

ESTIRPES BACTERIANAS-PADRÃO, FORMAS DE OBTENÇÃO DE DOAÇÃO E SUA MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIOS DE ENSINO E PESQUISA

ESTIRPES STANDARD BACTERIAL STRAINS, WAYS OF OBTAINING DONATION AND MAINTENANCE IN TEACHING AND RESEARCH

Larissa Pereira Brumano*, Fabiola Fonseca Ângelo**, Lillian Henriques do Amaral***, Cláudia Lúcia Oliveira Pinto****, Josete Amadeu de Almeida#, Miriam Aparecida Oliveira Pinto##

RESUMO

Boas Práticas de Laboratório (BPL) referem-se ao sistema da qualidade que contribui para a garantia da qualidade dos resultados. Essas práticas incluem o uso de estipes padrão para o controle do desempenho de meios de cultura, corantes e de reações. Estirpes padrão ou bactérias de referência são culturas provenientes de uma coleção de culturas reconhecida nacional e/ou internacionalmente, acompanhadas de um certificado com a descrição de suas características fenotípicas e genotípicas e outras informações relevantes. A conservação de suas características originais e viabilidade são requisitos essenciais para a sua reprodução em processos industriais e em experimentos de pesquisa. O objetivo deste trabalho foi reunir e disponibilizar informações sobre as formas de obtenção de doação de estipes-padrão para laboratórios de ensino e pesquisa e sobre a sua manutenção. Foram reunidas informações por meio de pesquisa bibliográfica sobre instituições doadoras de estirpes padrão, e formas de reativação e manutenção. A disponibilização deste material possibilita o cumprimento das BPL e a qualidade em trabalhos desenvolvidos.

PALAVRAS-CHAVE

Estirpes-Padrão. Laboratórios. Microbiologia. Manutenção.

ABSTRACT

Good Laboratory Practices (GLP) refer to the quality system that contributes to guarantee the quality of research results, including the use of standard strains to control the performance of culture media, dyes, and reactions. Standard strains or reference bacteria are cultures originated from a collection of cultures nationally and/or internationally recognized, followed by a certificate describing their phenotypic and genotypic characteristics and other relevant information. The preservation of their original characteristics is one of the essential requirements for their viability, important for their reproduction in industrial processes and in pure and applied research experiments. The objective of this work was to compile and disseminate information on the ways of obtaining donation of standard strains to teaching and research laboratories and their maintenance in microbiological analysis laboratories. Through a bibliographic survey, information was compiled on institutions that donate reference material and on methods of standard strain reactivation and adequate maintenance. The availability of this material through donations and adequate maintenance according to laboratory conditions allow fulfilling GLP requirements and the quality of the works developed.

KEYWORDS

Standard Strains. Laboratories. Microbiology. Maintenance.

Correspondence author: Larissa Pereira Brumano. Avenida Presidente Itamar Franco, 714/1601, Centro, CEP: 36010-020, Juiz de Fora – MG/Brasil. Telefone: (32) 3231 0556. larissabrumano@gmail.com.

* Graduanda em Farmácia pela Universidade Federal de Juiz de Fora. larissabrumano@gmail.com.

** Médica Veterinária. D.Sc., Professora Adjunta I da Universidade Presidente Antônio Carlos. Campus VI.

*** Graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

**** Farmacêutica Bioquímica, D.Sc., Pesquisadora EPAMIG-UREZM.

Farmacêutica Bioquímica, Mestranda em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Farmacêutica Bioquímica, D.Sc., Professora da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Received: 10/2011

Accepted: 11/2011

1 INTRODUÇÃO

Boas práticas de laboratório (BPL) referem-se ao sistema da qualidade relativo à organização e às condições sob as quais os estudos em laboratório e no campo são planejados, realizados, monitorados, registrados, relatados e arquivados (ANVISA, 2001; INMETRO, 1995). Os laboratórios de ensino e pesquisa em microbiologia devem adotar as BPL para garantir a qualidade dos seus resultados. Dentre as boas práticas recomendadas, destaca-se o uso de estipes-padrão para o

controle do desempenho de meios de cultura, corantes e de reações (MARTINS et al., 1997). Estirpes-padrão ou bactérias de referência são culturas provenientes de uma coleção de culturas reconhecida nacional e/ou internacionalmente, acompanhadas de um certificado contendo a descrição de suas características fenotípicas e genotípicas e outras informações relevantes (BRASIL, 2000; INCQS, 2008). Considera-se cepa um grupo de microrganismos da mesma espécie com características genéticas e bioquímicas distintas. São termos sinônimos linhagens ou estirpes (BRASIL, 2003), sendo estirpe o termo o mais utilizado em artigos científicos.

