The background of the cover is a light blue color, populated with various scientific illustrations. There are several petri dishes, some containing a green agar surface with small white spots. Numerous test tubes are scattered throughout, many containing a red liquid. Various shapes representing microorganisms are also present, including purple spheres, red rods, and purple elongated structures. The overall theme is microbiology and laboratory work.

Guia para Escolha do Método de Conservação de Cepas Microbianas

 **Unichristus**
Centro Universitário Christus

Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Alessandra Jespersen de Athayde Rocha
Danielle Oliveira Costa de Souza
David Dias Roque

**Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira
Alessandra Jespersen de Athayde Rocha
Danielle Oliveira Costa de Souza
David Dias Roque**

Guia para Escolha do Método de Conservação de Cepas Microbianas



**Fortaleza
2023**

Guia para escolha do método de conservação de cepas microbianas © 2023 by
Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, Alessandra Jespersen de Athayde Rocha,
Danielle Oliveira Costa de Souza e David Dias Roque

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

Editora do Centro Universitário Christus

R. João Adolfo Gurgel, 133 – Cocó – Fortaleza – Ceará

CEP: 60190 – 180 – Tel.: (85) 3265-8100 (Diretoria)

Internet: <https://unichristus.edu.br/editora/>

E-mail: editora01@unichristus.edu.br

Editora filiada à



Associação Brasileira
das Editoras Universitárias

Programação Visual e Editoração Gráfica

Jefferson Silva Ferreira Mesquita

Carine dos Santos Silva - Bibliotecária - CRB 3/1673 – CRB 3/1727

G943 Guia para escolha do método de conservação de cepas microbianas [recurso eletrônico] / Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira... [et al.]. – Fortaleza: EdUnichristus, 2023.

46 p.: il.

1.04 MB; Ebook PDF.

1. Microorganismos. 2. Cepas Microbianas. 3. Metodos de Preservação. 4. Bandeira, Tereza de Jesus Pinheiro Gomes. I. Título.

CDD 579.1

CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS

Reitor

José Lima de Carvalho Rocha

EdUnichristus

Diretor Executivo

Estevão Lima de Carvalho Rocha

Conselho Editorial

Carla Monique Lopes Mourão

Edson Lopes da Ponte

Elnivan Moreira de Souza

Fayga Silveira Bedê

Francisco Artur Forte Oliveira

César Bündchen Zaccaro de Oliveira

Marcos Kubrusly

Régis Barroso Silva

AUTORES E ORGANIZADORES

TEREZA DE JESUS PINHEIRO GOMES BANDEIRA

Médica formada pela Universidade Federal do Ceará - UFC (1975), mestra em Saúde Pública pela UFC (2002), especialista em Patologia Clínica pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica - SBPC (2004) e doutora em Microbiologia pela UFC (2011). Atualmente é professora e membro do Núcleo Docente Estruturante (NDE) do Curso de Medicina do Centro Universitário Christus - UNICRISTUS e pesquisadora do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará - UFC. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Microbiologia Clínica e Infecção Hospitalar. Participou do Curso de Formação Gerencial e Pedagógica para Professores da UNICRISTUS - Universidade de São Paulo, USP (2020), do Curso de Formação Gerencial e Pedagógica para Professores UNICRISTUS, CEDEM, USP em 2020. Foi Coordenadora do Curso de Medicina do Centro Universitário Christus UNICRISTUS, no período de 2015 a 2018. ID Lattes: 8954554314307570; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1098-938>.

ALESSANDRA JESPERSEN DE ATHAYDE ROCHA

Aluna do Curso de Medicina do Centro Universitário Christus – UNICRISTUS

DANIELLE OLIVEIRA COSTA DE SOUZA

Aluna do Curso de Medicina do Centro Universitário Christus – UNICRISTUS

DAVID DIAS ROQUE

Aluna do Curso de Medicina do Centro Universitário Christus – UNICRISTUS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA - VISÃO GERAL DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO	10
3. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE CURTO PRAZO	13
3.1 Transferência direta para subcultura (subcultura periódica)	13
Meios para manutenção	14
Condições de armazenamento	14
Frequência de Transferência	15
Procedimentos de Controle de Qualidade	15
4. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE MÉDIO PRAZO	16
4.1 Imersão em óleo.....	16
Considerações gerais	16
Preparo	17
4.2 Congelamento a -20°C.....	18
Considerações gerais	18
Meios de cultura	18
4.3 Armazenamento em água destilada	19
Considerações gerais	19
Aplicação	19
5. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE LONGO PRAZO	20
5.1 Congelamento à temperatura ultrabaixa	21
Frascos de armazenamento	21
Agentes crioprotetores	22
Preparação de Microrganismos para Congelamento.....	24
Criopreservação	25
Descongelação	25
5.2 Liofilização	26
Frascos de armazenamento.....	27
Agentes crioprotetores	28
Preparação de Microrganismos para Liofilização	28
Métodos de liofilização	28
Armazenagem.....	29
6. TECNOLOGIAS MAIS RECENTES	30
7. REFERÊNCIAS	31
8. ANEXO 1.....	35
Procedimento Operacional Padrão (POP) para Preservação e Estocagem de Cepas Microbianas.....	35

PREFÁCIO DOS ALUNOS

O estudo dos seres microscópicos, de suas formas de organização molecular, bem como de suas interações com os demais organismos teve seu início no século XVII com a participação importante do alemão Antony Van Leeuwenhoek, criador do primeiro microscópio. Por meio de suas observações do que foi visualizado e que veio a chamar de “animálculos”, Leeuwenhoek deu início ao descobrimento de todo este mundo invisível até então aos olhos da humanidade. Depois dele, com a contribuição de outros grandes nomes como Louis Pasteur, Joseph Lister e Robert Koch (que, em seu segundo postulado, já defendia o registro do patógeno após seu isolamento em meio de cultura), a microbiologia como a conhecemos hoje foi sendo construída. Hoje sabemos da importância dos seres unicelulares e da interação patógeno-hospedeiro para o desenvolvimento das mais diversas doenças infectocontagiosas no organismo humano. Além disso, conhecemos, também, a importância de tais formas de vida para a pesquisa, realização de processos industriais, confecção de vacinas e para o desenvolvimento de organismos transgênicos, por exemplo.

Assim, durante o programa de monitoria em microbiologia, orientados por nossa professora Dra. Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, percebemos que é de suma importância conhecer os processos de cultivo e manutenção de cepas existentes e notamos a necessidade de se produzir um material que pudesse servir tanto a discentes quanto a docentes do ensino superior nas mais diversas áreas de estudo. Nesse escopo, na presente obra, buscamos introduzir o leitor às mais recentes e mais utilizadas modalidades de manutenção de cepas bacterianas, de maneira didática e com linguagem simples, dividindo-as em meios de preservação de curto, médio e longo prazo, contrapondo pontos positivos e negativos de cada método. Ao fim deste volume, compilamos ainda um protocolo de manutenção de cepas para a aplicação em laboratórios de pequeno a grande porte, tanto para o uso didático no ensino da microbiologia quanto para replicação de cepas na produção de trabalhos científicos no campo da pesquisa.

Esperamos, caro leitor, que esta obra possa contribuir para a sua formação e a de tantos outros amantes do conhecimento.

PREFÁCIO DO PROFESSOR - OBJETIVO DO LIVRO

As mudanças nas características do ecossistema e o surgimento de gerações sucessivas são decorrentes do ciclo evolutivo natural do bioma terrestre, do caráter transformador da vida, da morte, decomposição, e regeneração do bioma, consequências, entre outros fenômenos, da elevada taxa de crescimento dos microrganismos. Desse modo, é importante conhecer e estabelecer processos de manutenção e preservação de cepas microbiológicas que sejam capazes de manter, em um nível aceitável, as características específicas das espécies. Esses processos têm o objetivo de assegurar o uso comparativo em experimentos de pesquisas na área de ensino da microbiologia ambiental, industrial e clínica. Com o objetivo de conhecer os métodos de preservação de microrganismos validados e recomendados por órgãos oficiais além das experiências exitosas publicadas, realizou-se um resumo de artigos selecionados sobre o assunto para orientar um protocolo de manuseio, armazenamento e preservação de cepas no âmbito dos laboratórios integrados do Centro Universitário Christus - UNICHRISTUS. Foi organizada uma revisão bibliográfica fundamentada em artigos científicos, *guidelines* e livros publicados sobre o tema. A revisão de literatura foi realizada com base no enfoque de Rosemary C. She e Cathy A. Petti, 2019 da ASM, *American Society for Microbiologists*, sobre os métodos de preservação de cepas que os classifica, de acordo com o tempo de armazenamento máximo da cultura, em métodos de curto e longo prazo. A maioria dos trabalhos escolheu o método de preservação com base no tipo de microrganismo a ser cultivado, no propósito e no tempo de uso esperado para a cultura. Como meios de preservação de curto prazo, sobressaíram-se (i) a transferência direta para subcultura, (ii) a imersão em óleo, (iii) o congelamento a -20 °C, (iv) a secagem e (v) o armazenamento em água destilada. Não houve unanimidade quanto à classificação dos métodos de médio prazo. Nos métodos de preservação de longo prazo, destacam-se o congelamento à temperatura ultrabaixa e a liofilização. Como resultado obtido, destaca-se a compilação de um texto que compara as várias modalidades de métodos e permite aos organizadores do laboratório aplicar a técnica que se apresente como mais adequada aos recursos disponíveis, aos microrganismos a serem estocados e o objetivo da replicação da cepa.

1. INTRODUÇÃO

O bioma terrestre segue seu ciclo normal de vida, de morte, decomposição, e regeneração ao longo do tempo. O caráter evolutivo desse curso e a elevada taxa de crescimento dos microrganismos, com surgimento rápido de gerações sucessivas, conseqüentemente acarretam mudanças nas características do ecossistema. A necessidade de deter os ciclos sucessivos de gerações microbianas no âmbito da pesquisa e de minimizar os riscos de constantes mudanças nas características microbianas específicas sempre foram os principais objetivos que incentivaram a implementação dos processos de manutenção e principalmente de preservação dessas espécies. A conservação e preservação de microrganismos é a tarefa mais importante e de alta prioridade para a maioria dos laboratórios microbiológicos envolvidos em pesquisa, ensino ou aplicação industrial. Desde décadas remotas, os alvos de estudos científicos têm sido no sentido de incrementar protocolos de preservação, tornando-os mais eficientes na conservação de microrganismos para assegurar o uso comparativo em experimentos e, de certa forma, a reprodutibilidade, continuidade e expansão de pesquisas na área do ensino, da microbiologia ambiental, industrial e clínica.

O presente guia tem como objetivo contribuir com a criação de procedimentos operacionais e apresenta os pontos determinantes da preservação microbiana; além disso, destaca a importância dos bancos de cepas microbianas e abre a perspectiva de delineamentos futuros na área de pesquisa em preservação de microrganismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA - VISÃO GERAL DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

Os organismos vivos, as células, os genes e as informações relacionadas compõem os recursos biológicos de que dispomos na natureza e que são as matérias-primas essenciais para o avanço da biotecnologia, da saúde humana, da pesquisa e do desenvolvimento nas ciências da vida. Por essas razões, a conservação e preservação de micróbios devem ser consideradas e priorizadas nos processos da melhoria da qualidade das metodologias laboratoriais no ensino e nas pesquisas das ciências biológicas. A biologia molecular causou uma verdadeira transformação nesses recursos, aumentando o potencial de aquisição e modificação desses materiais. A gestão desses recursos, sua manutenção e preservação se constitui hoje uma responsabilidade dos centros de pesquisas com o objetivo maior de colher benefícios científicos, econômicos e médicos para o futuro avanço da biotecnologia e sua contribuição para o crescimento da bioeconomia (1, 2).

