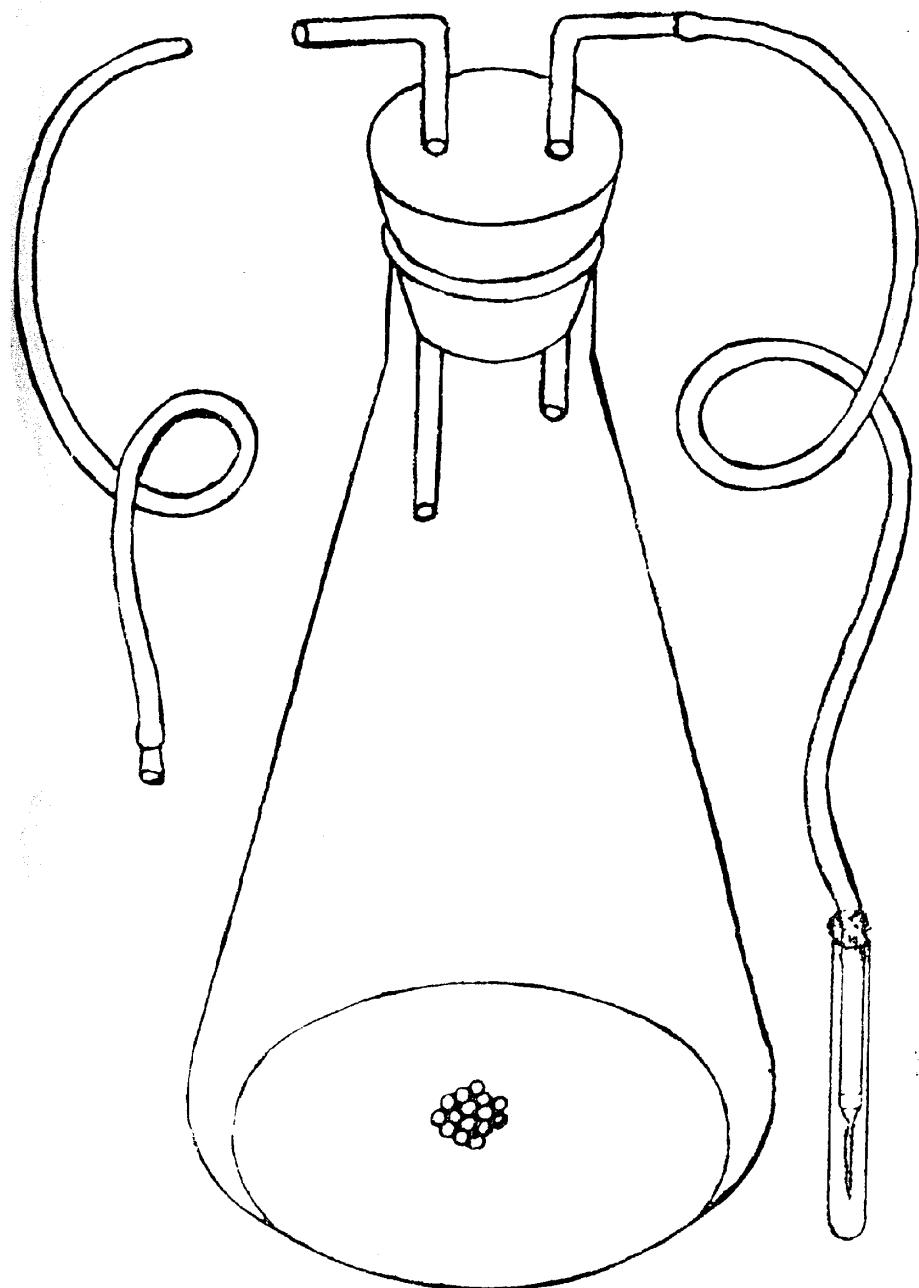
O conjunto, já montado, é esterilizado em autoclave ou panela de pressão durante 20 minutos a 116-120°C, tendo-se previamente fechado o espaço, entre a rôlha de borracha e o frasco, com uma tira de esparadrapo de 2 cm de largura. Visa esta precaução evitar a penetração de poeiras nesse espaço.

Após o preparo de um campo, sobre a região cervical média do animal a ser sangrado, sobre a jugular, mediante corte dos pelos ou lã, rente à pele, procede-se à desinfecção com álcool iodado.

Para a sangria, retira-se a agulha do tubo e insere-se a mesma na jugular. Faz-se sucção por meio de um tubo de borracha, com boquilha de vidro, aplicado sobre o outro sifão que está obturado com algodão. (Fig. 1). Com isso, o sangue fluirá imediatamente no frasco coletor e irá sendo desfibrinado mediante rotação moderada e circular, mantida durante 10 minutos.