Para a reposição dos cultivos bacterianos é necessária a conservação de suas características originais, sendo este um dos requisitos essenciais a serem cumpridos por toda instituição cuja atividade depende da disponibilidade destes microrganismos. Preservar os cultivos sem alterações e com altos títulos de viabilidade facilita a reprodução de processos industriais e de experimentos de pesquisa básica ou aplicada (FLOCCARI, 1998).

Durante o armazenamento as culturas bacterianas, incluindo as puras, estão sujeitas a alterações genotípicas, que resultam em modificações da sua atividade fisiológica ou de sua morfologia. Em consequência, os métodos mais eficientes para o armazenamento são aqueles que minimizam estes riscos, por não permitirem o crescimento celular e suprir a atividade biológica. Não existe um método universal totalmente eficaz para a conservação de todas as estirpes bacterianas. Diferentes grupos taxonômicos e ainda estirpes da mesma espécie, respondem com diferenças consideráveis às condições a que são submetidas durante o armazenamento e reativação (FLOCCARI, 1998).

Existem, aproximadamente, 470 coleções de culturas de microrganismos e células registradas no Centro Internacional de Dados da Federação Mundial de Coleções de Culturas.

Dentre estas, cerca de 20 coleções abrangentes podem ser enquadradas como coleções de serviço e contam com forte respaldo governamental (CANHOS, 2003). Como exemplos incluem-se a *American Type Culture Collection - USA* (ATCC), a *National Culture Type Collection* – Inglaterra (NCTC), a Coleção de Culturas Oswaldo Cruz/Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Rio de Janeiro (IOC/INCQS), entre outras (BRASIL, 2000). A obtenção comercial destas culturas é onerosa considerando-se a variedade de culturas necessárias para a rotina de um laboratório de microbiologia de alimentos. A falta de conhecimentos sobre métodos de manutenção aumenta a dificuldade do cumprimento das boas práticas no que se refere ao uso de culturas-padrão. Por este motivo muitos laboratórios não adotam este procedimento ou o adotam de forma errada, com necessidade de adquirir a estirpe-padrão com maior frequência. Algumas instituições fazem a doação de estirpes-padrão para laboratórios de ensino e pesquisa mediante solicitação, porém com algumas restrições.

O objetivo deste trabalho foi reunir e disponibilizar informações sobre as formas de obtenção de doação de estirpes-padrão para laboratórios de ensino e pesquisa e de sua manutenção no laboratório de análises microbiológicas.

2 MATERIAIS E MÉTODO

A pesquisa da literatura foi realizada em artigos na base de dados da *Commonwealth Agricultural Bureaux International (CAB)*, *Food Science Technology Abstracts (FSTA)*, **MEDLINE-PUBMED**, **LILACS** e **Scientific Eletronic Library Online (SCIELO)** publicados no período de 1995 a 2009 e selecionados os artigos que continham os critérios de inclusão e as variáveis de interesse. Os termos de inclusão utilizados foram: cepas-padrão, estirpe, boas práticas de laboratório, ATCC, NCTC, manutenção, preservação e microrganismos de referência e controle de qualidade. O levantamento de preços foi realizado por meio de busca na internet e solicitação de orçamento diretamente a cinco empresas que comercializam material de laboratório, no período de março a abril de 2009.