O interesse pela preservação de microrganismos para fins de reproduzir modelos científicos e estudos comparativos futuros tem uma longa trajetória na microbiologia. Em 1880, observou-se que as bactérias sobreviviam bem no gelo e que os ciclos de congelamento/descongelamento causavam danos à parede celular. Em 1900, os pesquisadores otimizaram métodos para preservar tecidos, vírus e bactérias para uso posterior por congelamento e secagem (3, 4, 5).

Ao longo dos últimos 60 anos, os métodos de preservação microbiana foram avaliados e extensivamente implementados em vários estudos. Nesses, foram ressaltados que os métodos ideais para preservação devem levar em consideração a classificação taxonômica de um microrganismo a ser preservado. Foram publicados artigos de revisão, monografias e livros que forneceram informações detalhadas sobre o armazenamento de vários tipos de microrganismos (3, 4, 6, 7, 8, 9).

O investimento na taxonomia tradicional, na crescente demanda por uma abordagem molecular, o contínuo esgotamento dos recursos naturais e as preocupações com a biossegurança e as mudanças climáticas trazem uma maior conscientização sobre o valor incontestável das coleções de microrganismos. A conservação dos recursos genéticos e da biodiversidade fornecem a base essencial para produtos e indústrias e coeficientes emergentes de base biotecnológica, tanto no mundo desenvolvido como no mundo em

desenvolvimento; um elemento essencial no desenvolvimento de uma bioeconomia baseada no conhecimento (10).

O crescimento bacteriano em um container fechado contendo um meio de cultivo quimicamente definido resulta, com o tempo, nos eventos que definem a curva de crescimento bacteriano. Com o crescimento bacteriano, e sem a reposição de nutrientes, a população tende a resultar na fase de declínio e morte. Se as reações químicas deletérias puderem ser retardadas ou interrompidas, a população bacteriana, em um ambiente de cultivo, permanecerá viável por um longo período. Por conseguinte, o intuito de preservar essa população é reduzir a taxa de crescimento e encontrar um balanceamento de nutrientes que permita a viabilidade dos microrganismos por um tempo suficientemente longo (11).

Existem duas abordagens técnicas básicas de preservação microbiana que garantem a redução da taxa de reações químicas deletérias em um ambiente de cultivo microbiano: (i) diminuir a temperatura, o que diminui consideravelmente a velocidade de todas as reações químicas, o que pode ser alcançado pelo uso de refrigeradores, congeladores mecânicos e congeladores de nitrogênio líquido; (ii) a redução do nível da água na composição do meio de cultura, ou mesmo a desidratação total da cultura, um processo complexo, laborioso que envolve a sublimação da água através da técnica de liofilização (11). Portanto, por definição, a preservação de uma população microbiana em cultivo é a capacidade de manter microrganismo em um estado viável, livre de contaminação e sem alterações em suas características genóticas e/ou fenotípicas. Uma condição primordial e que deve ser sempre levada em consideração é a fácil restauração dos microrganismos que foram submetidos ao estado de preservação à sua condição anterior (4).

Prakash, et al. revisaram vários métodos usados com sucesso para a preservação de microrganismos: subculturas repetidas, preservação em grânulos de ágar, sobreposição de óleo de culturas inclinadas, uso de sílica gel, outros suportes estéreis, criopreservação e liofilização. Entre elas, a criopreservação e a liofilização ainda são muito utilizadas para coleções de culturas na indústria, sendo necessários ainda o aprofundamento da discussão de aspectos técnicos e os prós e contras de ambos os métodos (12).

Segundo Sola e colaboradores (2012), os métodos de manutenção de microrganismos podem ser classificados de acordo com tempo máximo de preservação em: (i) métodos de curto prazo: repique contínuo; (ii) métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20°C ; (iii) métodos de longo prazo: liofilização, criopreservação (3).

A criopreservação foi abordada em estudos desde 1913 quando os crioprotetores foram utilizados em diversos estudos. Castro et al. relataram que o comportamento microbiano perante as baixas temperaturas apresenta uma relação direta entre a temperatura e o tempo de preservação; que peptonas adicionadas aos meios de preservação ajudam na manutenção e na viabilidade da amostra. Observaram, ainda, que as bactérias não sofreram desintegração sob baixas temperaturas, ao contrário, por terem o seu metabolismo diminuído, elas foram preservadas por mais tempo (13).

A liofilização é um dos métodos mais comuns usados para armazenar coleções de cultura microbiana, pois é considerada a maneira mais eficaz de fornecer armazenamento de longo prazo da maioria das bactérias, leveduras, dos fungos esporulados e vírus. A melhor preservação ocorre com a liofilização do que com outros métodos porque a liofilização reduz o risco de cristalização de gelo intracelular, o que compromete a viabilidade. A remoção de água da amostra previne eficazmente este dano. Entre as bactérias, a viabilidade relativa com liofilização é maior com bactérias Gram-positivas (em particular formadoras de esporos) e diminui com bactérias Gram-negativas (14, 15).

Muitos países e instituições individuais estabeleceram ou estão estabelecendo pela primeira vez coleções de culturas de microrganismos com apoio público, seja para fornecer serviços a seu país ou região, seja para apoiar seus próprios programas de pesquisa. A primeira edição das diretrizes da Federação Mundial para Coleções de Culturas (World Federation For Culture Collections -WFCC), em 1980, foi a primeira tentativa de desenvolver diretrizes para coleções de cultura. Desde então, vários documentos de orientação foram desenvolvidos, e os padrões internacionais estão sendo aplicados às operações de coleções de culturas até hoje (16, 17, 18, 19).

Para uma adequada escolha do método de manutenção, devem ser levadas em consideração principalmente as características do microrganismo a ser preservado, o objetivo da manutenção desse agente, assim como as vantagens e desvantagens de cada técnica disponível (3).

Os métodos de preservação são classificados segundo a necessidade de aplicação. Sola e colaboradores relataram uma classificação dos métodos de preservação com uma abordagem diferente. Sobre o armazenamento de curto prazo, foi relatada apenas a transferência direta ou repiques contínuos. Nessa classificação, foi incluído ainda o item de metodologia de médio prazo em que foram alocados a preservação em óleo mineral, preservação em água destilada esterilizada e o congelamento a -20°C . Finalizando a

classificação, os autores listaram os métodos de preservação em longo prazo com liofilização e criopreservação (3).

Para a preservação e o armazenamento de fungos, principalmente leveduras, segundo Lacaz et al., o método de Castellani (água destilada) oferece bons resultados práticos. No entanto, os fungos e actinomicetos aeróbios podem ser armazenados em outros métodos, tais como óleo mineral, tendo o ágar batata como base, liofilização, congelamento à temperatura ultrabaixa em freezers e nitrogênio líquido.

Abordaremos, neste guia, uma compilação classificatória dos artigos tendo como base o enfoque de Rosemary C. She e Cathy A. Petti, 2019 e Marília Cristina Sola, 2012 (4, 3).

CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

Métodos de preservação de curto prazo

- Transferência direta para subcultura

Métodos de preservação de médio prazo

- Imersão em óleo
- Armazenamento em água destilada
- Congelamento a -20°C

Métodos de preservação de longo prazo

- Criopreservação
- Liofilização

3. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE CURTO PRAZO

3.1 Transferência direta para subcultura (subcultura periódica)

A subcultura periódica em meio fresco é uma técnica simples, utilizada com muita frequência para bactérias a fim de manter a viabilidade em curto prazo.

A vantagem desse método é a simplicidade; no entanto, as desvantagens são mais presentes, como uma maior atividade laboral com repiques sucessivos caso o armazenamento seja além de oito dias, demanda de maior espaço e insumos laboratoriais e, o mais importante, o comprometimento do perfil genotípico/fenotípico do microrganismo. Embora simples, se os microrganismos necessitarem de estocagem por mais de 1 semana, novos repiques devem ser feitos, o que pode acarretar mudanças no perfil genotípico e

fenotípico do microrganismo. Com os subcultivos sucessivos, aumenta a probabilidade de mutação com mudanças indesejáveis nas características da cepa, além disso, os plasmídeos podem ser perdidos a cada transferência. A taxa de mutação é bastante variável, e o intervalo entre as transferências varia entre os organismos. Alguns organismos parecem estáveis indefinidamente com transferências repetidas, e outros podem alterar características fenotípicas após apenas duas ou três passagens (20). A taxa real de mutação, no entanto, não foi estudada até recentemente usando a tecnologia de sequenciamento. As questões que devem ser abordadas com a transferência direta incluem o meio a ser usado, as condições de armazenamento e a frequência da transferência (21).

Meios para manutenção

O objetivo maior do meio de cultura é retardar a taxa de crescimento além de preservá-la, tornando-a viável. Devem-se evitar ambientes inóspitos, pois a estratégia de sobrevivência dos microrganismos pode ser uma adaptação à custa de mutações. Ademais, uma grande oferta de nutrientes diminui o tempo de geração, acarretando transferências mais frequentes e comprometendo a escolha desse método. O meio ideal deve acatar as exigências nutricionais características da cepa em crescimento. Um meio comum padrão deve conter, pelo menos, água destilada, caldo tripticase, soja e caldos nutrientes, todos eles podem ser usados com ou sem crioprotetores (4).

Condições de armazenamento

Na bancada de trabalho da maioria dos laboratórios, costumam-se armazenar microrganismos por curtos períodos em meios de ágar usados na rotina. Esses cultivos estão sujeitos à secagem e à contaminação. Essa não é ainda uma técnica ideal e, para minimizar riscos, aconselha-se transferir os organismos para um tubo inclinado de ágar com tampa de rosca e armazená-los em um local organizado, longe da luz e de mudanças significativas de temperatura (figura 1). Para evitar a secagem, as tampas podem incluir revestimentos de borracha ou o filme pode ser enrolado na parte superior do tubo antes ou depois de atarraxar a tampa. Os processos metabólicos são retardados com o armazenamento em temperaturas mais baixas (5 a 8°C), além da diminuição do risco de contaminação e manutenção da viabilidade por períodos um pouco mais longos (22).

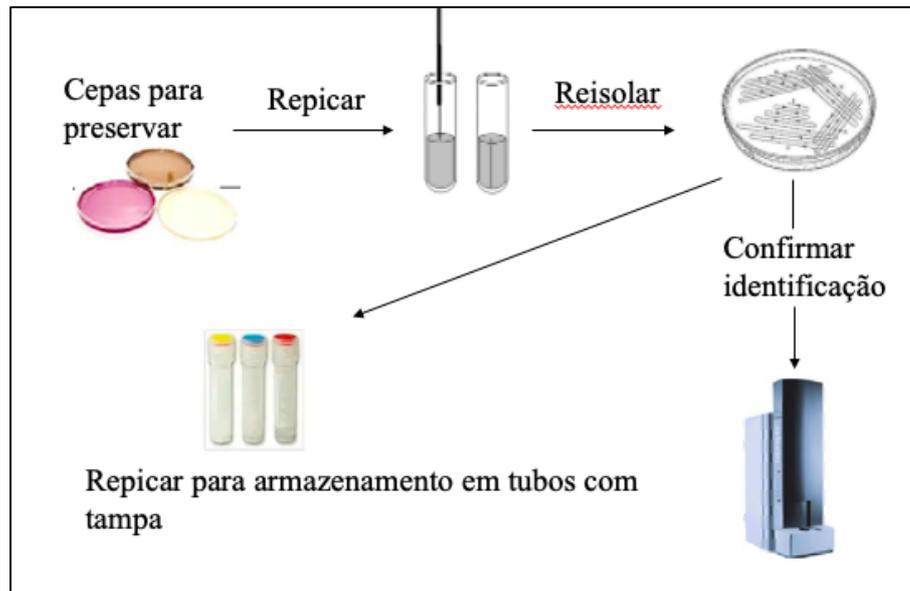


Figura 1 – Técnicas de transferência direta para subcultura (subcultura periódica). Fonte: os autores.

