

# Viabilidade das cepas de micobactérias conservadas à temperatura ambiente e à $-70^{\circ}\text{C}$

Adriana H. WATANABE, Roseli A. CREDIDIO, Carmen Maria S. GIAMPAGLIA, Maria Conceição MARTINS, Lucilaine FERRAZOLI, Suely Y.M. UEKI.  
Instituto Adolfo Lutz – Divisão de Biologia Médica - Setor de Micobactérias

O desenvolvimento de métodos para a manutenção de cepas de microrganismos tem sido muito valorizado nesta última década, pois desta dependem as pesquisas genéticas e o conhecimento da biodiversidade. Além disso, o laboratório clínico que utiliza cepas em suas análises deve manter uma coleção de culturas para eventuais esclarecimentos de diagnóstico ou epidemiologia. O método de manutenção deve ser escolhido conforme a necessidade e as condições disponíveis no local. Existem diversos métodos já padronizados para manutenção de cepas bacterianas, entre eles: subcultivo em meios de culturas apropriados, secagem a vácuo, liofilização e congelamento entre  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$  <sup>1,2</sup>.

O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade das cepas de micobactérias do Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz-Laboratório Central, mantidas por um ano, em meio de Lowenstein-Jensen (LJ) à temperatura ambiente (TA) e em miçangas de vidro à  $-70^{\circ}\text{C}$  umedecidas com meio de Sauton acrescido de 10% de glicerol.

Rotineiramente, as cepas de micobactérias submetidas ao teste de suscetibilidade às drogas e identificação das espécies são repicadas em 2 ml de meio de LJ contido em frascos de vidro de 5 ml com tampa de rosca e mantidos à TA. Concomitantemente, estas cepas são congeladas à  $-70^{\circ}\text{C}$  em tubos tipo eppendorf contendo miçangas de vidro umedecidas com meio de Sauton com 10% de glicerol.

Este estudo foi realizado em duas etapas:

1ª) Foram subcultivadas 375 cepas da rotina laboratorial do setor, mantidas em LJ à TA. Antes de realizar os subcultivos, as culturas foram classificadas de acordo com o aspecto macroscópico como: Boa(B)= LJ íntegro, com a sua cor característica e as colônias confluentes e íntegras; Ruim+(R+)= LJ parcialmente ressecado nas bordas, coloração parcialmente alterada e colônias parcialmente conservadas; Ruim++(R++)=LJ totalmente ressecado, com a cor alterada e as colônias parcialmente conservadas; Ruim +++(R+++)= LJ totalmente ressecado, com a cor totalmente alterada e as colônias totalmente ressecadas e aderidas às paredes do vidro. Para a reativação das culturas em meio de LJ, preparou-se uma suspensão com adição de 1 ml de água destilada estéril em cada frasco e

homogeneização com um swab. Duas gotas dessa suspensão foram semeadas em tubos de 15x150mm com meio de LJ, incubados a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 30 dias.

Das 375 cepas, 4 contaminaram e 243 (65,5%) foram recuperadas. Entre as 128 cepas que não cresceram, 109 (85,2%) apresentavam meios com aspecto R+++ (Tabela 1).

2ª) Para o estudo comparativo da viabilidade com os dois métodos, dentre as 375 cepas acima citadas, foram subcultivadas 184, também mantidas à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Com auxílio de uma alça descartável, foram retiradas duas miçangas de vidro de cada eppendorf, passadas sobre a superfície do meio de LJ contidos em tubos de 15x150mm e incubados à  $37^{\circ}\text{C}$ , por 30 dias.

Das 184 cepas congeladas, 181 (98,4%) foram recuperadas. Comparando os resultados dos subcultivos das 184 cepas conservadas com os dois métodos, 101 (55,0%) foram recuperadas apenas das miçangas (Tabela 2).

A maioria dos laboratórios da Saúde Pública encontra dificuldades para manutenção das cepas em razão do limitado espaço físico ou pela falta de equipamentos sofisticados como liofilizador ou freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Os resultados desse estudo demonstraram que a manutenção das cepas congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em miçangas se mostrou mais eficiente, uma vez que 98,4% delas puderam ser recuperadas. Por outro lado, analisando os repiques das cepas conservadas à TA, obteve-se uma recuperação de 65,5%. Os laboratórios que não dispõem de um freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  poderiam implantar este sistema (LJ à TA), mas utilizando 4 ml de meio ao invés de 2 ml, com objetivo de evitar o ressecamento dos mesmos e fazer pelo menos um repique a cada seis meses.

## REFERÊNCIAS

1. Kirsop, B.E; Doyle, A. **Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods.** Second Edition. Academic Press Limited, London, 1991, 308 p.
2. **Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms.** World federation for culture collection. 2<sup>nd</sup> edition, June 1999, 24 p.

**Tabela 1.** Frequência de recuperação das cepas mantidas à temperatura ambiente segundo qualidade da cultura inicial

Aspecto da cultura	N° Total (n=371*)	N° (%) cepas	
		Cresceram n=243 (65,5)	Não cresceram n=128 (34,5)
B	137	127 (52,3)	10 (7,8)
R+	28	24 (9,9)	4 (3,1)
R++	36	31 (12,7)	5 (3,9)
R+++	170	61 (25,1)	109 (85,2)

\* 4 culturas das 375 iniciais contaminaram.

Boa(B)= quando o meio de LJ estava íntegro, com a sua cor característica e as colônias confluentes e íntegras.

Ruim+(R+)= quando o meio de LJ estava parcialmente ressecado nas bordas, a coloração do meio parcialmente alterada, as colônias parcialmente conservadas.

Ruim++(R++)=quando o meio estava totalmente ressecado, sua cor alterada e as colônias parcialmente conservadas.

Ruim +++(R+++)= quando o meio se apresentava totalmente ressecado, sua cor totalmente alterada e as colônias totalmente ressecadas e aderidas às paredes do vidro.

**Tabela 2.** Crescimento dos repiques das cepas congeladas à -70°C em miçangas com relação às mantidas em meio de Lowenstein Jensen, à temperatura ambiente.

Lowenstein-Jensen à Temperatura ambiente	Miçangas à - 70°C		N° Total (%)
	Cresceram N° (%)	Não cresceram N° (%)	
Cresceram	80 (43,5)	2 (1,0)	82 (44,5)
Não cresceram	101 (55,0)	1 (0,5)	102 (55,4)
Total	181 (98,4)	3 (1,6)	184 (100,0)