2.1 FORMAS DE OBTENÇÃO DE ESTIRPES-PADRÃO

As estirpes-padrão podem ser adquiridas por meio de compra ou de doação. A forma comercial predominante é a liofilizada, acondicionada em ampola ou frascos de vidro. Encontra-se ainda, comercialmente disponível, a apresentação na forma de alças descartáveis, impregnadas com microrganismos, prontas para o uso (*Culti-Loops*), da marca Oxoid (OXOID). As estirpes-padrão podem ser adquiridas por compra em empresas fornecedoras de material para laboratórios de microbiologia ou em instituições governamentais como o Instituto Nacional de Controle em Saúde – INCQS ou Instituto Adolfo Lutz – IAL (INCQS, 2004; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). No levantamento de preço realizado, os valores de uma ampola contendo 0,5 ml de liofilizado de microrganismos variaram, de acordo com o fornecedor, entre R\$ 82,50 a R\$ 340,00. As culturas são codificadas de acordo com o banco de culturas responsável pela sua identificação e produção. Para o mesmo fornecedor não houve variação de preço em relação a microrganismos diferentes. A doação para instituições de ensino e pesquisa pode ser solicitada a instituições governamentais como o INCQS, Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI e Fundação André Tosello. Observaram-se na literatura, trabalhos realizados com microrganismos doados de outras instituições governamentais como Universidade Federal de Santa Maria UFSM-RS; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista FMVZ UNESP/Botucatu-SP; Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo-SP e Laboratório Central de Saúde Pública LACEN-MA,

de pesquisador para pesquisador (RIBEIRO et al., 2001; SILVEIRA et al., 2007). O INCQS faz doação de microrganismos de referência para instituições de ensino e de pesquisa com atendimento a solicitações de doação por meio de correio eletrônico, solicitação por telefone: (21) 3865-5236, fax: (21) 2290-0915 ou por correspondência destinada ao Departamento de Microbiologia, Avenida Brasil, 4.365, Rio de Janeiro CEP 21.040-900, RJ. O limite de doação é de dez ampolas por semestre e os custos com o transporte são encargos do solicitante. A doação é condicionada à disponibilidade dos materiais (FILLIPPIS, 2009).

A Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) fornece linhagens microbianas para instituições públicas e privadas, sejam de pesquisa, serviços, governamentais, ensino ou indústrias. Por razões de segurança e de saúde pública, as linhagens não são enviadas para endereços particulares. Todas as solicitações deverão ser formalizadas por carta ao CBMAI – Divisão de Recursos Microbianos (DRM) - CPQBA/ UNICAMP, Caixa Postal 6.171, Campinas-SP, CEP: 13081-970, ou fax (19) 3884-7811, com uma explanação breve sobre a utilização pretendida para o material, devidamente assinada por um profissional qualificado e autorizado a manipular a linhagem requerida (CBMAI, 2009; SETTE, 2004). A Fundação André Tosello realiza doação mediante solicitação por meio de contato pelo sítio da instituição (<<http://www.fat.org.br>>). O custo do transporte é encargo do solicitante (CONTI, 2009; FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO, 2009). A Fundação Ezequiel Dias (FUNED) não tem como política a doação e venda de microrganismos, por considerar questões associadas à biossegurança. As doações são disponibilizadas apenas após solicitação institucional em situações em que as instituições estejam vinculadas a projetos de pesquisa. Neste caso é necessária a formalização de termos de compromissos mútuos (DIAS, 2009).

2.2 MÉTODOS RECOMENDADOS DE REATIVAÇÃO DE CULTURAS DE REFERENCIA CERTIFICADA (CRC) NA FORMA LIOFILIZADA

Inicialmente é indicada a verificação visual cuidadosa de cada ampola no ato do seu recebimento para certificar a sua integridade física e características do liofilizado. Se ela não estiver satisfatória, notificar ao banco de origem, para que a estirpe em questão possa ser investigada. Caso esteja satisfatória, deve-se armazenar a cultura liofilizada a temperatura igual ou inferior a 5° C, se não for imediatamente reidratada (ATCC, 2009). A partir das culturas liofilizadas, devem-se preparar culturas em fase estacionária seguindo-se as instruções recomendadas no certificado que acompanha a cultura. A ampola deve ser quebrada no local marcado para ser serrado, protegendo-a com gaze embebida em etanol 70% p/p ou 77% v/v, ou ainda, aquecer sua parte superior, pingar algumas gotas