Frequência de Transferência

Não existe um protocolo definido para a frequência de transferência, uma vez que as condições de armazenamento, os meios utilizados e os tipos de microrganismos variam entre os laboratórios. Os laboratórios, individualmente, determinam, para cada categoria de microrganismo, os intervalos ideais entre as transferências sob determinadas condições usadas para armazenamento, seguindo os controles de qualidades. Essas determinações envolvem, geralmente, a realização de subculturas em horários programados até que o laboratório identifique um intervalo aceitável entre as transferências em que um microrganismo possa ser recuperado de forma confiável e reproduzível e estabeleça sua própria padronização com (4, 8).

Procedimentos de Controle de Qualidade

Para a passagem e o armazenamento de organismos de controle de qualidade para testes de suscetibilidade antimicrobiana, os padrões publicados pelo Instituto de Padronização para Laboratórios Clínicos nos Estados Unidos, CLSI (do inglês, *Clinical And Laboratory Standards Institute* e o Comitê Europeu de Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos, EUCAST (do inglês, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) devem ser seguidos. O estado da amostra deve ser avaliado periodicamente, embora não seja necessário, a cada transferência, o controle da cepa deve ser executado a uma periodicidade

determinada para garantir viabilidade, estabilidade do fenótipo, identidade do microrganismo, e a taxa de contaminação das amostras deve ser determinada e todos esses dados devem ser anotados em planilhas (8).

4. MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE MÉDIO PRAZO

Este item da classificação não faz parte da classificação de She et al., mas foi mencionado apenas por Sola et al. Este autor considera os métodos de imersão em óleo, congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e armazenamento em água destilada como métodos de médio prazo. Para fins didáticos, adotamos a classificação de Sola et al., e a descrição dos métodos citados será realizada no item da classificação correspondente (3).

4.1 Imersão em óleo

Considerações gerais

Uma alternativa de armazenagem é cobrir a camada de cultivo de um tubo com crescimento bacteriano com uma camada de óleo mineral no topo da amostra a fim de limitar a quantidade de oxigênio disponível, causando, assim, uma redução no metabolismo e consequente redução na taxa de crescimento do agente (23). Isso ocorre porque a camada de óleo atua como uma barreira física para evitar a evaporação da umidade e a difusão do oxigênio, o que ajuda a retardar a atividade metabólica das bactérias e a preservá-las por um curto período.

Muitas bactérias e fungos podem ser armazenados por períodos de até 2 a 3 anos por esse método, e as transferências não são necessárias com tanta frequência. Microrganismos ainda são metabolicamente ativos neste ambiente fechado, e mutações ainda podem ocorrer. Canhos et al. e Costa et al. afirmaram que esta técnica proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, bem como redução da velocidade de desidratação do meio de cultura, em consequência da diminuição de oxigênio (figura 2). O óleo mineral deve ser um óleo de grau medicinal com uma gravidade específica de 0,865 a 0,890. A contaminação da amostra pode ocorrer se o óleo mineral não for devidamente esterilizado. Para esterilização, deve ser aquecido a 170°C por 1 a 2 h em estufa. A autoclavagem não é um método adequado para esse tipo de material. O óleo mineral estéril também está disponível comercialmente (24, 22).

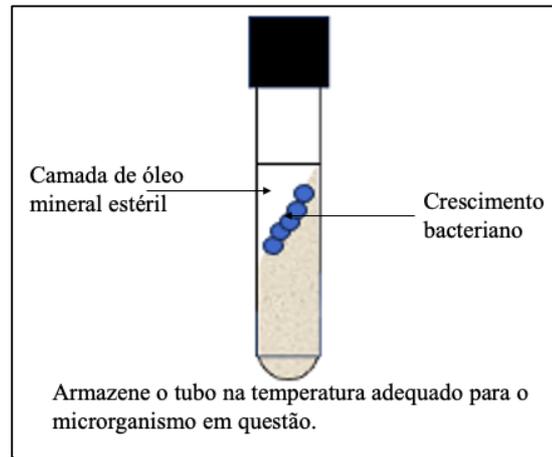


Figura 2 - Método de conservação de cepas microbianas por imersão em óleo. Fonte: os autores

Preparo

Para preparar a amostra, um inóculo de 5 a 10 colônias do microrganismo deve ser colocado em ágar inclinado ou em tubos na superfície da parte inclinada (figura 2). Uma vez identificado o crescimento, adiciona-se uma camada de óleo mineral de, pelo menos, 1 a 2 cm de profundidade até cobrir completamente a inclinação, e o ágar não deve ficar exposto ao ar (quadro 1). Assim como no método de transferência simples, os testes de viabilidade devem ser realizados para determinar o cronograma de transferência ideal que garantirá a recuperação do microrganismo. A recuperação de microrganismos estocados dá-se pelo método de imersão em óleo consiste em uma simples transferência, tendo o cuidado de retirar antes cuidadosamente a camada de óleo que cobre a cultura (3).

Segundo Sola e colaboradores, é notório que a alternativa de preservação de microrganismos em óleo mineral possui as mesmas vantagens que o método de transferência direta ou repique contínuo, diferindo somente na longevidade da cultura, que se apresenta por maiores intervalos (3).

Pesquisadores relatam que as bactérias podem ser conservadas por períodos de um a sete anos dependendo da espécie, enquanto os fungos sobrevivem por um a cinco anos, e leveduras até sete anos, o que levou alguns autores a considerá-lo um método de médio prazo (3, 22, 25, 26).

She e colaboradores relataram algumas sugestões de melhorias nas etapas do método de imersão em óleo: (i) comece com uma cultura bacteriana pura que esteja crescendo ativamente, (ii) esterilize o óleo mineral ou use silicone estéril, (iii) feche a tampa firmemente e sele com fita adesiva para evitar contaminação e (iv), no caso de cultura em placa de Petri, cubra a superfície do crescimento com uma fina camada de óleo mineral ou silicone estéril, tomando cuidado para não danificar a superfície da cultura. Tampe a placa e vede com parafilme ou fita adesiva para evitar contaminação. Armazene a placa de Petri a

uma temperatura adequada para a cepa bacteriana ser preservada. Por exemplo, as bactérias mesófilas são normalmente armazenadas à temperatura ambiente (4).

4.2 Congelamento a -20°C

Considerações gerais

O congelamento é uma boa maneira de armazenar bactérias e a maioria dos fungos. Geralmente, quanto mais fria a temperatura de armazenamento, mais tempo a cultura permanecerá viável. O congelamento pode ser realizado em freezers comuns (-20 °C), em freezers de ultrabaixa temperatura (-70 a 80 °C) e em frios criogênicos. A refrigeração ou congelamento em freezers comuns a -20°C, por ser um método de conservação de médio prazo, será descrito nesse tópico, enquanto os demais serão descritos adiante. Pode ser usado para preservar os microrganismos por períodos mais longos do que aqueles que podem ser realizados por transferências repetidas. A viabilidade pode ser mantida por até 1 a 2 anos para microrganismos específicos, mas, em geral, os danos causados pela formação de cristais de gelo e flutuações eletrolíticas resultam em baixa sobrevivência em longo prazo (4).

Quadro 1 – Armazenamento em imersão em óleo – etapas do processo (Kumar et al., 2009)

Materiais:

1. Parafina líquida de alta qualidade com gravidade específica de 0,830–0,890 (Tyndalized a 121 °C por 20 min).
2. Meio de crescimento sólido, estéril, inclinado em tubos.
3. Estantes.
4. Agulha ou alça de inoculação.

Métodos:

1. Inocule pelo menos dois frascos para cada cepa a ser mantida.
2. Rotule uma cultura como estoque de reserva e a(s) outra(s) como estoque de trabalho.
3. Incube na temperatura ideal para o microrganismo até que atinja crescimento visível.
4. Adicione parafina líquida estéril (8–10 ml) para cobrir a superfície inclinada do meio até uma profundidade máxima de 10 mm a partir do topo da borda inclinada.
5. Durante a esterilização, a parafina líquida não deve receber umidade, se absorver a umidade torna-se turva e esbranquiçada, o que leva à deterioração das culturas durante o armazenamento. Remova a umidade aquecendo suavemente no forno para que fique transparente.
6. Armazene as culturas oleadas, com tampas de rosca, em estantes a uma temperatura de 15–25 °C.
7. Recuperação:
 - Drene o máximo possível de óleo do inóculo. Remova uma parte da cultura estoque de trabalho usando um agulha ou alça estéril.
 - A cultura estoque de reserva é usada somente quando uma nova preservação se torna necessária quando todo o inóculo tiver sido removido, quando contaminado, ou quando o prazo de validade estiver crítico.

Meios de cultura

O meio usado para armazenamento é importante, pois os tempos de preservação variam de alguns meses a 2 anos, dependendo do meio utilizado. Os freezers modernos, com auto descongelamento, com ciclos de congelamento e descongelamento, devem ser evitados

porque a flutuação cíclica da temperatura destruirá o microrganismo (27, 4). As bactérias podem ser congeladas usando 15% de glicerol. O processo é simples e requer microtubos com tampa de rosca e glicerol estéril. O glicerol é diluído a 30%, e uma quantidade igual dessa solução de glicerol e caldo de cultura são misturados (quadro 2), dispensados em tubos e então congelados (4).

4.3 Armazenamento em água destilada

Considerações gerais

Sobre o armazenamento em água destilada, a técnica foi primeiramente descrita por Castellani, em 1961, apud DE CAPRILES, 1989). Castellani descreveu a técnica de preservação em água destilada esterilizada, também conhecida pelo método de Castellani, que consiste no armazenamento de microrganismos em água esterilizada ou solução salina, sendo indicada na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas. O ideal é utilizar sempre culturas jovens com 10 a 15 dias de crescimento para suportar a baixa de nutrientes, manter uma taxa pequena de crescimento e um tempo de preservação razoável. O método se baseia na transferência de culturas para frascos contendo uma solução de água esterilizada, com posterior armazenamento sob temperatura ambiente (28).

Quadro 2 - Congelando Bactérias Usando Glicerol – etapas do processo (Kumar et al., 2009).

