AVALIAÇÃO DO USO DE ÁGAR SANGUE HUMANO PARA O CRESCIMENTO DE *STREPTOCOCCUS PYOGENES* E ENTEROCOCCUS FAECALIS

Carla Ferreira Miguel[1]; Christiane Curi Pereira[2]

[1]Centro Universitário Salesiano - Unisales; [2]Centro Universitário Salesiano - Unisales.

Palavras-chave: Sangue de Carneiro. Meio de Cultura. Hemólise. Diagnóstico microbiológico. Ágar Sangue Humano.

INTRODUÇÃO

Um dos principais procedimentos em laboratórios de microbiologia é a utilização de meios de cultura para o crescimento de microrganismos com o propósito de identificação e diagnóstico. Um dos meios de cultura mais utilizados em laboratórios de diagnóstico é o ágar sangue, sendo um meio não seletivo enriquecido com sangue, podendo ser derivado de carneiro, cavalo ou coelho (Murray et al., 2020).

Alternativas científicas que substituem o uso de animais em experimentos podem fornecer resultados relevantes e cientificamente válidos, tendo potencial de reduzir ou até eliminar a necessidade de sangue animal, levando em consideração a preservação animal como fator importante (Guimarães et al., 2016).

Ademais, também é válido ressaltar os altos custos e a dificuldade da acessibilidade de um laboratório de análises e microbiologia clínica que fazem o uso do sangue de animais para produção de meios de cultura. Assim, a pesquisa da substituição do sangue de carneiro por sangue humano prevê praticidade e economia para os laboratórios, buscando eficiência e resultados iguais ou semelhantes aos conseguidos com o uso do sangue animal nos meios de cultura (Leal et al., 2006).

Dessa forma, o projeto teve como objetivo geral avaliar a substituição do sangue de carneiro por sangue humano no preparo do ágar sangue. Além disso, pretendeu-se observar o crescimento do *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis* e suas respectivas hemólises, comparando-se com o padrão ouro, ágar sangue de carneiro e testar nos sangues humanos do tipo O e A, fator Rh positivo.

METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada nos laboratórios do Centro Universitário Salesiano – Unisales, em Vitória – ES. Para fins de autorização de coleta de sangue em doadores voluntários humanos, o projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa (CEP) e aprovado. Os doadores foram selecionados e entravam para o estudo somente após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os sangues humanos testados foram os tipos A e O, com fator Rh positivo, por serem os mais comuns e frequentemente encontrados no Brasil, o que facilitaria seu uso na rotina clínica (Santos et al., 2017). O sangue humano foi coletado em tubo com anticoagulante citrato de sódio.

Para fins de comparação, utilizou-se como padrão ouro o Ágar Columbia sangue de carneiro industrializado. A produção do meio de cultura no laboratório com sangue humano seguiu as recomendações do manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2004) e era realizado logo após a punção venosa, enriquecendo o ágar Columbia Agar Base com 5% de sangue humano citrato.

As cepas bacterianas utilizadas para o semeio e verificação de crescimento e hemólise foram *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecali*s. Essas espécies foram escolhidas visto que causam diferentes hemólises em meio de cultura ágar sangue. Após a separação das cepas para os testes, foram realizados inóculos com suspensões bacterianas no meio caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), e então incubados por 24 horas a 37°C. Após a realização das semeaduras nos ágar, as placas foram incubadas em estufa a 37°C.

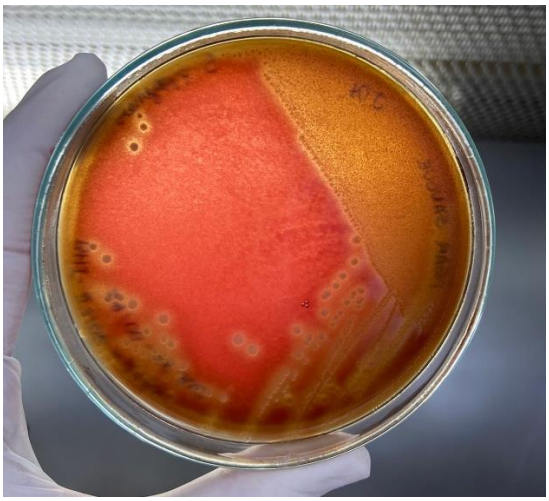
Foi analisado o crescimento de cada cepa, aspecto das colônias e os tipos de hemólises causadas nos meios de cultura com sangue de carneiro e sangue humano após o tempo de incubação de cada uma, conforme o Manual da ANVISA (2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Streptococcus pyogenes* atingiu bom crescimento nos três diferentes sangues, porém foi observado que o tempo de incubação no ágar com sangue

humano necessário para visualização de colônias é maior, e os resultados melhores foram obtidos em 48 horas. As colônias analisadas nos testes em sangue humano e no ágar com sangue de carneiro possuíam as mesmas características morfológicas, sendo colônias com formatos circulares e de pequeno diâmetro, com superfície lisa e brilhosa, com consistência cremosa. Como esperado e característico desta espécie, foram observadas beta-hemólises em todos os sangues (Figura 1, 2 e 3).

Figura 1: *S. pyogenes* em ágar sangue humano tipo O+ (48 horas de incubação).



Fonte: Própria, 2023.

Figura 2: *S. pyogenes* em ágar sangue de carneiro (48 horas de incubação).



Fonte: Própria, 2023.