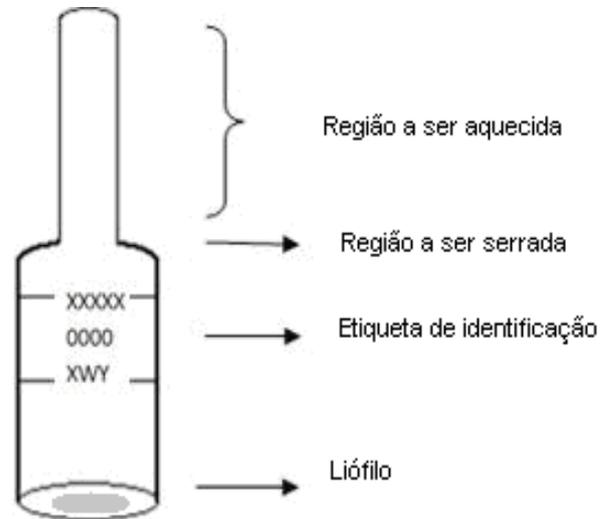


Figura 1: Desenho esquemático de ampola contendo liofilo (adaptado de FIOCRUZ, 2008).

de solução salina esterilizada, ou água destilada esterilizada gelada sobre a parte aquecida, de forma que o vidro seja fragmentado pelo choque térmico (Figura 1). É indispensável a utilização de óculos de segurança. Em seguida, retira-se a parte superior da ampola fragmentada com o auxílio de pinça esterilizada, desprezando-se os fragmentos de vidro em solução desinfetante aprovada. Com o auxílio de uma Pipeta *Pasteur* esterilizada, adiciona-se à cultura 0,3 a 0,5 ml do meio de cultura líquido recomendado.

O sedimento deve ser ressuspensionado homogeneizando-se suavemente e deixando-o em repouso por alguns minutos até a sua reidratação. A suspensão, então, é transferida para tubo com caldo específico recomendado no certificado que acompanha a estirpe-padrão. A incubação deve ser realizada em temperatura e tempo indicados no certificado para o microrganismo em questão. Se a cultura não apresentar crescimento no prazo indicado, esta deverá ser reincubada por até o dobro do tempo, antes de ser considerada como cultura inviável. Com a observação do crescimento, as culturas devem ser testadas quanto à pureza, características fenotípicas, morfológicas e fisiológicas. Observando-se qualquer alteração nas características da cultura, recomenda-se o seu descarte e a comunicação à instituição de origem (BRASIL, 2000).

2.3 MÉTODOS RECOMENDADOS DE MANUTENÇÃO DAS CRC

Os objetivos da preservação de microrganismos são manter as culturas estáveis, sem alterações morfológicas, fisiológicas ou genéticas e a sua completa viabilidade. Todas as culturas usadas no laboratório devem ser devidamente identificadas com número de referência e o nome da instituição de origem, data da hidratação e o

número do repique (FLOCCARI, 1998). O método mais comum de conservar culturas bacterianas em laboratórios é o congelamento. Foi observado em 1913 que a adição de açúcar, leite desnatado ou glicerol, protegia as bactérias após as mesmas serem submetidas a repetidos processos de congelamento e descongelamento. Dentre os métodos convencionais mais empregados, destaca-se a suspensão de culturas bacterianas em 15% de glicerol. Alternativamente, a adição de 10% de leite desnatado tem sido utilizada (CODY et al., 2008).

Agentes crioprotetores são substâncias adicionadas à suspensão celular com o objetivo de proteger as células contra danos durante o congelamento e descongelamento. Um bom agente crioprotetor deve proporcionar condições especiais como não formar bolhas durante a liofilização, permitir fácil reidratação em água fria e conferir proteção às células durante o congelamento e secagem, o que garante a estabilidade das células microbianas. Dentre os crioprotetores utilizados incluem-se o leite desnatado (*skim milk*) 10%, caldo nutritivo tamponado com glicerol 50%, dimetil sulfoxido (DMSO) 10%, ou glicerol 10%.