Materials:

1. Criotubos estéreis de 2mL
2. Água destilada estéril
3. Vortex
4. Ponteiras e pipetas estéreis
5. Glicerol (30%, v/v)

Método:

1. Prepare uma solução de glicerol a 30% (v/v) misturando 30 ml de glicerol com 70 ml de água destilada. Transfira a solução para um frasco de vidro com tampa de rosca e esterilize em autoclave a 121 °C por 15 min.
2. Dispense 500 uL de glicerol 30% estéril em criotubos estéreis de 2 ml.
3. Adicione 500 uL da cultura bacteriana ao tubo com glicerol 30% e misture no Vortex.
4. Etiquete o tubo com o nome do organismo, estirpe, data etc.
5. Coloque o tubo no congelador e registre sua localização.
6. Para recuperar as bactérias armazenadas:
 - a. Apenas um pequeno volume de cultura precisa ser removido do tubo.
 - b. O tubo não precisa ser descongelado. Abra o tubo e raspe a cultura congelada com uma ponta de pipeta estéril.
 - c. Recoloque o tubo no freezer imediatamente.
 - d. Transfira o pequeno volume de células congeladas/descongeladas para uma placa de ágar e semeie.
 - e. Se a cultura descongelar, não volte a congelá-la, pois as células são normalmente muito sensíveis ao congelamento e descongelamento.
 - f. Descarte a cultura descongelada adequadamente.

Aplicação

A maioria dos microrganismos não consegue uma boa viabilidade em água destilada, mas alguns sobrevivem por períodos mais prolongados. Muitos fungos e *Pseudomonas* spp. podem sobreviver por vários anos em água destilada à temperatura

ambiente. Como já descrito por outros autores há décadas, (29, 30) o método de preservação em água destilada apresenta vantagens em relação a outros processos, por seu baixo custo e a capacidade de evitar o pleomorfismo das amostras. McGinnis et al. descobriram que, com exceção dos fungos que não esporulam facilmente, 93% das leveduras, dos bolores e actinomicetos aeróbicos podem ser preservados de maneira fácil com um custo acessível em água destilada estéril (quadro 3) (4, 31).

5.MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE LONGO PRAZO

O congelamento à temperatura ultrabaixa e a liofilização são métodos que podem ser usados para armazenar microrganismos por períodos de até alguns anos, recomendados para armazenamento de longo prazo. Embora o investimento inicial em congeladores de temperatura ultrabaixa e liofilização possa ser caro, esses métodos são menos trabalhosos ao longo do tempo, requerem menos espaço laboratorial (por exemplo, um microtubo criogênico versus meios de cultura em caldo ou ágar em tubos de ensaio) e reduzem as chances de eventos de mutação. Mutações e perda de elementos genéticos móveis ainda podem ocorrer, e esse fenômeno foi observado em cepas de *Staphylococcus aureus* que perderam o gene *mecA* durante a preservação de longo prazo a -80°C (32). Semelhante àqueles com outros métodos de preservação, as taxas de sobrevivência após a liofilização variam de acordo com a espécie. Avaliando microrganismos em um período de 10 anos, Miyamoto-Shinohara et al. descobriram que as taxas de sobrevivência após liofilização para *Brevibacterium* spp. e *Corynebacterium* spp. aproximaram-se de 80%, enquanto os de *Streptococcus mutans* diminuíram para 20% após 10 anos (4, 33).

Quadro 3 - Armazenamento em água destilada – procedimento (Lacaz et al., 2002)

Método Castellani para leveduras e fungos filamentosos

Materiais:

1. Agulha de platina em “L” ou alça de platina.
2. Tubos de ensaio com tampa de rosca contendo 5 mL de água destilada, estéreis.
3. Cultura pura do fungo em Sabouraud ou ágar-batata, mantidas à temperatura ambiente e

Métodos:

Transferir com o auxílio da agulha em L ou alça de platina (leveduras) uma porção do fungo para o tubo com água destilada estéril e rosquear a tampa.

1. Os tubos inoculados podem ser mantidos à temperatura ambiente por período que varia de um a vários anos sem perda da viabilidade.
2. A viabilidade das amostras mantidas em água destilada é verificada mantendo-se parte do crescimento fúngico para meios de cultura apropriado para o fungo em manutenção.

5.1 Congelamento à temperatura ultrabaixa

Os freezers elétricos de temperatura ultrabaixa e unidades de armazenamento de nitrogênio líquido são sistemas utilizados para manter microrganismos a temperaturas de -70°C ou inferiores por períodos prolongados. Acidentes podem acontecer com qualquer um dos sistemas, e o aquecimento indesejado pode ocorrer devido à perda de energia elétrica ou nitrogênio líquido. Para a prevenção dessas ocorrências, é fundamental a observação atenta do sistema e um mecanismo de alarme adequado, pois qualquer aumento de temperatura reduzirá a viabilidade. A presença de um criopreservativo, como o glicerol, pode reduzir o risco de microrganismos em exposição curta a temperaturas mais altas. Se ocorrer descongelamento, não há diretrizes para a rápida restauração da condição de armazenamento. No recongelamento dos frascos selados, uma vez descongelado, o frasco deve ser aberto, e o organismo deve ser transferido imediatamente para um meio de crescimento apropriado para posterior programação de estocagem (34).

Para armazenamento em longo prazo, temperaturas abaixo de -130°C são recomendadas para células exigentes, como hifas de fungos e protozoários. A atividade celular e as reações químicas cessam nessas baixas temperaturas, mas, a -70°C, elas ainda podem continuar em uma extensão limitada. Portanto, para a criopreservação em longo prazo de certos organismos, o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) ou vapor de nitrogênio líquido (-150°C) é recomendado (17).

Frascos de armazenamento

Os frascos de armazenamento devem ser capazes de suportar temperaturas muito baixas e manter a vedação do seu conteúdo. Podem ser usados tubos de plástico (polipropileno) ou vidro (borossilicato). Frascos de plástico com tampas de rosca e arruelas de silicone são muito mais fáceis de usar do que frascos de vidro que, depois de abertos e marcados, devem ser selados com uma chama. Vários fornecedores comerciais estocam frascos aceitáveis, por exemplo, Fisher Scientific Products (Pittsburgh, PA), VWR Scientific (Radnor, PA), Wheaton Science Products (Millville, NJ) e Becton Dickinson and Co. (Franklin Lakes, NJ). Os frascos vêm em uma variedade de tamanhos; no entanto, os microtubos são os mais utilizados e estão disponíveis, convenientemente embalados em estantes de 12 por 12 para que 144 frascos sejam armazenados em uma caixa facilmente rastreável (4).

Agentes crioprotetores

Para proteger os microrganismos de danos durante o processo de congelamento, armazenamento e descongelamento, agentes crioprotetores são frequentemente adicionados à suspensão da cultura. A maioria das bactérias, dos fungos e vírus sobrevivem melhor com esses aditivos. Estudos mostraram que os agentes crioprotetores danificam, significativamente, os outros tipos de microrganismos, os protozoários, por exemplo. O congelamento rápido sem aditivos ainda pode ser aceitável para a sobrevivência em longo prazo de alguns protozoários, embora a liofilização seja preferida ou mais bem recomendada. Existem dois tipos de agentes crioprotetores: (1) aqueles que penetram na célula e protegem o meio intracelular e outros (2) que protegem o microrganismo do meio externo. No tipo (1), estão o glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO); no tipo (2), podemos citar a sacarose, lactose, glicose, manitol, sorbitol, dextrano, polivinilpirrolidona, poliglicol e leite desnatado (13).

Combinações de agentes, bem como detergentes (por exemplo, Tween 80 e Triton WR 1339), outros carboidratos (por exemplo, mel) e lactobionato de cálcio também têm sido usados. O crioprotetor mais universal é o DMSO; no entanto, o crioprotetor ideal geralmente varia com o microrganismo. Por exemplo, o glicerol parece ser o mais adequado para a preservação de bactérias. Uma revisão atual e abrangente dos aditivos protetores usados na criopreservação de microrganismos é fornecida por Hubalek et al (35). Glicerol é tipicamente adicionado a uma concentração de 10% (volume/volume), e DMSO é adicionado a 5% (volume/volume). Antes do uso, o glicerol é esterilizado em autoclave. Uma vez preparado, pode ser armazenado em temperatura ambiente por meses. O DMSO deve ser esterilizado por filtro e pode ser armazenado em recipientes abertos por apenas 1 mês antes do uso. Dos produtos naturais, o leite desnatado é o mais utilizado. O leite desnatado desidratado é adquirido de fornecedores de produtos médicos, por exemplo, Becton Dickinson and Co. e Hardy Diagnostics (Santa Maria, CA). Pode ser utilizado o leite em pó desnatado para fórmulas infantis que deve ser autoclavado e utilizado na concentração final de 20% (p/vol) em água destilada (13). Isso é o dobro da concentração sugerida pelos fabricantes se a intenção for fazer um equivalente reconstituído de leite comum (35, 13). Veja a tabela 1 para detalhes sobre agentes crioprotetores.

Tabela 1 - Procedimentos comuns para preservação de microrganismos

ORGANISMOS	ARMAZENAMENTO	CRIOPROTETORES	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO (°C)	DURAÇÃO DO ARMAZENAMENTO (em anos)
Estreptococos	Congelamento	Leite desnatado	-20	0,2
	Congelamento em ultrabaixa temperatura	Leite desnatado	-70 a -196	0,2-1
	Liofilização	Leite desnatado	4	0,5-30
Micobactérias	Congelamento	Leite desnatado	-20	3-5
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Leite desnatado	-70 a -196	3-5
	Liofilização	Leite desnatado	4	16-30
Bactérias gram-positivas esporuladas	Transferência	Nenhum	Temperatura ambiente	0,2 - 1
	Imersão em óleo mineral	Nenhum	4	1
	Secagem	Nenhum	Temperatura ambiente	1-2
	Congelamento	Glicose	-20	1-2
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Leite desnatado, glicerol	-70 a -196	2-30
	Liofilização	Leite desnatado, lactose	4	30
Outras bactérias gram-positivas	Transferência	Nenhum	Temperatura ambiente	0,2-0,3
	Imersão em óleo mineral	Nenhum	4	0,6-2
	Congelamento	Sacarose, glicerol	-20	1-3
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Leite desnatado, sacarose, glicerol	-70 a -196	1-30
	Liofilização	Leite desnatado, sacarose	4	30
Bactérias gram-negativas	Transferência	Nenhum	Temperatura ambiente	0,1-0,3
	Imersão em óleo mineral	Nenhum	4	1-2
	Congelamento	Sacarose, lactose	-20	1-2
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Sacarose, lactose, glicerol	-70 a -196	2-30
	Liofilização	Leite desnatado, sacarose, lactose	4	30
Fungo filamentosos	Transferência	Nenhum	4 a 25	2-10
	Imersão em óleo mineral	Nenhum	Temperatura ambiente	1-40

ORGANISMOS	ARMAZENAMENTO	CRIOPROTETORES	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO (°C)	DURAÇÃO DO ARMAZENAMENTO (em anos)
	Armazenamento em água destilada	Nenhum	Temperatura ambiente	1-10
	Secagem	Solo, gel de sílica	Temperatura ambiente	1-4
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Glicerol, DMSO	-70 a -196	2-30
	Liofilização (formadores de esporos)	Glicerol, sacarose, DMSO, leite desnatado	4	2-30
Leveduras	Armazenamento em água destilada	Nenhum	Temperatura ambiente	1-2
	Secagem	Meio nutritivo	Temperatura ambiente	1-2
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Glicerol, DMSO, leite desnatado	-70 a -196	2-30
	Liofilização	Meio nutritivo	4	2+
Protozoários	Congelamento	Sangue, caldo nutritivo com DMSO ou sacarose	-20 a -40	
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	Sangue, meio nutriente com DMSO ou glicerol	-70 a -196	
Vírus	Transferência	Meio nutritivo	4	0,5
	Congelamento em temperatura ultrabaixa	SPGA	-70 a -196	1-30
	Liofilização	SPGA	4	6-10

Fonte: Sociedade Americana para Microbiologistas (do inglês, *American Society for Microbiologists* – ASM). *Manual of Clinical Microbiology*, 2019. SPGA (do inglês, *sucrose-phosphate-glutamate-bovine albumin*)

Preparação de Microrganismos para Congelamento

Os microrganismos são inoculados em um meio que suporta, adequadamente, seu crescimento máximo. As culturas podem amadurecer até o crescimento tardio ou fase estacionária antes de serem colhidas. As amostras de caldo são centrifugadas para criar um sedimento (*pellet*) de microrganismos. O *pellet* é retirado e ressuspendido em 2 a 5 mL de caldo com a concentração apropriada de aditivo crioprotetor. Para amostras de ágar, o caldo contendo o crioprotetor é colocado na superfície do ágar. A superfície é raspada com uma

pipeta ou alça estéril para suspender microrganismos e, em seguida, a mistura de caldo é pipetada diretamente em criotubos. Alternativamente, a superfície do ágar pode ser raspada com uma alça estéril. Os microrganismos podem, então, ser transferidos diretamente para o frasco do crioprotetor e emulsionados em uma suspensão densa final. O volume das alíquotas a serem congeladas é tipicamente de 0,2 a 0,5 mL (4, 36).