Antes de se retirar a agulha da veia, o tubo de borracha que conduz o sangue é amarrado, de forma a interromper o fluxo de sangue e impedir a entrada de ar no frasco coletor.

Ao chegar ao laboratório, retira-se a rôlha de borracha com os sifões e substitui-se, após flambagem, por rôlha de algodão retirada de outro frasco com boca de igual diâmetro, previamente esterilizado, coberta com capuchon de papel, e estoca-se em refrigerador, após anotar-se a data da coleta no próprio frasco.



Na série experimental, o sangue foi coletado exatamente como foi descrito. As retiradas de sangue foram feitas como de costume, para preparo de meios, obtenção de sôro, etc. Com determinados intervalos, foram retiradas amostras para exames bacteriológicos.

Os testes bacteriológicos foram feitos em agar simples e meio de Robertson, semeando-se aproximadamente 0,01 ml. e 0,2 ml. respectivamente.

Além dos testes bacteriológicos, também o sangue coletado foi submetido a provas organolépticas, tais como pesquisa de odores anormais, etc.

Para a obtenção de sôro, removia-se a quantidade adequada de sangue desfibrinado para tubos de centrífuga estéreis e centrifugava-se. O sobrenadante (sôro) era retirado por meio de pipeta estéril a cuja extremidade superior se adaptava um tubo de borracha de 50 cm de comprimento com boquilha de vidro, tal como o usado para fazer a aspiração do ar durante a sangria. O sôro era aquecido a 57°C durante 30 minutos para inativação.

Tôdas as amostras de sangue bem como o sôro eram estocadas em refrigerador, a 4° C.

As sangrias foram feitas em ambiente confinado, ao ar livre, em locais poeirentos e, em muitas ocasiões, com forte vento.

RESULTADOS

Os resultados dos testes encontram-se representados na Tabela I.

Verifica-se, pelo exame da Tabela I, que numa série experimental de 18 coletas apenas uma mostrou-se contaminada, isso mesmo já no 2.º teste bacteriológico, quando, por diversas vezes, o frasco já tinha sido aberto para retiradas de sangue.

Embora não tenha sido figurado na Tabela, para não aumentar o espaço, a pesquisa de odor anormal no sangue estocado foi sempre negativa.

O germe responsável pela contaminação do único frasco era do gênero *Aerobacter*.

TABELA I

Mater- ial N.º	Data da coleta	1.º Teste bacterio- lógico		2.º Teste bacterio- lógico	
		Data	Resultado	Data	Resultado
1	5. 6.1969	24.10.1969	Estéril	N. E.	
2	27. 6.1969	24.10.1969	"	N. E.	
3	5. 8.1969	24.10.1969	"	N. E.	
4	22. 8.1969	24.10.1969	"	N. E.	
5	8. 9.1969	24.10.1969	"	31. 1.1970	Estéril
6	24. 9.1969	24.10.1969	"	31. 1.1970	Estéril
7	24.10.1969	31. 1.1970	"	N. E.	
8	21.11.1969	31. 1.1970	"	N. E.	
9	21.12.1969	31. 1.1970	"	N. E.	
10	9. 1.1970	31. 1.1970	"	17.10.1970	Estéril
11	23. 1.1970	30. 3.1970	"	N. E.	
12	3. 3.1970	30. 3.1970	"	N. E.	
13	16. 4.1970	10. 6.1970	"	17.10.1970	Estéril
14	8. 5.1970	10. 6.1970	"	17.10.1970	Estéril
15	28. 5.1970	10. 6.1970	"	17.10.1970	Contaminado
16	8. 8.1970	17.10.1970	"	N. E.	
17	31. 8.1970	17.10.1970	"	N. E.	
18	21. 9.1970	17.10.1970	"	N. E.	

N. E. = Não efetuado.

Sôro de equino, obtido por êste método, acha-se em uso desde a coleta, efetuada em Dezembro de 1969, continuando estéril apesar de não ter sido filtrado em placas esterilizantes.

DISCUSSÃO

O dispositivo aqui apresentado permite obter, com regularidade, sangue asséptico para qualquer fim bacteriológico.

Para os mesmos fins, a maioria dos laboratórios utiliza extração por meio de agulha montada em seringa, esterilizadas por ebulação.

A simples ebulação não permite a destruição de esporos especialmente quando efetuada durante alguns minutos. Ora, em muitas ocasiões o ágar-sangue destina-se à cultura de germes anaeróbios, especialmente dos Clostrídios, donde a exigência de placas impecáveis quanto à esterilidade. A contaminação por aeróbios não seria tão danosa, já que seriam afastadas as placas contaminadas por ocasião da semeadura. O mesmo já não sucede com os anaeróbios que exigem placas recentemente preparadas, para evitar a absorção de oxigênio que impediria seu desenvolvimento.