Figura 3: *S. pyogenes* em ágar sangue humano tipo A+ (48 horas de incubação).



Fonte: Própria, 2023.

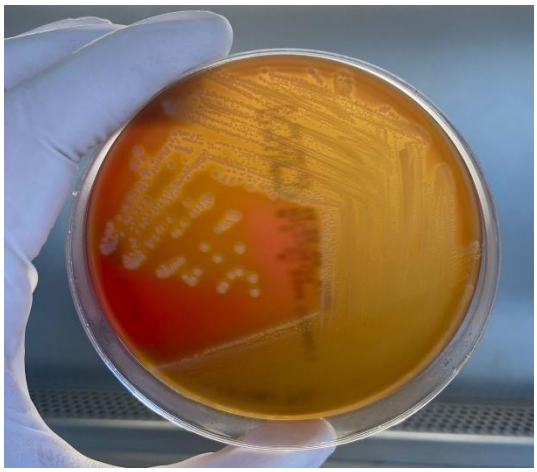
A espécie *Enterococcus faecalis* conseguiu atingir um bom crescimento de numerosas colônias nos três diferentes sangues. Contudo, em relação ao tempo de incubação, o sangue humano necessitou de 48 horas para apresentar uma hemólise considerável para um bom diagnóstico. As colônias analisadas nos três sangues foram brilhosas e de pequeno diâmetro, bem arredondadas e cremosas. Um fato importante observado é relativo às hemólises que foram diferentes, sendo alfa-hemólise no sangue de carneiro e beta-hemólise no sangue humano (Figura 4, 5 e 6).

Figura 4*: E. faecalis* em ágar sangue humano tipo O+ (48 horas de incubação).



Fonte: Própria, 2023.

Figura 5: *E. faecalis* em ágar sangue de carneiro (24 horas de incubação).



Fonte: Própria, 2023.

Figura 6: *E. faecalis* em ágar sangue humano tipo A+ (48 horas de incubação).



Fonte: Própria, 2023.

Para o *Enterococcus faecalis* a hemólise diferenciada no sangue humano já é citada na literatura, apresentando-se com alfa-hemólise ou sem hemólise em sangue de carneiro, e beta-hemólise quando usado o sangue humano, sangue de cavalo ou de coelho (Trabulsi & Alterthum, 2008). Desse modo, os resultados da pesquisa em questão comprovam e confirmam os estudos passados sobre o crescimento dessa espécie.

Analisando os resultados apresentados, é possível sugerir que o uso do ágar sangue suplementado com sangue humano citrato pode ser uma alternativa utilizada no diagnóstico clínico das bactérias *S. pyogenes e E. faecalis.* Isso porque são bactérias

mais simples e de fácil crescimento, sendo observada uma fácil adequação aos meios de cultura, com demonstração de hemólises nos ágares sangues testados.

Na presente avaliação, foi utilizado o sangue humano venoso coletado em tubo contendo o citrato como anticoagulante, porém, em outras publicações da literatura com o mesmo intuito da validação do ágar sangue humano, observa-se que normalmente são usadas bolsas de sangue para o teste (Russell et al., 2006). Ainda assim, acredita-se que os resultados podem ser comparados, visto que para a conservação do sangue, o citrato de sódio serve como anticoagulante em bolsas de sangue, assim como nos tubos utilizados.

Analisando-se o tempo de crescimento, fator crucial em diagnósticos clínicos e liberação de resultados, muitas bactérias necessitaram de um tempo maior de incubação para a uma hemólise mais visível no sangue humano testado e acredita-se que esta possa ser uma desvantagem para laboratórios de diagnóstico. Uma possível justificativa é devido às diferenças de constituição dos sangues dos ovinos (carneiro e ovelha) e do sangue dos seres humanos.

Com o observado, sugere-se que novas pesquisas são necessárias e importantes, testando-se outros tipos de sangue humano e outras bactérias que na rotina clínica necessitam de ágar sangue de carneiro para seu crescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com isso, o presente estudo mostra que para algumas bactérias, é possível o uso futuro de ágar produzido com sangue humano, para crescimento e observação de hemólise, sendo necessários estudos complementares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. 1 ed. Brasília. 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf.

GUIMARÃES, M. V., FREIRE, J. E. DA C. & MENEZES, L. M. B. DE. 2016. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. Rev. Bioét. 24 (2). Doi: 10.1590/1983-80422016242121.

LEAL, E. A., TEIXEIRA, A. P. P., DOS SANTOS, M. E. & MESSAGE, V. F. 2006. Mensuração e avaliação de custos nos laboratórios de análise clínica. ABC Disponível em: https://anaiscbc.emnuvens.com.br/anais/article/view/1690.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S. & PFALLER, M. A. 2020. Microbiologia Médica. 8 ed. Rio de Janeiro: GEN. p. 19.

RUSSELL, F. M. 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. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3346-3351. doi:10.1128/JCM.02631-05.

SANTOS, R. F. ET AL. 2017. Frequência da classificação sanguínea na unidade de coleta e transfusão "Dr. Marcio Curvo de Lima" polo de Rondonópolis, Mato Grosso em 2015. Revista Biodiversidade. v. 16 n. 3. Disponível em: https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/6018.

TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. 2008. Microbiologia. 5 ed. São Paulo: Atheneu. p. 215.

YEH, E., PINSKY, B.A., BANAEI, N. & BARON E.J. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. PLoS One. 4(7): e6141. 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0006141.