Criopreservação

A Coleção Americana Típica de Cultura, do inglês, American Type Culture Collection (ATCC) recomenda congelamento lento e controlado a uma taxa de 1°C por minuto até que os frascos esfriem a uma temperatura de, pelo menos, -30°C, seguido de resfriamento mais rápido até que a temperatura final de armazenamento seja atingida (ATCC, 2022). Este protocolo é mais bem alcançado usando um freezer de taxa controlada. Como alternativa, a ATCC sugere o uso de uma câmara de congelamento isolada, que é disponível comercialmente, ou simplesmente uma caixa de poliestireno apropriada recheada com materiais isolantes. Estudos na década de 1970 mostraram que o congelamento sem um rígido controle pode ser aceitável para a maioria dos organismos e é muito menos caro ou trabalhoso (17). Quando os microrganismos são armazenados em nitrogênio líquido, no entanto, ainda é recomendado que os frascos sejam colocados inicialmente em um freezer a -60°C por 1 hora e depois transferidos para o nitrogênio líquido. Quando os organismos são armazenados permanentemente a -60 a -70°C, os frascos podem ser colocados diretamente no congelador. Frascos com pequenas esferas de vidro ou esferas de plástico também podem ser usados para congelar microrganismos, por exemplo, sistemas CryoBank (Copan Diagnostics, Murrieta, CA) ou Microbank (Pro-Lab Diagnostics, Round Rock, TX). A suspensão de cultura revestirá as esferas e, em seguida, a suspensão de cultura em excesso é aspirada do frasco. As esferas individuais podem, então, ser removidas do armazenamento para reconstituição sem descongelar a amostra inteira (37).

Descongelamento

O aquecimento lento do cultivo a partir do estado congelado acarreta danos aos microrganismos cujas temperaturas críticas parecem estar entre -40 e -5°C. Para melhores resultados, os frascos de cultura armazenados devem ser aquecidos rapidamente em banho-maria, a 35°C até que todo o gelo tenha desaparecido. Após o cultivo ser descongelado, o frasco deve ser aberto, e o microrganismo deve ser transferido imediatamente para um meio de crescimento apropriado. As mudanças rápidas de temperatura e as mudanças resultantes

da pressão do ar dentro dos frascos podem fazer que os frascos explodam; por conseguinte, deve-se ter muito cuidado durante a fase de descongelamento, e a implementação de medidas, como roupas de proteção e óculos, deve ser usada durante este processo (38).

Para a maioria dos propósitos práticos no laboratório clínico, o descongelamento completo de bactérias ou leveduras armazenadas em banho-maria não é prático ou necessário. O frasco congelado pode ser descongelado à temperatura ambiente e semeado em placas com bons resultados para a maioria dos organismos de rotina. Se o frasco do organismo precisar ser guardado para reutilização posterior, pode-se raspar uma pequena porção do conteúdo congelado com uma alça estéril ou ponta de pipeta e, em seguida, inocular o meio apropriado. O frasco pode ser devolvido ao armazenamento congelado imediatamente sem descongelar e pode ser reutilizado posteriormente com danos limitados ao organismo (12).

5.2 Liofilização

A preservação de microrganismos por dessecação tem sido um método para armazenamento de culturas em longo prazo usado há décadas. Além das coleções de culturas, as indústrias alimentícias e farmacêuticas descobriram que as tecnologias de secagem são os métodos preferidos para a preservação de uma grande variedade de preparações de alimentos e diferentes medicamentos em grandes quantidades. O controle de qualidade desses métodos microbiológicos usa amostras de controle de qualidade positivo de cepas microbianas de referência. Essas cepas são distribuídas usando técnicas de secagem para tornar as culturas estáveis e transportáveis à temperatura ambiente (34).

Quando o método de liofilização é mencionado em relação à preservação de microrganismos, é quase sempre em relação ao armazenamento de longo prazo de suspensões de células que contêm mais de 10^8 células/mL. A razão para preservar altas concentrações de células é a premissa de que a maioria delas morre durante o armazenamento de longo prazo, mas um número suficiente pode sobreviver para permitir a continuação da cepa (33; 22).

Apenas os fungos e as bactérias esporuladas sobrevivem à secagem e, por conseguinte, podem ser secos e armazenados por períodos um pouco mais prolongados. O solo tem sido descrito como meio de armazenamento se for autoclavado e seco ao ar, mas não é um produto padronizado, definido e consistente para uso por longos períodos. Em vez disso, o gel de sílica comercial pode ser usado em pequenos tubos com tampão de algodão após serem aquecidos em um forno a 175°C por 1,5 a 2 h, com recuperação moderada de fungos.

Alternativamente, uma suspensão de 10^8 microrganismos pode ser inoculada em tiras ou discos de papel de filtro estéreis. O papel é seco ao ar ou sob vácuo e colocado em frascos estéreis. Esses frascos podem ser armazenados na geladeira por até 4 anos e, em seguida, tiras ou discos individuais podem ser removidos conforme necessário. Esse método é comumente usado para microrganismos de controle de qualidade (34).

As grandes coleções de armazenamento contam com o auxílio da tecnologia informatizada que agregou muito valor na facilitação, organização e no gerenciamento de banco de dados. Alguns laboratórios desenvolveram seu próprio sistema de rastreamento, enquanto outros produtos estão disponíveis comercialmente. Esses tipos de software permitem que o usuário insira dados referentes a cada amostra em um repositório, e os dados são armazenados de forma bastante organizada e com recursos de rastreamento eficaz (41). A liofilização é considerada a maneira mais eficaz de fornecer armazenamento em longo prazo da maioria das bactérias, leveduras, fungos esporulados e vírus. A melhor preservação ocorre com a liofilização do que com outros métodos, porque a liofilização reduz o risco de cristalização de gelo intracelular, o que compromete a viabilidade. A remoção de água da amostra previne eficazmente este dano. Entre as bactérias, a viabilidade relativa com liofilização é maior com bactérias Gram-positivas (em particular formadoras de esporos) e diminui com bactérias Gram-negativas (33), mas, no geral, a viabilidade das bactérias pode ser mantida por até 30 anos. Além disso, um grande número de frascos com microrganismos secos pode ser armazenado com espaço limitado, e os organismos podem ser facilmente transportados por longas distâncias à temperatura ambiente. O processo combina congelamento e desidratação. Os organismos são inicialmente congelados e depois secos, baixando a pressão atmosférica com um aparelho de vácuo. A liofilização foi extensivamente revisada no passado (33, 40), e o equipamento necessário inclui uma bomba de vácuo conectando em série as amostras a um condensador, as quais podem ser conectadas individualmente ao condensador (método *manifold*) ou podem ser colocadas em uma câmara onde são desidratadas em um espaço de ar maior (método de câmara ou batelada). Alexandre et al. e Heckly et al. publicaram descrições detalhadas de opções de equipamentos (40).

Frascos de armazenamento

Frascos de vidro são usados para todas as amostras liofilizadas. Quando a liofilização é realizada em uma câmara, são usados frascos de vidro duplo. No método da câmara, um frasco externo de vidro é adicionado para proteção e preservação da amostra desidratada. Os grânulos de gel de sílica são colocados no fundo do frasco externo antes que o frasco interno

seja inserido e acolchoado com algodão. Para o método manifold, é usado um único frasco de vidro. Para ambos os métodos, o frasco contendo a amostra real é levemente tampado com algodão absorvente. O frasco de armazenamento no método manifold ou o frasco externo no método de câmara devem ser selados para manter o vácuo e a condição atmosférica seca. Todos os frascos são esterilizados antes do uso por aquecimento em um forno de ar quente (41).

Agentes crioprotetores

A pesquisa sobre agentes crioprotetores foi extensivamente revisada. Em geral, os dois agentes mais usados são o leite desnatado e a sacarose. O leite desnatado é usado com mais frequência para liofilização de câmara, e a sacarose é usada com mais frequência para liofilização múltipla. O leite desnatado é preparado fazendo uma solução a 20% (volume/volume) de leite desnatado em água destilada. A solução é dividida em alíquotas de 5 mL e autoclavada a 116°C, com cuidado para evitar superaquecimento e caramelização da solução. A preparação é, então, usada em volumes menores conforme descrito acima para congelamento. A sacarose é preparada em uma mistura inicial de 24% (volume/volume) de sacarose em água e adicionada em volumes iguais à suspensão do microrganismo em meio de crescimento para obter uma concentração final de 12% (volume/volume) (7).

Preparação de Microrganismos para Liofilização

Tal como acontece com o congelamento simples, a recuperação máxima de organismos é alcançada usando microrganismos no crescimento tardio ou na fase estacionária do crescimento de um inóculo em um meio de crescimento apropriado. Altas concentrações de microrganismos são consideradas importantes. A ATCC recomenda uma concentração de, pelo menos, 10^8 UFC/mL (17), e a Heckly sugere uma concentração de 10^{10} UFC/mL ou superior (8; 14).

Métodos de liofilização

No método da câmara, frascos internos com a suspensão do microrganismo são colocados em uma única camada dentro de um recipiente de aço inoxidável. Este recipiente é colocado em um freezer de baixa temperatura a -60°C por 1 h. O recipiente é, então, transferido para uma câmara contendo um banho de baixa temperatura, por exemplo, gelo seco em etil Cellosolve ou outro solvente, e coberto com uma tampa de vácuo que possa ser selada, que é conectada em sequência a um reservatório de condensador também preenchido

com o solvente de gelo seco misturado a uma bomba de vácuo. O vácuo é mantido a um mínimo de 30 $\mu\text{m Hg}$ por 18 h. Ao mesmo tempo, os frascos externos são preparados, aquecidos em um forno durante a noite, preenchidos com grânulos de sílica gel e algodão e colocados em um gabinete seco (com <10% de umidade relativa). Os frascos internos liofilizados são inseridos nos frascos externos, e os frascos externos são selados a quente. Várias cepas ou espécies diferentes provavelmente não devem ser processadas no mesmo lote. As taxas de contaminação cruzada variam de 0,8 a 3,3% quando dois microrganismos diferentes são colocados em lados opostos do mesmo recipiente e chegam a 8,3 a 13,3% quando são misturados. No método manifold, é usado um rack de frascos individuais em vez de um único recipiente. O rack é colocado em um banho de gelo seco. Após o processo de congelamento, os frascos são conectados por tubos de borracha individuais em sequência ao recipiente do condensador preenchido com a mistura de gelo seco-solvente e a bomba de vácuo. Como no método descrito acima, o vácuo é mantido a 30 $\mu\text{m Hg}$ por 18 h e, em seguida, os frascos individuais são selados (42).