Extração com seringas exige que estas tenham 50 a 100 ml. de capacidade. Além de dispendiosas, ocorre frequentemente a penetração de bôlhas de ar, por entre o êmbolo e o cilindro, que podem levar poeiras e germes, já que nem sempre se pode efetuar a sangria em local adequado. Também por entre o adaptador e a agulha, por vezes, há penetração de bôlhas de ar, com os mesmos inconvenientes.

De todos os métodos constantes da revisão bibliográfica, o de Carter (3) é o que nos parece melhor, pois utiliza exatamente a técnica empregada na coleta de sangue para transfusões. Nosso método ainda é superior porque dispensa o gasto de um conjunto de transfusão em cada coleta de sangue. Tem, ainda, a vantagem de podermos extrair a quantidade de sangue que quizermos, pois não ficaremos limitados à quantidade de anticoagulante contida no conjunto de transfusão.

Finalmente, queremos consignar aqui que o método descrito não apresenta total originalidade. Ele vem a ser uma adaptação, às condições da prática, de método usado nas coletas de sangue para transfusão.

CONCLUSÕES

O conjunto aqui proposto apresenta diversas vantagens:

- 1 — É facilmente construído com materiais existentes em qualquer laboratório.
- 2 — O sangue percorre um circuito totalmente fechado, desde o vaso do animal até o interior do frasco.
- 3 — Associa o uso de vácuo moderado, regulável à vontade, para acelerar a coleta.
- 4 — Dispensa o uso de grandes e dispendiosas seringas que nem sempre proporcionam coleta de sangue assépticas, pelos motivos já apontados.
- 5 — Pode ser esterilizado já montado em autoclave ou panela de pressão.
- 6 — Permite regular-se, à vontade, a quantidade de sangue a ser colhida.
- 7 — Usado numa série de 18 sangrias experimentais, proporcionou sangue estéril em todas elas, confirmando os ótimos resultados obtidos com seus emprêgo na rotina há 6 anos.
- 8 — Possibilita que a sangria seja feita nas piores condições ambientais, já que o vento, poeiras, etc. não levam à contaminação do sangue coletado.
- 9 — Desde que as manipulações posteriores com o sangue colhido sejam feitas como técnica bacteriológica razoável, é possível obter-se sôro estéril, dispensando filtração em placas esterilizantes.

RESUMO

O autor descreve um conjunto para obtenção de sangue estéril para enriquecimento de meios de cultura, que está em uso em seu laboratório há 6 anos.

Empregado em uma série de 18 sangrias experimentais, proporcionou sangue estéril em todas elas, confirmando os ótimos resultados obtidos de seu uso na rotina laboratorial.

SUMMARY

A method to bleeding animals to get blood for media enrichment is described. It is in use with success in the author's laboratory since 6 years.

Tried in 18 experimental bleedings, the method afforded sterile blood in each opportunity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, Otto — **Bacteriologia e Imunologia**, 12^a. edição, São Paulo, Edições Melhoramentos, 1965.
2. BRAY, W.E. — **Synopsis of Clinical Laboratory Methods**, 3^a. edição, St. Louis, The C.V. Mosby Company, 1946.
3. CARTER, G.R. — **Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology**, Springfield, Charles C. Thomas, 1967.
4. CASSAGNE, H. — **Milieux de culture**, 2^a. edição, St-Mandé, Editions de La Tourelle, 1966.
5. GRADWOHL, R.B.H. — **Clinical Laboratory Methods and Diagnosis**, 4^a. edição, St. Louis, the C.V. Mosby Company, 1948.
6. HAUDUROY, Paul — **Microbiologie Générale et Technique Microbiologique**, Paris, Masson & Cie, 1947.
7. KOLMER, John A., SPAULDING, Earle H. e ROBINSON, Howard W. — **Approved Laboratory Technic**, 5^a. edição, Nova York, Appleton-Century Crofts, Inc., 1951.
8. NÉVOT, A. — **Le Diagnostic Bactériologique en Pratique Médicale**, 2^a. edição, Paris, Masson et Cié, 1958.
9. WADSWORTH, Augustus B. — **Métodos Standard de la División de Laboratorios e Investigación del Departamento de Sanidad del Estado de Nueva York**. Tradução espanhola da 2^a. edição inglesa pelo Dr. Carlos Soler Dopff, Buenos Aires, Editorial Labor S.A. Argentina, 1943.