

Finalidade:

Manutenção e conservação de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos

Apresentação:

570202 - CRIOTUBO-TSB/GLICEROL-1mL-CX 8TB

LB 172245

Rev. 06 – 06/2024

1. INTRODUÇÃO

O laboratório de microbiologia deve assegurar a qualidade de todos os processos, insumos e equipamentos utilizados no processamento de amostras, com o intuito de que os resultados sejam os mais fidedignos possíveis.

A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas, tendo como principal objetivo a redução de injúrias aos materiais biológicos, incluindo células animais e vegetais, bactérias, fungos, vírus e tecidos, durante o processo de congelamento e estocagem a frio.

O congelamento comum se baseia na conservação de agentes em temperaturas relativamente baixas entre -4°C e -80°C. Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos microrganismos por períodos que podem variar de três meses a maior de dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular.

Considerando as altas taxa de sobrevivência de microrganismos que a criopreservação proporciona, pesquisadores buscam aprimorar a técnica quanto a sua utilização, principalmente pelo aspecto prático, visto a recuperação e obtenção de células viáveis, mas também na redução de possíveis mutações genéticas. Entretanto, faz-se necessário frisar que os protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica acessível e aplicável para a diversidade de microrganismos existentes.

Estudos mostram que a utilização do glicerol, como crioprotetor, melhora significativamente a recuperação e a qualidade das amostras, mesmo dos microrganismos fastidiosos, quando mantidos congelados por longos períodos.

2. COMPOSIÇÃO

Formulação	Concentração/L
Digesto pancreático de caseína	17g
Digesto papainico de soja	3g
Cloreto De Sódio	5g
Fosfato Dipotássico	2,5g
Dextrose	2,5g
Glicerol	170mL
Água purificada qsp.	1000 mL
Pérolas	12/tubo
pH 7,3± 0,2 a 25°C	

A formulação pode ser ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho do produto.

3. AMOSTRA**a- Tipos de amostras**

cepas ATCCs ou derivadas e isolados clínicos, fastidiosos ou não.

4. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO**a- Princípio**

Os microrganismos podem ser conservados por longos períodos, e para que não haja perda de suas características, devem ser congelados. A presença do agente crioprotetor envolve as células, protegendo-as contra o descongelamento.

As pérolas promovem a adesão dos microrganismos, principalmente dos fastidiosos, favorecendo a recuperação destes.

b- Armazenamento e estabilidade

Este produto deve ser conservado em temperatura de 9 a 25°C. Nestas condições mantém-se estável até a data de utilização, conforme a validade expressa em rótulo, desde que a embalagem

esteja íntegra e que o produto esteja isento de contaminação química e biológica.

c- Precauções e cuidados especiais

- O produto destinado apenas para o uso diagnóstico *in vitro*;
- Uso restrito por profissionais;
- Mesmo se tratando de produto livre de agentes infecciosos, recomenda-se tratar este produto como potencialmente infeccioso, observando o uso de equipamentos de proteção individual e coletivo;
- Não inalar ou ingerir;
- Não utilizar o produto com sinais de contaminação, ressecamento ou com alterações de cor ou espessura;
- Não usar materiais com o prazo de validade expirado, ou que apresentem selo de qualidade rompido ou violado;
- Recomenda-se a leitura da diretriz aprovada para "Proteção de Trabalhadores de Laboratório e Infecções Obtidas no Trabalho - CLSI® M29-A" para o manuseio seguro;
- Para acondicionamento e descarte do material usado, autoclavar a 121°C por 20 minutos. Recomendamos o uso dos sacos DetriLab.
- Os procedimentos de manuseio referentes ao processamento e manuseio para o descarte deverá estar de acordo com a RDC 222, DE 28 DE MARÇO DE 2018 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

5. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen;
- Meio sólido para isolamento;
- Freezer.

6. PROCEDIMENTO TÉCNICO**- Congelamento**

a- Realizar uma suspensão com densidade alta (esbranquiçada e turva) com a cepa a ser conservada no Criotubo, homogeneizar, preferencialmente em vórtex, para evitar grumos.

b- Retirar o meio líquido, deixando apenas as pérolas.

c- Congelar em freezer (-20°C a -80°C).

* Sugere-se que sejam feitos vários tubos para cada cepa a ser congelada.

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 sejam padronizados por seu laboratório, considerando as variações de temperatura do equipamento utilizado e a estabilidade para determinação do tempo ideal para armazenamento, conforme ANEXO 1 - Tabela – Estudo de Estabilidade para Determinação do Tempo Ideal de Armazenamento.

- Sugere-se que, após 1 ano de armazenamento, as cepas sejam reativadas e testadas, definindo um período de validade para cada microrganismo arquivado. A escolha da temperatura de armazenamento influencia na validade das cepas congeladas, validades maiores são esperadas quando as cepas são armazenadas em temperaturas menores, por exemplo: prazos

maiores de validades são esperados quando a cepa é armazenada em temperatura de -80°C, quando comparado ao armazenamento à -20°C.