Armazenagem

Os frascos individuais precisam ser devidamente rotulados e classificados. O armazenamento à temperatura ambiente não mantém a viabilidade e não é recomendado. O armazenamento a 4°C em um refrigerador comum é aceitável, mas as taxas de sobrevivência podem ser melhoradas em temperaturas de -30 a -60°C. Deve-se ter cuidado ao abrir os frascos para a reconstituição devido ao vácuo dentro deles. Óculos de segurança devem sempre ser usados, e os frascos devem ser cobertos com gaze para evitar ferimentos se houver explosão quando o ar entrar. A reconstituição também deve ser realizada em uma capela fechada para evitar a dispersão de microrganismos. A superfície do frasco deve ser limpa com álcool a 70% e, em seguida, a parte superior do frasco de vidro pode ser marcada e quebrada ou perfurada com uma agulha quente. Uma pequena quantidade (0,1 a 0,4 mL) de meio de crescimento é injetada no frasco com uma agulha e seringa ou uma pipeta Pasteur, o conteúdo é agitado até que a amostra seja dissolvida e, em seguida, todo o conteúdo é transferido com a mesma seringa ou uma pipetar para o meio apropriado de caldo ou ágar. Uma verificação de pureza deve ser feita em cada amostra devido à possibilidade de contaminação cruzada ou mutação durante o processo de preservação (11).

6. TECNOLOGIAS MAIS RECENTES

Os métodos de preservação em longo prazo, descritos anteriormente, são projetados especificamente para recuperação de microrganismos para posterior cultivo. Testes independentes de cultura baseados em tecnologias de antígenos ou ácidos nucleicos estão em uso generalizado e não requerem microrganismos viáveis. Nesse sentido, o armazenamento de microrganismos para preservar seus antígenos ou ácidos nucleicos também é importante para os laboratórios clínicos. O uso de cartões de matriz Whatman Flinders Technology Associates (FTA) (Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido) ou outros produtos à base de papel de filtro é uma nova abordagem para armazenamento de longo prazo de DNA microbiano, que é seguro (os microrganismos são inativados), barato e rápido. Suspensões de células bacterianas e/ou fúngicas são aplicadas diretamente ao papel FTA seco. Os cartões FTA são impregnados com tampões, uma rede de radicais livres e desnaturantes de proteínas que lisam as membranas celulares em contato aprisionam o DNA e o protegem da degradação. Esta tecnologia foi aplicada com sucesso a uma variedade de bactérias e fungos e serve como sistema de arquivamento de DNA reutilizável.

Embora fora do escopo deste capítulo, amostras diretas, como sangue, podem ser preservadas usando uma mancha de sangue seco em papel de filtro ou com uma matriz que não seja em papel para futuros testes de anticorpos ou ácidos nucleicos para detectar HIV, hepatite vírus B, vírus da hepatite C, *Rickettsia typhi* e *Orientia tsutsugamushi*. Atualmente, existem mais de 20 tipos de métodos de preservação de cepas, que podem ser divididas em quatro categorias: subculturas periódicas, secagem, liofilização e criopreservação (7; 43; 27, 39).

REFERÊNCIAS

1. OZERSKAYA, S. M. Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers. Organization for Economic Co-operation and Development - **Organization for Economic Co-operation and Development** - OECD, Paris, p. 115, 2008.
2. KUMAR, Sudheer et al. Preservation and maintenance of microbial cultures. Analyzing Microbes: **Manual of Molecular Biology Techniques**, p. 135-152, 2013.
3. SOLA, Marília Cristina et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. 2012, <http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/12370>. Acesso em 15/10/2022.
4. SHE, Rosemary C.; PETTI, Cathy A. Procedures for the Storage of Microorganisms. In: CARROLL, Karen C. et al. **Manual of clinical microbiology**, American Society for Microbiologists – AMS, New Jersey: John Wiley & Sons, 12^a ed., p. 161-168, 2019.
5. PARKER, N. et al. **Microbiology**. 2^a ed., Houston: OpenStax, 2022. E-book. ISBN-13: 978-0-9986257-0-6 2022. Acesso em: 20. Jul.2022
6. HASEGAWA, T. History and evolution of culture maintenance and preservation techniques. In: CEVERA-HUNTER, J. C., BELT, A. **Maintaining cultures for biotechnology and industry**. Academic Press, 1996. p. 15-27.
7. GUO, N.; WEI, Q.; XU, Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. **Journal of Biosafety and Biosecurity**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2020.
8. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for bacteria That Grow Aerobically**. 13^a ed. Wayne, 2018.
9. SMITH, D.; MCCLUSKEY, K.; STACKEBRANDT, E. Investment into the future of microbial resources: culture collection funding models and BRC business plans for biological resource centres. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2014.
10. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT-OECD, Modern Biotechnology and the OECD. **Biotechnology website** at www.oecd.org/ehs/icgb/. Acesso em: 20. Jul.2022.
11. OPS DIAGNOSTIC. A guide to bacteria preservation: refrigeration, freezing and freeze/drying. Disponível em: <https://opsdiagnostics.com/>. Acesso em: 27 set. 2022.
12. PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; DESAI, D. A recent overview of microbes and microbiome preservation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 297-309, 2020.
13. CASTRO, H. C. et al. Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 143-156, 2020.

14. HECKLY, R. J. Preservation of microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, n. 24, p. 1-53, 1978. DOI: 10.1016/s0065-2164(08)70635-x. PMID:367097. Disponível em: <https://opentextbc.ca/microbiologyopenstax/chapter/howmicrobes-grow/>. Acesso em 14 de outubro de 2022.
15. MIYAMOTO-SHINOHARA Y. et al. Survival of freeze-dried bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, n. 54, p. 9–24, 2008.
16. WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS-WFCC. <https://wfcc.info>. Establishment And Operation Of Collections Of Cultures Of Microorganisms - **World Federation For Culture Collections**. Disponível em: <https://www.wfcc.info/guideline>. Acesso em: 11. Jul.2022.
17. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC. Bacteriology Culture Guide. Disponível em: www.atcc.org. Acesso em: 11 jul. 2022.
18. THE BRAZILIAN COLLECTION OF ENVIRONMENTAL AND INDUSTRIAL MICROORGANISMS – CBMAI. **Institute of Biology of UNICAMP**. Disponível em: https://cbmai.cpqba.unicamp.br/?page_id=56&lang=en. Acesso em: 14 out. 2022.
19. COLEÇÃO MICROBIANA DA REDE PARANÁ - CMRP TAXONLINE. Deposits and distribution of strains Disponível em: <https://www.cmrp-taxonline.com/collections-and-service>. Acesso em: 14 out. 2022
20. LYNCH, M. et al. A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA - PNAS**, n.105, p.9272–9277, 2008.
21. HALLSWORTH, J. E. Water is a preservative of microbes. **Microbial Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 191-214, 2022.
22. COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal, Goiânia**, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.
23. ROMEIRO, R. S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, [online], Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em:www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf. Acesso em 20 maio de 2023.
24. CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA**, 2004.
25. COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

26. ABREU, M.; TUTUNJI, V. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v.2, n.2, p. 237-252, 2008. DOI: 10.5102/ucs.v2i2.535.
27. WANG Y.; JIN Z.; WU L. Preservation and management of microbial strains. **Shanghai Journal Preventive Medicine**. v. 19 n. 2, p. 87–88, 2007.
28. DE CAPRILES, C.H., MATA, S. & MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia** 106, 73–79 (1989). <https://doi.org/10.1007/BF00437084>.
29. MCGINNIS, M. R.; PADHYE A. A.; AJELLO L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic actinomycetes in sterile distilled water. **Journal of Applied Microbiology**. n. 28, p.218–222, 1974.
30. LACAZ, C.S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002. ISBN 85-7378-123-8.
31. BRILHANTE, R. S. N. et al. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 499-504, 2004.
32. VAN GRIETHUYSEN, Arjanne et al. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1361-1365, 2005.
33. MIYAMOTO-SHINOHARA, Y, IMAIZUMI T, SUKENOBE J, MURAKAMIY, KAWAMURA S, KOMATSU Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology** 41:251–255, 2000.
34. MORGAN, C A. et al. Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.
35. HUBALEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology** n. 46, p. 205–229, 2003.
36. LEBER, A. L. **Clinical microbiology procedures handbook**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2020.
37. CÂMARA J., A. A.; SANT'ANA, A. S. Advances in yeast preservation: physiological aspects for cell perpetuation. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 62-70, 2021.
38. MAHMMOUD, E. N. Comparison of Preservation Methods of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteria. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, New Delhi, v. 14, n. 3, p. 2173-2181, 2020.
39. SILVA, J. O.; COSTA, P. P. RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n.1, p. 73-74, 2008.

40. BODZEN, A. et al. Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. **BMC Biotechnology**, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 1-10, 2021.
41. VITORINO, L. C.; BESSA L. A. Technological Microbiology: development and applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 827, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00827. PMID: 28539920; PMCID: PMC5423913.
42. ZHANG, Z. et al. Development of a new protocol for freeze-drying preservation of *Pseudoalteromonas nigrifaciens* and its protective effect on other marine bacteria. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 44, p. 1-5, 2020.
43. YOU-ZHAO, L. et al. Comparison of methods for *Laribacter hongkongensis* strain storage. **Chinese Journal of Public Health**, [S.l.], v. 33, n. 3, p. 471–474, 2017.

7. ANEXO 1

Procedimento Operacional Padrão (POP) para Preservação e Estocagem de Cepas Microbianas.

 Unichristus Centro Universitário Christus	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	POP LEAC – MIC 00X
---	--	--------------------

**TÍTULO: PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA
 PRESERVAÇÃO E ESTOCAGEM DE CEPAS MICROBIANAS**

REVISÃO	DATA	Nº DE PÁGINAS	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES	ELABORAÇÃO	APROVAÇÃO

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA PRESERVAÇÃO E ESTOCAGEM DE CEPAS MICROBIANAS

Este procedimento Operacional Padrão (POP) foi elaborado como um produto da revisão sobre métodos de preservação e estocagem de cepas bacteriana realizado no âmbito do Programa de Iniciação à Docência do Curso de Medicina do Centro Universitário Christus.

Objetivo do POP: descrever as técnicas de preservação e estocagem de microrganismos com base no objetivo de armazenamento e o grupo microbiano.

Objetivo de armazenamento: armazenamento em curto, médio e longo prazo.

Grupos microbianos: bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Cepas de referência

Cepas isoladas na rotina

Cepas do controle externo da qualidade

INTRODUÇÃO

Os microrganismos de referência certificados podem-se apresentar de várias formas; no entanto, abordaremos neste documento os que são liofilizados e que se destinam à utilização em laboratórios de microbiologia para fins de controle de qualidade. Essas preparações de

microrganismos são originárias da Coleção Americana de Típica de Cultura (American Type Culture Collection (ATCC®)) ou outras coleções autênticas de culturas de referências (NCTC (National Collection of Type Cultures da Europa)).