Os possíveis métodos de preservação aplicados para a manutenção de estirpes-padrão envolvem três técnicas bem distintas: os subcultivos contínuos, que consistem na manutenção do cultivo em meio adequado com transferências para meios frescos com intervalos variáveis de dias (BRASIL, 2000; FLOCCARI, 1998); a criopreservação ou o armazenamento do cultivo adicionado de substâncias protetoras, a baixas temperaturas, que se aplica no armazenamento em nitrogênio líquido ou congeladores mecânicos (BRASIL, 2000; FLOCCARI, 1998); e a desidratação ou secagem, onde se reduz significativamente o conteúdo de água da célula e se previne a reidratação, como se observa na liofilização, na secagem líquida e na secagem em areia, solo, sílica gel ou papel (BRASIL, 2000; FLOCCARI, 1998). O Ministério da Agricultura, por meio do Manual Técnico para Análises de Alimentos e Águas, recomenda entre outros métodos a preparação de cultura de reserva (CR) por meio de congelamento, ou seja, cultura obtida a partir da reativação e repique de uma cultura de referência certificada. Para tanto, preparam-se 40 tubos de CR que poderão ser mantidos em *ultra-freezer* entre -70 °C e -80 °C, por até dois anos ou em *freezer* doméstico entre -18 °C e -20 °C, por até 12 meses. Neste trabalho foi detalhado o método de criopreservação seguido de subcultivos contínuos, por ser mais acessível para os laboratórios de ensino. Os métodos são detalhados no item 2.3.1.

2.3.1 Manutenção por congelamento ou criopreservação (BRASIL, 2000)

Neste tipo de manutenção de cultura sugere-se repicar a cultura de referência certificada para dois tubos contendo o meio recomendado no certificado que acompanha a cultura e incubar por tempo e

temperatura ótimos para o microrganismo em questão. Nesta técnica de manutenção faz-se necessário o uso de agente crioprotetor.

- Congelamento em *ultra-freezer*: A partir da cultura em ágar inclinado com características de crescimento abundante, raspar a superfície do cultivo com palito longo esterilizado (tipo *swab*) e fazer uma suspensão celular em um tubo de ensaio contendo 2,0 ml de glicerol 10% v/v esterilizado. A concentração da suspensão deverá ser ajustada entre 1×10^7 e 1×10^8 UFC/ml correspondente aos tubos de número 1, 2 ou 3 da escala de *MacFarland* (BIER, 1990). O tubo deverá ser semelhante àqueles utilizados na preparação dos tubos da escala de *MacFarland*. A suspensão deve ser distribuída em alíquotas de 0,1 ml para criotubos de 2 ml ou *Eppendorf* esterilizados. Os tubos devem ser devidamente identificados com os dados da cultura e devem ser colocados imediatamente entre -70 °C e -80 °C, no *ultra-freezer*.

- Congelamento em *freezer* doméstico: A partir da cultura em ágar inclinado com características de crescimento abundante, raspar a superfície do cultivo com palito longo esterilizado (tipo *swab*) e fazer uma suspensão celular em um tubo de ensaio contendo caldo nutritivo tamponado com 50% v/v de glicerol esterilizado. A concentração da suspensão deverá ser ajustada entre 1×10^7 e 1×10^8 UFC/ml correspondente aos tubos de número 1, 2 ou 3 da escala de *MacFarland* (BIER, 1990). O tubo deverá ser semelhante àqueles utilizados na preparação dos tubos da escala de *MacFarland*. Essa suspensão deve ser distribuída em alíquotas de 0,1 ml para criotubos de 2,0 ml ou *Eppendorf* esterilizados. Os tubos devem estar devidamente identificados com os dados da cultura e devem ser colocados imediatamente entre -18 °C e -20 °C.

- Preparo da escala de *MacFarland*: Para determinar a concentração da suspensão utiliza-se a escala de *MacFarland*. Esta escala consiste numa série de 10 tubos de diâmetro uniforme contendo os produtos da reação de diferentes volumes de cloreto de bário (BaCl_2) a 1% p/v misturados a diferentes volumes de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% p/v. Dessa forma, obtém-se uma série de tubos contendo volumes iguais de uma suspensão de turbidez crescente, em correspondência com a quantidade de sulfato de bário (BaSO_4) formado. O grau de turbidez em cada tubo corresponde a determinada concentração bacteriana (Tabela 1) (BIER, 1990).