- Bactérias fastidiosas são mais sensíveis ao congelamento, como, por exemplo, *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae*, neste caso é indicado a adição de sangue de carneiro desfibrinado (10%) à suspensão.

- Para alguns microrganismos é necessário adicionar antimicrobiano, p.ex., penicilina (1µg/mL) para *N. gonorrhoeae* produtora de penicilinase, ou para bactérias produtoras de ESBL onde existe risco de perda de plasmídeos.

- Descongelamento

a- No momento do uso, retirar uma miçanga do Criotubo e inocular diretamente em meio não seletivo ou dispensar a pérola em caldo enriquecedor (BHI, p. ex.).

b- Levantar o Criotubo imediatamente para o freezer para evitar descongelamento das outras pérolas.

c- Incubar o material conforme exigências do microrganismo.

- Manutenção

a- A remoção da parte líquida antes do congelamento é primordial para o desempenho do produto.

A criopreservação requer alguns cuidados para que seja realmente eficiente. Diversos fatores podem afetar a viabilidade e estabilidade celular, no entanto os danos celulares são decorrentes principalmente do comportamento da água sob condições de baixas temperaturas. A crioinjúria ou lesão celular causada durante os processos de congelamento e descongelamento é um processo letal relacionado à formação de extensos cristais de gelo intracelular e estes são capazes de alterar as estruturas da membrana plasmática, modificando o fluxo de água para o meio extracelular (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos.

b- As cepas devem ser utilizadas no máximo até a 5ª passagem, do cultivo original, para minimizar a contaminação e o potencial de mutação e surgimento de linhagens diferentes da original, sempre considerando que, a cada repique, as cepas podem perder atividade e características natas.

c- Aconselha-se fazer coloração de Gram e reações bioquímicas de identificação a cada transferência.

- Validade

A validade dos tubos após inoculados, fica a critério dos procedimentos do laboratório, sempre considerando as temperaturas de armazenamento e do perfil estrutural do microrganismo armazenado. Ver ANEXO 1 - Tabela – Estudo de Estabilidade para Determinação do Tempo Ideal de Armazenamento.

7. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

(Riscos Residuais Identificados conforme RDC 35/2015)

Os resultados falsamente positivos ou negativos podem ocorrer, com maior frequência, nas seguintes situações:

- Utilização de cepa em condições inadequadas, como cultivos com mais ou com menos de 24 horas, por exemplo;
- Incubação em temperatura inadequada;
- Utilização de agulha flambada não resfriada;
- Não remoção do meio líquido após inoculação microbiana no criotubo;
- Inóculos sobrecarregados ou com carga microbiana baixa podem apresentar resultados inadequados;
- Técnica de assepsia inadequada;
- Tempo excessivo ou insuficiente de incubação;
- Utilização de material vencido, contaminado ou em condições inadequadas;
- Contaminação cruzada por uso de acessórios não esterilizados corretamente ou ambiente não asséptico;
- Seleção de colônia mista; é necessário garantir a seleção de colônias puras;
- Cultura primária ou cultura de recuperação utilizando meio de cultura inadequado;
- Não aguardar para que os materiais atinjam a temperatura ambiente no momento do uso;
- Manipulação ou conservação inadequada do criotubo.

8. CONTROLE DA QUALIDADE

- Materiais necessários

Cepas padrão: ATCC® (American Type Culture Collection) ou derivadas).

- Controle de qualidade recomendado:

Parâmetro	Incubação	Resultado esperado
Produtividade qualitativa <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	33-37°C / 18-24h	Crescimento bom
Produtividade qualitativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	33-37°C / 18-24h	Crescimento bom
Produtividade qualitativa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	33-37°C / 18-24h	Crescimento bom
Meio não inoculado		Meio líquido translúcido, com coloração levemente amarelada, homogêneo e livre de precipitados ou partículas visíveis.

** Adicionado 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

- Periodicidade

Testar a cada novo lote recebido ou em periodicidade estabelecida pelo próprio laboratório.

- Análise dos resultados

As cepas inoculadas no material devem apresentar características de crescimento esperados. Caso se constate algum problema ou diferença, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

9. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário que:

- O usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;

- Os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas;

- Os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser obtidos no site www.laborclin.com.br. Em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, entrar em contato com o SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente através do telefone 0800-0410027 ou pelo e-mail sac@laborclin.com.br. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

10. REFERÊNCIAS

1. ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004.
2. APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v.27, p.421-424, 2001.
3. BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 91, p. 715- 724, 2001.

**Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda**

CNPJ 76.619.113/0001-31

Insc. Estadual 1370012926

Rua: Casimiro de Abreu, 521

Pinhais/PR CEP 83.321-210

Telefone: (41) 3661-9000

www.laborclin.com.br**Responsável Técnico:**

Maire Wakamori – CRF/PR-20176

Serviço de Assessoria ao Cliente

SAC 0800-0410027

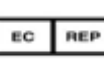
sac@laborclin.com.br

4. BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 91, p. 715-724, 2001.
5. 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.
6. DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press, 1995.
7. DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 3, p. 268-272, 2004.
8. DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press, 1995.
9. FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. New York, v. 60, sup.3, p. 45-53, jul. 2010.
10. FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.
11. FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology*. New York, v. 60, sup.3, p. 45-53, jul. 2010.
12. FARMACOPEIA BRASILEIRA 5º ed. ANVISA, Brasília, 2010.
13. HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.
14. Koneman, Elmer; *et al.* Diagnostic Microbiology. Lippincott, USA, 5th ed., 1997.
15. MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. *Cryobiology*, New York, v. 4, n. 3, p. 251-255, nov./ 2000.
16. MORRIS, G. J.; GOODRICH, M.; ACTON, E.; FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. *Cryobiology*, New York, v. 52, p. 323-334, 2006.
17. MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, Baltimore, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
18. MEDEIROS, A. W. Acompanhamento de métodos de congelamento de bactérias. 2008. 32p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina – Centro Universitário Feevale).
19. MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, NAKAHARA T. Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24, feb./ 2008.
20. PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". *Biológico*, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.
21. PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos – Séries em Biotecnologia, v. 1. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.
22. ROMEIRO, R. S. Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.
23. 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.
24. UHLENHAUT, C.; DÖRNER, T.; PAULI, G.; PRUSS, A. Effect of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. *Biomaterials*, Surrey, v. 26, p. 6558-6564, 2005.
25. WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.
26. ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International*, London, v. 12, p. 77-84, feb. 2006.

ANEXO 1 - Tabela – Estudo de Estabilidade para Determinação do Tempo Ideal de Armazenamento.

	ATCC®	NCTC®	ISOLADO CLÍNICO	TEMPO RECOMENDADO PARA ARMAZENAMENTO, EM MESES, GARANTINDO RECUPERAÇÃO ≥ 90%		TEMPO RECOMENDADO PARA ARMAZENAMENTO EM MESES, GARANTINDO RECUPERAÇÃO DE 100%	
				- 20°C	- 80°C	- 20°C	- 80°C
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	13420	-	84	122	36	60
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	X	26	84	36	60
<i>Bacillus cereus</i>	14579	-	-	84	122	36	60
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	10400	-	30	104	36	60
<i>Burkholderia cepacia</i>	17460	10661	-	90	122	36	60
<i>Campylobacter jejuni</i>	33560	12662	-	3	45	6	6
<i>Candida albicans</i>	90028		-	96	144	12	60
<i>Citrobacter freundii</i>	33128	8581	-	84	122	36	60
<i>Clostridium difficile</i>	43255	13307	-	60	102	36	60
<i>Clostridium perfringens</i>	3624	8798	-	48	108	24	60
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	13812	-	-	78	122	36	60
<i>Cryptococcus neoformans</i>	14116	-	-	27	102	12	60
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	13406	-	80	119	36	60
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	5957	-	96	122	36	60
<i>Escherichia coli</i>	25922	12241	-	19	106	12	60
<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	-	-	6	102	2	60
<i>Klebsiella aerogenes</i>	13048	11677	-	72	122	36	60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	43816	13438	-	49	111	24	60
<i>Listeria monocytogenes</i>	35152	10890	-	84	122	36	60
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	X	82	112	36	60
<i>Morganella morganii</i>	25829	-	-	84	122	36	60
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	49498	13820	-	4	18	2	12
<i>Proteus mirabilis</i>	43071	10975	-	29	104	12	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	12924	-	21	112	12	60
<i>Salmonella typhimurium</i>	202165	12023	-	82	124	36	60
<i>Serratia marcescans</i>	14756	10211	-	51	122	24	60
<i>Shigella sonnei</i>	29930	12984	-	89	104	36	60
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	10788	-	33	116	24	60
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	11964	-	87	132	36	60
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	-	-	8	114	24	60
<i>Vibrio cholerae</i>	14033	8042	-	84	122	36	60
<i>Yersinia</i> spp.	11953	11470	-	82	122	36	60

ANEXO 2 – LISTA DE SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Código do produto		Número de lote
	Número de série		Fabricante
	Consultar instruções para utilização		Validade
	Temperatura de armazenagem (limite de temperatura)		Produto para saúde para diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Não utilizar se a embalagem estiver danificada		Representante autorizado na Comunidade Européia
	Quantidade suficiente para <n> ensaios		Frágil, manusear com cuidado
	Esterilizado utilizando técnicas assépticas de processamento		Esterilização utilizando óxido de etileno
	Esterilização utilizando irradiação		Esterilizado utilizando vapor ou calor seco.
	Risco biológico		Cuidado. Importante consultar instruções de uso.
	Controle		Controle Negativo
	Controle Positivo		Manter seco
	Manter afastado da luz solar e longe do calor		Somente para avaliação de desempenho
	Não utilizar		Não reesterilizar

Fonte: ABNT NBR ISO 15223-1 – Terceira edição (24.08.2022)