A preparação liofilizada consiste em uma população de microrganismos enumerados, com substâncias preservadoras além de carvão ativado incluído para neutralizar quaisquer substâncias tóxicas, formadas durante o processo de liofilização. Os microrganismos são embalados em um kit com 1 frasco contendo 10 péletes liofilizados ou alças com gel impregnado de uma cepa de um único microrganismo.

Os microrganismos estão disponíveis em uma variedade de concentrações da cepa que podem ser identificadas por meio do código que consta no final do número de catálogo.

A documentação de controle de qualidade das cepas liofilizadas comercializadas inclui um certificado de análise, mas não está limitada a ele, informando além da identidade do microrganismo, sua rastreabilidade para uma cultura de referência, que o micro-organismo tem 1 passagem da cultura de referência e o valor certificado da preparação do microrganismo.

Todo armazenamento de cepas no laboratório, independentemente da origem, deve estar bem documentado, com informações específicas do microrganismo em um banco de dados preferencialmente eletrônico.

Para as cepas padrão ATCC ou NCTC, as informações que devem constar no banco de dados devem ser gênero e espécie, código/lote de procedência, geração, data de armazenamento e crioprotetor utilizado.

Para os isolados da rotina, deve conter gênero, espécie, data de armazenamento, crioprotetor utilizado, material clínico e métodos de identificação internos que foram utilizados.

Conceitos

- Cepa de referência – microrganismos de uma coleção (cepas ATCC ou NCTC liofilizadas e certificadas).
- Cultura original – é o crescimento derivado de uma cepa de referência.
- Lote de referência – tubos com meio de cultura e crioprotetores contendo microrganismos derivados da cultura original.
- Lotes de estoques 1 – tubos contendo crescimento derivado do subcultivo da cultura original (primeira geração).

- Lotes de estoque 2 - tubos contendo crescimento derivado do subcultivo da 1ª geração (2ª geração).
- Lote de trabalho – é o crescimento derivado de um lote de estoque 1 ou 2. Nesse lote das cepas, o microrganismo se apresenta na 3ª ou 4ª geração. Essa cepa é usada na rotina para o controle de qualidade interno, diário ou semanal.
- Passagens (gerações) – é a transferência ou repique do crescimento do microrganismo de um meio para outro. Os padrões da USP 26-NF 31 e ATCC recomendam que, no máximo, sejam realizadas 5 passagens das cepas de referências originais.
- O crescimento de um microrganismo a partir do estado de preservação inicial (liofilizado ou em swab ou alça) para um meio de cultura não é considerado nova geração/passagem.

Armazenamento de longo prazo.

Para o armazenamento de longo prazo, será utilizado o método de congelamento a **temperaturas ultrabaixa** em freezers elétricos para manter microrganismos a temperaturas de -80°C ou inferiores por períodos prolongados.

Esse processo será destinado ao armazenamento de cepas de referências ATCC ou NCTC. Essas cepas são adquiridas em estado liofilizado e devem ser mantidas até a reconstituição em refrigeração a 4°C ± 10°C.

As cepas de referência liofilizadas devem ser reconstituídas de acordo com as recomendações do fabricante. No entanto, a preparação dos subcultivo, a quantidade de unidades multiplicadoras da cepa, o meio de cultura e o armazenamento subsequente serão contemplados nesse item.

A multiplicação da cepa será de acordo com o programa de utilização delas para a rotina laboratorial ou para a pesquisa. Isso vai determinar o tipo de armazenamento nessa etapa. Depende, também, da frequência de utilização dessas cepas, se é diária, semanal ou mensal, o que determinará se poderão ser mantidas em curto, médio ou longo prazo.

Pode-se optar, também, pela criação de “cepas de trabalho” que poderão ser utilizadas à miúdo e armazenadas por curto ou médio prazo. Essa decisão deve ser criteriosa, pois o número de passagem da cepa de referência deve ser limitado, segundo padronizações nacionais e internacionais. Veja sugestão de passagens no esquema da figura 1.

1. Materiais necessários, mas não fornecidos:

- Seringa e pinça esterilizadas – necessário para a remoção de um pélete individual e colocação em um fluido de diluição primário.
- Materiais necessários para a realização dos métodos de semeadura qualitativos ou quantitativos como alça descartável estéril.
- Para armazenamento em longo prazo com temperaturas ultrabaixas, os tubos para o Lote de Referência precisam ser corretamente indicados, uma vez que nem todos os materiais resistem a temperaturas tão baixas. Utilizar de preferência tubos criogênicos graduados estéreis de 2 mL com tampa de rosca interna e anel de vedação que sejam resistentes à temperatura até menos $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ e que tenham um local para identificação da cepa com caneta de tinta permanente. Evitar o uso de etiquetas colantes que podem descolar a baixas temperaturas.
- Como crioprotetor para a etapa de criopreservação, recomenda-se utilizar o glicerol a 30% (v/v) em BHI.
- Para o armazenamento em curto prazo com temperaturas de 2 a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, recomenda-se um meio líquido como o caldo de enriquecimento *brain heart infusion* (BHI) vazado em uma quantidade de 3 mL em microtubos ou eppendorf com capacidade de 5 mL. Escolha o meio líquido de acordo com as exigências nutricionais da cepa. O BHI atende a essas exigências na maioria das cepas usadas na rotina de um laboratório de microbiologia. Para microrganismos fastidiosos, veja quadro 1.
- Placas de ágar sangue de carneiro a 5% (ASA)
- Meio líquido TSB ou BHI em tubos de 10 mL contendo 4 mL do meio.
- Meio BHI ágar em tubo inclinado.
- Alça bacteriológica estéril
- Cabine de fluxo laminar
- Cepas oriundas do armazenamento de médio prazo
- Jarra de CO_2 ou microaerofilia
- Mão de obra especializada
- EPIs

Procedimento

1. Etapa de reconstituição

- Prepare a quantidade de meio líquido programada para a quantidade de cepas a ser estocada e, conseqüentemente, de tubos.
- Garanta que o meio seja equilibrado para pH recomendado pelo fabricante.
- Dependendo do tipo de condicionamento da cepa comercializada e adquirida, siga as recomendações do fabricante para reconstituir a cepa.
- Com uma pinça estéril, transfira o(s) péletes(s) de microrganismo para o fluido de hidratação. No caso da cepa acondicionada em alça, introduza-a no frasco de hidratação e quebre a haste no local indicado, permitindo que o material liofilizado seja dispensado no tubo do fluido de hidratação.
- No caso do frasco com péletes, não remova o dessecante do frasco. Tampe e feche imediatamente o frasco, recolocando o material não utilizado sob refrigeração entre 2 °C e 8 °C.
- Coloque a suspensão de microrganismo em uma incubadora com a temperatura entre 35 °C +/- 2 °C por 30 minutos para garantir a hidratação completa.

2. Etapa de semeadura

- Logo depois da incubação, agite o material hidratado até que uma suspensão homogênea seja alcançada. As partículas de carvão, que podem estar visíveis na suspensão hidratada, não comprometerão o microrganismo a ser estocado.
- Prossiga com a semeadura em placas de petri contendo ágar-sangue de carneiro ou outro meio recomendado que deve ser concluído dentro de 30 minutos após o processo de hidratação a fim de evitar alterações na concentração da suspensão da cepa. Para a criopreservação de cepas, os microrganismos não devem proceder de meios seletivos.
- Distribuir todo o conteúdo reconstituído e 2 ou 3 placas do meio recomendado para obter um máximo de crescimento. Inocular todo o volume e estriar com alça apenas uma vez, usando toda a extensão da placa.
- Incubar as placas sob a temperatura apropriada e as condições atmosféricas recomendadas para o microrganismo.

- Examine as culturas após o período de incubação recomendado. Essa é a chamada cultura original.
- Nessa etapa, confirme a identificação da cepa.
- Selecione de 4 a 5 colônias e inocule os microtubos ou eppendorf contendo BHI com 20% de glicerol.
- **Ao final dessa etapa, os tubos com o crescimento da cepa constituem o Lote de Referência, caracterizando a primeira 1ª geração.**
- Armazene os tubos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para armazenamento prolongado entre 2 a 30 anos.
- Não armazene culturas congeladas em um freezer com um ciclo de degelo; isso vai expor as culturas a temperaturas mais altas.
- $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ é a temperatura crítica para armazenamento de longo prazo de materiais biológicos.
- $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é suficiente para a maioria das bactérias e fungos para armazenamento de curto prazo (5 anos ou menos)

3. Etapa de Descongelamento

Assim como o processo de congelamento, o descongelamento também é danoso às células microbianas e, para amenizar o dano, deve ser realizado adequadamente. As duas técnicas mais recomendadas para a reativação de cepas são a fragmentação e o descongelamento total.

A fragmentação consiste em retirar o tubo do freezer e colocar em gelo fragmentado como uma “cama de gelo”. Abrir o tubo e retirar uma alçada do material congelado e inocular diretamente nas placas com meio de cultura adequado ou em tubos com meio líquido enriquecido e incubar por 18 – 24 horas a $35 + \text{ou} - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O descongelamento deve ser rápido até 37°C . O tubo congelado deve ser imediatamente devolvido ao freezer.

O descongelamento total do tubo – descongelar em banho-maria a $35\text{ a }37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com a tampa do tubo desrosqueada devido à variação de pressão. Retirar uma alçada do conteúdo do tubo tão logo ele descongele e semear em placas com ASA ou tubos com BHI. Incubar placas ou tubos durante 18 a 24 horas a $35 + \text{ou} - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No caso de tubos com miçangas, retirar uma miçanga com o tubo ainda congelado e devolvê-lo imediatamente ao freezer.

4. Preparo do lote de estoque 1.

- Para iniciar essa etapa, é importante verificar a procedência da cepa e sua geração atual.
- O lote de estoque 1 deve ser preparado a partir do lote de referência, constituindo, assim, a 2ª geração/passagem.
- Os tubos com o lote de referência/cultura original não devem ser manipulados até que o lote de estoque 1 e, posteriormente, o lote de estoque 2 sejam necessários, levando em consideração o prazo do lote de referência/cultura original.
- **Ao final dessa etapa, os tubos com o crescimento da cepa constituem o Lote de estoque 1, caracterizando a primeira 2ª geração.**

5. Preparo da cepa de estoque 2

- A partir do crescimento do repique da cultura original, inocular a quantidade de tubo possível em tubos contendo BHI com glicerol a 30%, identificando como lote de estoque 1 (1ª geração/passagem).
- Armazenar no freezer a -70 °C.
- O lote de estoque 2 é preparado a partir de 1 tubo do lote de estoque, gerando, assim, a 3ª geração/passagem. Para isso, utilizam-se os mesmos passos para fazer o lote de estoque 1.
- Quando o último tubo do lote de estoque 1 for utilizado, deve ser para preparar o lote de estoque 2, que corresponde a 2ª geração/passagem. Esse processo pode ser realizado antes, e os dois lotes podem ser armazenados ao mesmo tempo em freezer a -70 °C.
- **Ao final dessa etapa, os tubos com o crescimento da cepa constituem o Lote de estoque 2, caracterizando a primeira 3ª geração.**

6. Preparo do lote de trabalho

- O lote de trabalho é proveniente de um lote de estoque.
- A partir de um tubo do lote de estoque, inocular e estriar em placas com ASA ou meio recomendado para a cepa.
- Inocular o crescimento das tubos com meio BHI ágar inclinado.
- Incubar durante 18 a 24 horas a 35 + ou - 2 °C.

