



DEPARTAMENTO MICOLOGIA

Certificado de cultivo microbiano de referencia

Cryptococcus neoformans DMIC 083456 Lote: CRD-01-083456

Fecha de certificación: 29 de septiembre de 2014

Productor: Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) "Dr. Carlos G. Malbrán", ANLIS. Av. Vélez Sársfield 563 (C1282AFF) – Ciudad de Buenos Aires – Argentina -TEL/FAX: +54-011-4302-5066.

Datos de contacto: MSP. Graciela Davel gdavel@anlis.gov.ar M.Sc. Mariana Mazza pnccm@anlis.gov.ar

1.- Descripción del cultivo de referencia

Cultivo de referencia certificado de ***Cryptococcus neoformans* DMIC 083456**

Vial estéril con sello hermético conteniendo 3 discos de papel de filtro Whatman N°1 de 0,7 cm de diámetro, inoculados con una suspensión de la cepa del cultivo fúngico trazable a la colección DMic, contenido en un triple envase de bioseguridad para transporte de material biológico.

Lote: CRD-01-083456

Material de partida: cultivo de cepa fúngica autóctona (CF) de DMIC número 083456 Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) "Dr. Carlos G. Malbrán", ANLIS, Laboratorio Nacional de Referencia en Micología clínica.

Número de pasajes de la cepa original: G0

2.- Uso previsto

Cultivo fúngico de referencia certificado en discos de papel para su uso en el control de calidad, validación de métodos de ensayo, control interno de los de ensayos y/o diagnósticos microbiológicos, ejercicios interlaboratorio y capacitación del recurso humano.

3.- Condiciones y período de conservación.

El cultivo fúngico de referencia es estable a temperaturas entre 2-8°C durante 12 meses o, a -20°C durante 18 meses, a partir de la fecha de producción que figura en su etiqueta.

4.- Valor certificado

Para caracterizar el cultivo fúngico se utilizaron métodos de identificación fenotípica mediante la observación de las características macro y micro-morfológicas de las colonias, pruebas fisiológicas y bioquímicas, e identificación genotípica a través de la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2, que se detallan a continuación:

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

MACROMORFOLOGÍA DE LA COLONIA Valor de Referencia según Kurtzman CP Y COL. (2011).	Cumple	No cumple	MICROMORFOLOGÍA Valor de Referencia según Kurtzman CP Y COL. (2011)	Cumple	No cumple
Color: Blanca a crema	x		Micelio verdadero: Ausente	x	
			Pseudomicelio desarrollado: Ausente	x	
			Tubo Germinativo: Ausente	x	
Aspecto: Mucosa, lisa, brillante	x		Brotación : Presente	x	
			Forma de las células: Globosas, ovoides.	x	
			Observaciones: Ureasa positiva Canavanina glicina Azul de Bromotimol (CGB): Negativo		

PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS según Kurtzman CP Y COL. (2011)

Ensayo	Fermentación*						Asimilación Hidratos de Carbono*															Asim. de N2						
	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Trehalosa	0-Glucosa	1-Galactosa	2-L-Sorbose	3-Sacarosa	4-Maltosa	5-Celobiosa	6-Trehalosa	7-Lactosa	8-Melibiosa	9-Rafinosa	10-Melezitosa	11-D-Xilosa	12-L- Arabinosa	13-D-Ribosa	14-D-Manitol	15-Inositol	19-L-Ramnosa	20-Eritritol	21-Citríco	17-NO ₃ K	18-Peptona	
Valor de Referencia	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+/- W	+	-	-	+/- W	+	+	+	v	+	+	+	-	v	-	+	
Cumple	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
No cumple																									x			

*(+: positivo / W: débil / D: lento / -: negativo / v: variable)

Ensayo de crecimiento	27±3°C:	37±2°C:	CHROMagar™ Candida
Valor de Referencia según Kurtzman (2011)			NoA
Cumple	x	x	
No cumple			

IDENTIFICACION GENOTÍPICA según Clinical and Laboratory standards Institute (CLSI). MM18A. Interpretive Criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline. CLSI, Pensilvania, Estados Unidos (2008).