Tabela 1: Valores da escala de *MacFarland*, em relação ao número e a composição do tubo e sua correspondência em número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

Tubo nº	Composição (ml)		Concentração bacteriana (UFC/ml)
	BaCl ₂ a 1%	H ₂ SO ₄ a 1%	
0	0	10	0
1	0,1	9,9	$3,0 \times 10^8$
2	0,2	9,8	$6,0 \times 10^8$
3	0,3	9,7	$9,0 \times 10^8$
4	0,4	9,6	$1,2 \times 10^9$

2.3.2 Manutenção das culturas de trabalho (CT) em ágar ou subcultivo contínuo (BRASIL, 2000) e Registros

Para a reativação das culturas mantidas por criopreservação, seu descongelamento deve ser a temperatura ambiente. Com pipeta *Pasteur*, deve-se distribuir toda a suspensão (0,1 ml) em três tubos com 10 ml de meio líquido não seletivo, apropriado para cada caso. A incubação deve ser realizada em condições específicas para o microorganismo.

Após o período de incubação, o cultivo deve ser semeado em tubo contendo o meio de cultura indicado no certificado que o acompanha, e novamente incubado nas mesmas condições. Em seguida, esta cultura de trabalho deve ser repicada a cada semana, respeitando-se o máximo de cinco repicagens a partir da cultura de reserva. Mensalmente, as culturas de trabalho devem ser renovadas, descartando-se aquelas que se encontram em uso e partindo de uma cultura de reserva em estoque (Figura 2). Os registros da preparação de lotes de culturas estoque de referência devem ser mantidos em livro apropriado. Manter relação atualizada dos cultivos referenciais disponíveis (BRASIL, 2000).

3 CONCLUSÃO

A manutenção da atividade de culturas microbianas de referência é um requisito fundamental para garantir as BPL. A disponibilização deste material por meio de doação, por parte de algumas instituições, favorece o cumprimento das BPL e a qualidade em trabalhos desenvolvidos. A escolha de um método apropriado de reativação e manutenção de cultivo de microrganismos de referência deve basear-se no tipo do microorganismo, na necessidade de estabilidade de características, sobrevivência, na disponibilidade de equipamentos, mão de obra e recursos financeiros. Em consequência é importante a sistematização de registros da metodologia empregada.

4 REFERÊNCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Critérios para a Habilitação de Laboratórios Segundo os Princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL): Procedimento GGLAS 02/BPL habilitação de laboratórios junto à REBLAS**. Brasília, 2001. 37 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/procedimentos/GGLAS_02_bpl.pdf>. Acesso em: 01 julho 2009.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). **How to Revive Cultures**, 2009. Disponível em: <<http://www.atcc.org/HowtoReviveCultures/tabid/695/Default.aspx>>. Acesso em: 24 abril 2009.