- Armazenar sob refrigeração a 2 – 8 °C.
- Ao usar o tubo do lote de trabalho para o controle de qualidade interno, repique a cepa em placas de ASA ou outro meio recomendado para a cepa.
- Usar um tubo para cada semana.

Precauções e limitações

- Verifique na ficha de informação do produto se os microrganismos não contêm quaisquer substâncias perigosas listadas no 67/548/EEC ou listadas no 1272/2008/EC.
- Consulte a Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos (SDS em inglês) para informações mais detalhadas. A SDS pode ser encontrada no nosso website www.microbiologics.com ou entrando em contato com o suporte técnico do produto.
- Esses produtos assim como o crescimento desses micro-organismos são considerados materiais de risco biológico.
- Esses produtos contêm microrganismos viáveis que podem causar doenças. Devem ser utilizadas técnicas adequadas para evitar exposição e contato com qualquer crescimento de microrganismos.
- O laboratório de microbiologia deve ser equipado e ter as instalações necessárias para receber, processar, manter, armazenar e descartar materiais de risco biológico.
- Apenas pessoal de laboratório treinado deve usar esses produtos.
- As agências e os estatutos regulamentam o descarte de todos os materiais de risco biológico. Cada laboratório deve estar ciente e cumprir com o descarte adequado de materiais de risco biológico.
- Uma possível degradação do micro-organismo pode ocorrer ao longo do tempo e pode afetar o valor certificado.

Observação

Não há uma padronização em literatura sobre a validade de cepas congeladas; muitos microrganismos mantêm suas características fenotípicas, genotípicas e de sensibilidade antimicrobiana por mais de 1 ano, alguns por períodos menores e outros por períodos muito maiores. Sugere-se que o tempo de manutenção e armazenamento das cepas seja padronizado por seu laboratório, considerando as variações de temperatura do equipamento utilizado. A tabela 2 mostra os métodos de estocagem distribuídos por microrganismos.

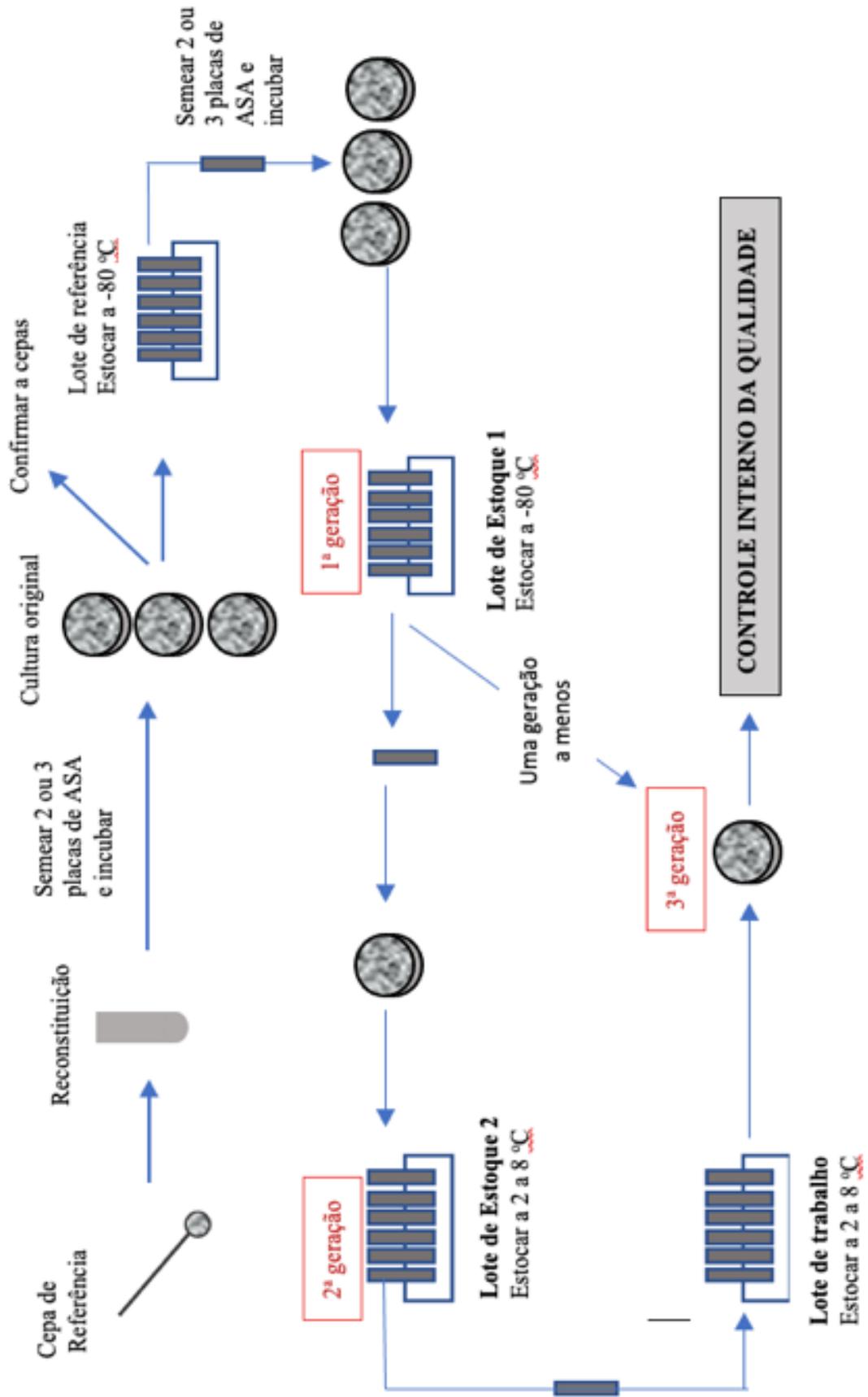
Tabela 2, Métodos de estocagem por microrganismos.

MICROORGANISMOS	MÉTODO DE ESTOCAGEM	CRIOPROTETORES	TEMPERATURA DE ESTOCAGEM °C	TEMPO DE PRESERVAÇÃO
Bactérias Gram (+)	Freezer	Glicerol ou leite desnatado	-20	1-3 anos
	Freezer	Glicerol ou leite desnatado e sacarose	-70 a -196	1 a 30 anos
	Liofilização	Leite desnatado e sacarose	2 a 8	30 anos
	Óleo mineral	Nenhum	2 a 8	6 meses a 2 anos
	Subcultivos	Nenhum	Temperatura ambiente	2 a 3 meses
Bactérias esporuladas	Subcultivos	Nenhum	Temperatura ambiente	2 meses a 1 ano
	Óleo mineral	Nenhum	2 a 8	1 ano
	Freezer	Glicose	-20	1 a 2 anos
	Freezer	Glicose ou leite desnatado	-70 a -196	2 a 30 anos
	Liofilização	Leite desnatado e lactose	2 a 8	30 anos
	Papel de filtro	Nenhum	2 a 8	4 anos
<i>Staphylococcus spp</i>	Freezer	Leite desnatado	-20	2 meses
	Freezer	Leite desnatado	-70 a -196	2 meses a 1 ano
	Liofilização	Leite desnatado	2 a 8	6 meses a 30 anos
Micobactérias	Freezer	Leite desnatado	-20	3 a 5 anos
	Freezer	Leite desnatado	-70 a -196	3 a 5 anos
	Liofilização	Leite desnatado	2 a 8	16 a 30 anos
Bactérias Gram (+)	Freezer	Glicerol ou leite desnatado	-20	1-3 anos
	Freezer	Glicerol ou leite desnatado e sacarose	-70 a -196	1 a 30 anos
	Liofilização	Leite desnatado e sacarose	2 a 8	30 anos
	Óleo mineral	Nenhum	2 a 8	6 meses a 2 anos
	Subcultivos	Nenhum	Temperatura ambiente	2 a 3 meses
Bactérias esporuladas	Subcultivo	Nenhum	Temperatura ambiente	2 meses a 1 ano
	Óleo mineral	Nenhum	2 a 8	1 ano
	Freezer	Glicose	-20	1 a 2 anos
	Freezer	Glicose ou leite desnatado	-70 a -196	2 a 30 anos
	Liofilização	Leite desnatado e lactose	2 a 8	30 anos

MICROORGANISMOS	MÉTODO DE ESTOCAGEM	CRIOPROTETORES	TEMPERATURA DE ESTOCAGEM °C	TEMPO DE PRESERVAÇÃO
	Papel de filtro	Nenhum	2 a 8	4 anos
<i>Staphylococcus spp</i>	Freezer	Leite desnatado	-20	2 meses
	Freezer	Leite desnatado	-70 a -196	2 meses a 1 ano
	Liofilização	Leite desnatado	2 a 8	6 meses a 30 anos
Micobactérias	Freezer	Leite desnatado	-20	3 a 5 anos
	Freezer	Leite desnatado	-70 a -196	3 a 5 anos
	Liofilização	Leite desnatado	2 a 8	16 a 30 anos
Bacilos Gram (-)	Freezer	Leite desnatado, sacarose lactose	-20	1 a 2 anos
	Freezer	Leite desnatado, sacarose lactose e glicose	-70 a -196	2 a 30 anos
	Óleo mineral	Nenhum	2 a 8	1 a 2 anos
	Liofilização	Leite desnatado, sacarose lactose	2 a 8	30 anos
	Subcultivo	Nenhum	Temperatura ambiente	1 a 3 meses
<i>Legionella</i>	Freezer	Glicerol a 20%	-70 a -196	10 anos
Leveduras	Água destilada	Nenhum	Temperatura ambiente	1 a 2 anos
	Freezer	Glicerol, DMSO	-70 a -196	2 a 30 anos
	Liofilização	Meio nutriente	2 a 8	30 anos
Fungo filamentoso	subcultivo	Nenhum	Temperatura ambiente	2 a 10 anos
	Papel filtro	Nenhum	2 a 8	4 anos
	Água destilada	Nenhum	Temperatura ambiente	1 a 10 anos
	Óleo mineral	Nenhum	Temperatura ambiente	1 a 40 anos
	Freezer	Glicerol, DMSO	-70 a -196	2 a 30 anos
	Liofilização (formadores de esporo)	Glicerol, DMSO Leite desnatado, sacarose	2 a 8	2 a 30 anos

Fonte: Oplustil et al, 2020

Figura 1 - Esquema técnico para o manuseio de cepas de referências



REFERÊNCIAS:

ATCC, American Type Culture Collection. **Bacteriology Culture Guide**. www.atcc.org, acesso em 11/07/2022.

BrCAST, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**. Versão 9.0, jan. 2021 do EUCAST. Versão para o português em 24 jun. 2021. Disponível em: <http://brcast.org.br/>. Acesso em: 7 set. 2020.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for bacteria That Grow Aerobically. 13th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 10.0 (January 2022). <https://www.eucast.org>.

LEBER, Amy L. Clinical microbiology procedures handbook. John Wiley & Sons, 2020. OPLUSTIL, Carmen Paz et al. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. São Paulo: Sarvier, v. 544, 2020.

ROSEMARY C. SHE AND SUSAN M. BUTLER in ____ Manual of clinical microbiology, CARROLL, Karen C. et al. . American Society for Microbiologists – AMS, John Wiley & Sons, 12a Edition, 2019.

WFCC - World Federation For Culture Collections. Establishment And Operation Of Collections Of Cultures Of Microorganisms, 3rd Edition, February 2022.