Ensayo	Valor de Referencia Índice similitud ≥ 98%	Cumple	No cumple
Secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2	<i>Cryptococcus neoformans</i> ≥ 97%	x	
Secuenciación de la región D1/D2	<i>Cryptococcus neoformans</i> ≥ 97%	x	

5.- Preparación y Trazabilidad del cultivo fúngico certificado

Este cultivo fúngico de referencia fue producido a partir de un sub-cultivo de la correspondiente cepa fúngica autóctona (CF) de DMIC del Departamento Micología. Tanto para el sub-cultivo como para la cepa de origen, se realizaron ensayos para verificar su viabilidad, pureza e identidad. Se prepararon los discos de papel en soporte inerte y estéril, inoculándolos con una suspensión estandarizada del microorganismo. Se envasaron los discos en viales estériles, se etiquetaron y se realizaron los ensayos de homogeneidad, estabilidad y caracterización. Las cepas se conservaron hasta su distribución a temperatura de refrigeración (2-8°C) o en freezer (-20°C). Antes de su distribución se embalaron en envases triples de bioseguridad.

Las metodologías empleadas se detallan en el punto 4. Los laboratorios participantes en la producción son el Servicio Micosis Superficiales y Hongos Miceliales, el Laboratorio de Levaduras y el Laboratorio del Programa Nacional de Control de Calidad de Micología del Departamento Micología, el Servicio Neurovirosis del Departamento Virología del INEI participante en la secuenciación del fragmento de ADN del CR y el Centro Nacional de Control de Calidad de biológicos interviene en el almacenamiento de las cepas en un refrigerador controlado. Estos dos últimos son subcontratistas. Todos los participantes son auditados según la norma IRAM 301 vigente (equivalente a ISO/IEC 17025 vigente).

6.- Homogeneidad y estabilidad

Los ensayos realizados de acuerdo al correspondiente Procedimiento Operativo Estandarizado del Departamento Micología, demostraron que el cultivo fúngico de referencia es un producto homogéneo y estable.

En los ensayos de homogeneidad se verificaron las características morfológicas y el desarrollo en medios de cultivo diferenciales sobre un número de viales definido por la fórmula $3x \sqrt[3]{\text{número de viales producidos}}$, seleccionados en forma aleatoria. En los ensayos de estabilidad se verificaron las mismas características sobre 22 viales y se tuvo en cuenta la aleatoriedad de la muestra, distintas temperaturas y tiempos de almacenamiento.

7.- Fecha de vencimiento del valor certificado

La fecha de vencimiento (fecha de expiración) del producto final ha sido establecida en 24 meses de almacenamiento a -20°C desde la fecha de producción, basada en la experiencia previa y bibliografía científica.

El Departamento Micología notificará a los usuarios ante la ampliación de la fecha de vencimiento, emitiendo un nuevo certificado disponible en la página web del Departamento Micología.

8.- Monitoreo realizado al cultivo fúngico de referencia durante el período de validez del lote

El Departamento Micología monitorea el cumplimiento de las características y propiedades del cultivo fúngico de referencia durante el período de validez del lote a través del correspondiente Procedimiento Operativo Estandarizado, verificando su identidad, viabilidad y pureza.

El Departamento Micología notificará a los usuarios ante cualquier incumplimiento con las especificaciones definidas para el CR, para aquellos que no han alcanzado la fecha de vencimiento y para los cuales el usuario haya preservado las condiciones originales de envasado.

9.- Instrucciones generales para la correcta utilización

Para recuperar el microorganismo, se debe extraer en forma estéril uno de los discos del criovial, e inocularlo en Agar Sabouraud Glucosa 2%, incubándolo a 28°C hasta observar crecimiento (generalmente a la semana de incubación ya se observa crecimiento). Esta será la primera generación (G1). Luego proceda como lo hace habitualmente para mantener un aislamiento fúngico y registre el número de repique para su control.

Nota: Si el CR se utiliza con mucha frecuencia en el laboratorio, para evitar modificaciones en sus características fenotípicas y genotípicas, recomendamos que prepare un lote de viales de uso a partir del cultivo G1, resuspendiendo las levaduras o las esporas de los hongos miceliales en agua destilada y conservando en heladera por hasta seis meses.

10.- Precauciones y advertencias para el usuario

El cultivo fúngico corresponde al grupo de riesgo 2 de acuerdo al Manual de bioseguridad en el laboratorio. OMS. (Tercera Edición, 2005) y debe ser manipulado bajo condiciones de bioseguridad que aseguren su contención. Consulte la Hoja de Seguridad disponible para este cultivo fúngico en la página web del Departamento de Micología y el acuerdo de bioseguridad de la Orden de Pedido correspondiente.

11.- Documentación

Para la producción de cultivos microbianos de referencia, el Departamento implementa la ISO Guide 34 vigente “*General requirements for the competence of reference material producers*” y los requisitos aplicables de la norma IRAM 301 vigente (equivalente a ISO/IEC 17025 vigente).

Elaborado por: Mariana Mazza

Fecha: 3 de noviembre de 2014

Revisado y aprobado por: Graciela Davel
Director Técnico