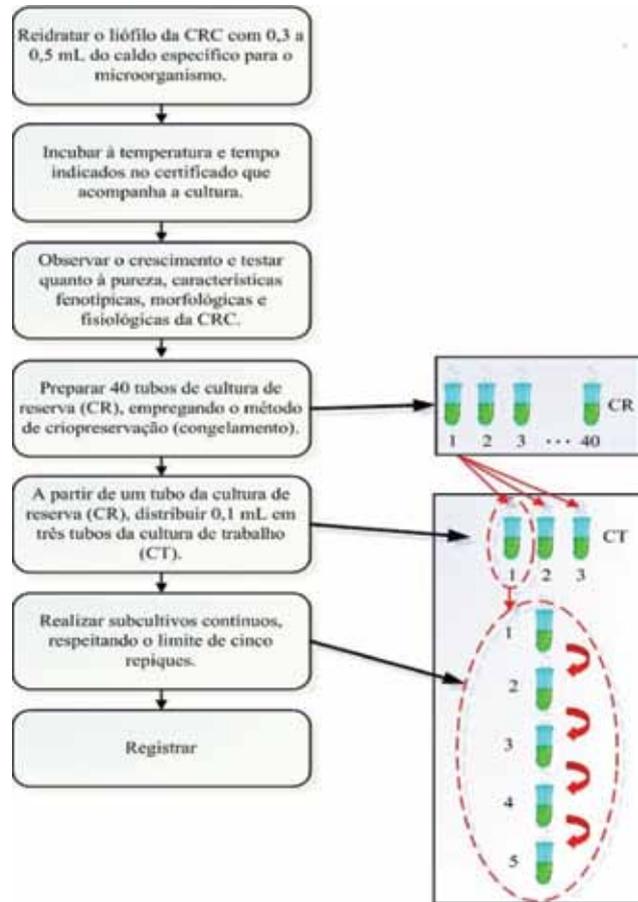


Figura 2: Método de reativação e manutenção de estirpes-padrão (O autor, 2009).

BIER, O. **Microbiologia e imunologia: Técnicas bacteriológicas**. 30. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Materiais de Referência**. In: **Métodos de Análises Microbiológicas para Alimentos**, Brasília, 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 04 março 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano**, Brasília, 2003. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mnl_ciano_bacterias.pdf>. Acesso em: 30 março 2009.

CANHOS, V. P. Centros de recursos biológicos: suporte ao desenvolvimento científico e inovação tecnológica. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 27-29, 2003. Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 09 maio 2009.

CODY, W. L.; WILSON, J. W.; HENDRIXSON, D. R.; HEGMAN, K. E.; OTT, C. M. Skim milk enhances the

preservation of thawed -80°C bacterial stocks. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, n.1, p. 135-138. 2008.

COLEÇÃO BRASILEIRA DE MICROORGANISMOS DE AMBIENTE E INDÚSTRIA. **Distribuição de cultura**. Disponível em: < <http://webdrm.Cpqba.unicamp.br/index.php?page=distribuicao>>. Acesso em: 30 abril 2009.

CONTI, J. **Aquisição de culturas de referência**. Disponível em: <liahamaral@hotmail.com>. Acesso em: 13 maio 2009.

DIAS, R. **Doação de cepas padrão**. Disponível em: <liahamaral@hotmail.com>. Acesso em: 20 maio 2009.

FILIPPIS, I. **Doação de cepas padrão**. Disponível em: <liahamaral@hotmail.com>. Acesso em: 24 abril 2009.

FLOCCARI, M. E. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 30, n.1, p. 42-51, 1998.

FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO. **Coleção de culturas**. Distribuição de linhagens. Disponível em: < <http://www.fat.org.br/index.php?id=cct&sub=ColecaoDeCulturas>>. Acesso em: 20 maio 2009.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). **Instrução para reidratação das culturas**. Pop 65.1120.055-Anexo 2-Revisão 02, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). **Microorganismos de referência**. Informações para aquisição de microorganismos de referência, 2004. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=29>>. Acesso em: 25 maio 2009.

INMETRO. **Princípios das Boas Práticas de laboratórios**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 15, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS).

Microorganismos de referência, 2008. Disponível em: < http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=120&Itemid=100>. Acesso em: 22 abril 2009.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). **Microorganismos de referência**. Informações para aquisição de microorganismos de referência, 2004. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/incqs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=29>>. Acesso em: 25 maio 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Tabela de Preços Fedial**. Culturas celulares. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=243>. Acesso em: 25 abril 2009.

MARTINS, C. R. F.; FERREIRA, J. A. P. S. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (BRASIL), Brasília, 1997. 63p.

OXOID. **Oxoid culti-loops®**, 2009. Disponível em: <http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=C9005L&c=UK&lang=EN>. Acesso em: 20 maio 2009.

RIBEIRO, M. G.; CARVALHO FILHO, A. S.; LISTONI, F. J. P. Dimetilsulfóxido - DMSO no teste de sensibilidade microbiana in vitro em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000500026&lang=pt>. Acesso em: 25 maio 2009.

SETTE, L. D. **Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria**. Informa o contato do CBMAI e disponibiliza informações sobre as culturas de seu banco de dados. Disponível em: <<http://sicol.cria.org.br/crb?CBMAI>>. Acesso em: 11 setembro 2009.

SILVEIRA, L. M. S.; ROSAS, L. S.; OLEA, R. S. G.; GONÇALVES, E. C.; FONSECA JUNIOR, D. C. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 299-301, 2007.