

DEPARTAMENTO MICOLOGIA

Certificado de cultivo microbiano de referencia

Cryptococcus neoformans DMIC 083456 Lote: CRD-05-083456 Versión del documento: 00

Fecha de certificación: 19 de abril de 2021

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: M.Sc. Nicolás Refojo nrefojo@anlis.gob.ar M.Sc. Mariana Mazza pnccm@anlis.gob.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-05-083456

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. Fecha de vencimiento

El cultivo fúngico de referencia es estable a -20°C hasta 26/08/2023

La fecha de vencimiento ha sido establecida de acuerdo con la experiencia previa.

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

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, e identificación genotípica a través de PCR-RFLP URA5 para complejo *Cryptococcus neoformans* que se detallan a continuación

IDENTIFICACION FENOTIPICA					
MACROMORFOLOGÍA DE LA COLONIA Valor de Referencia según Kurtzman CP Y COL. (2011).	Cumple	No cumple	MICROMORFOLOGÍA DE LA COLONIA Valor de Referencia según Kurtzman CP Y COL. (2011)	Cumple	No cumple
Color: blanco a crema	X		Micelio verdadero: No presenta	x	
			Pseudomicelio desarrollado: No presenta	x	
			Brotación: presente	x	
Aspecto: Mucosa, húmeda, lisa, brillante	x		Forma de las células: Globosas, ovoides.	x	
			Observaciones		

Ensayo de crecimiento	27±3°C:	37±2°C:	Agar ácido caféico (ACC)
	+	+	+
Cumple	X	X	X
No cumple			

MALDI-TOF				
	RESULTADO	Score	Cumple	No cumple
Disco 1, vial: 39	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2.189	x	
Disco 2, vial:80	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2.052	x	

Cumple con el criterio de identidad fenotípica (SI/NO):	SI
--	-----------

IDENTIFICACION GENOTIPICA según Meyer, W., et al., Molecular typing of IberoAmerican <i>Cryptococcus neoformans</i> isolates. Emerg Infect Dis, 2003. 9(2): p. 189-95.				
	Ensayo PCR-RFLP URA5 para complejo <i>Cryptococcus neoformans</i>	Resultado. Especie y variedad. Genotipo;	Cumple	No cumple
Disco 1, vial: 39		<i>Cryptococcus neoformans</i> . VNI	x	
Disco 2, vial:80		<i>Cryptococcus neoformans</i> . VNI	x	

Cumple con el criterio de identidad genotípica (SI/NO):	SI
La concordancia entre los resultados obtenidos por los métodos de referencia es igual al 100% (CUMPLE / NO CUMPLE)	Cumple

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 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 Levaduras y el Laboratorio RNLM y del Departamento Micología. El Servicio Neurovirosis del Departamento Virología del INEI participa en la secuenciación del fragmento de ADN del cultivo microbiano de referencia (CR) y el Servicio Bacteriología Especial del Departamento Bacteriología del INEI participa en la gestión del equipo *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS).

6.- Homogeneidad y estabilidad

Los ensayos realizados según procedimientos operativos estandarizados demostraron que el cultivo fúngico de referencia es un producto homogéneo y estable.

7.- Monitoreo realizado al cultivo fúngico de referencia durante el período de validez

El Departamento Micología monitorea, de acuerdo a procedimientos operativos estandarizados, el cumplimiento de las características y propiedades del cultivo fúngico de referencia durante el período de validez del lote, 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.

8.- Instrucciones generales para la correcta utilización

Para recuperar el microorganismo, se debe extraer en forma estéril un disco del criovial, e inocularlos en Agar Sabouraud 2% ó 4%, incubándolos 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.

9.- 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.

10.- Documentación

El Departamento implementa la norma ISO 17034 vigente "Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia" para la producción de cultivos microbianos de referencia.

Elaborado por: Cristina Rivas

Fecha: 19 de abril de 2021

Revisado y aprobado por: Nicolás Refojo (**Director Técnico**)

Fecha: 19 de abril de 2021