

## TRAZABILIDAD DE CULTIVOS MICROBIANOS DE REFERENCIA AUTÓCTONOS

Gladys M. Mastromonaco<sup>1</sup>; Graciela O. Davel<sup>2</sup>; Marta G. Mazza<sup>3</sup>; Mariana Mazza<sup>2</sup>; Cristina Rivas<sup>2</sup>; María Eugenia Bosco Borgeat<sup>2</sup>; Nicolás Refojo<sup>2</sup>.

INTI SAI<sup>1</sup>, Departamento Micología. Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas<sup>2</sup>; Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos<sup>3</sup> de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”  
gmm@inti.gob.ar

### INTRODUCCIÓN

Los cultivos microbianos de referencia (CR) son imprescindibles en los procesos de Control de Calidad Interno y como ítems de ensayo en los ejercicios interlaboratorios. Los cultivos foráneos, considerados de referencia, pueden dar resultados no esperados por no ser representativos de la microflora de la región.

### OBJETIVO

Producir CR a partir de un panel de cultivos autóctonos correctamente caracterizados, homogéneos, estables y trazables, utilizando procedimientos estandarizados y normalizados (norma IRAM 14950 vigente).

### DESCRIPCIÓN

Los representantes de las instituciones involucradas definieron y establecieron el proceso y acordaron los criterios para la producción de cultivos de origen clínico. El panel de cultivos de levaduras autóctonas seleccionadas está conformado por: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* obtenidos de la colección de cultivos del Departamento de Micología – ANLIS.

Las especies fueron identificadas por el método de referencia de Kurtzman et al. (2011) y la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2. Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos públicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

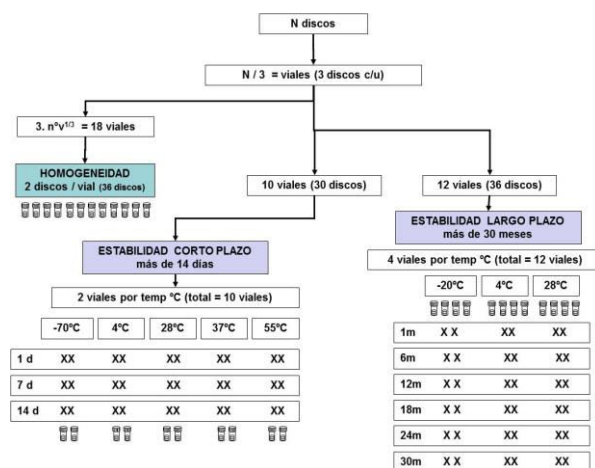


Figura 1: viales de discos inoculados con la cepa en estudio.

Cada cultivo se multiplicó y se inoculó en 600 discos de papel whatman N°1; se secaron y envasaron tres discos por viales estériles de tapa a rosca, generando un total de 200 viales como se muestra en la figura 1.

En los ensayos de homogeneidad (H) se verificaron las características morfológicas y el desarrollo en medios de cultivo diferenciales sobre un número de viales seleccionados en forma aleatoria y definido por la fórmula  $3x^3/\sqrt{n^v}$  ( $n^v =$  al número de viales del lote de producción). Para este estudio se evaluaron 36 discos los que se obtuvieron tomando 2 discos de cada vial, sobre un total de 18 viales (figura 2).

La estabilidad (E) a corto y largo plazo de las propiedades de interés de cada especie se determinó sobre el grupo de viales seleccionados al azar. Para la estabilidad a corto plazo se tomaron 10 viales conservados a diferentes tiempos y temperaturas y 12 para la estabilidad a largo plazo. Finalmente se evaluaron 2 discos los que fueron extraídos al azar de los viales reservados para cada temperatura (figura 2).



Donde X corresponde a 1 disco tomado de 1 vial

Figura 2: criterio adoptado por el estudio de homogeneidad y estabilidad.

### RESULTADOS

#### Evaluación de la Homogeneidad

El 100% de los discos evaluados respondieron a los requisitos de viabilidad, pureza e identidad por lo tanto se los considera homogéneos.

#### Evaluación de la **Estabilidad a corto plazo:**

El 100 % de los discos ensayados de todos los discos almacenados a **-70°C y 4°C** cumplieron con los requisitos de Viabilidad, Pureza e Identidad luego de 14 días de almacenamiento.

*C. tropicalis*, *C. glabrata* solo sobrevivieron 7 días a **28°C y 37°C**, mientras que el 100% de los discos controlados de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Cr. gattii* *Cr. neoformans* cumplieron con los requisitos de Viabilidad, Pureza e Identidad luego de 14 días de almacenamiento a estas temperaturas.

Como era de esperar, ninguno de los CR pudo sobrevivir 7 días a 55°C.

#### Evaluación de la **Estabilidad a largo plazo:**

En el Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para cada una de las cepas evaluadas en los distintos plazos de almacenamiento y condiciones de temperatura.

**Tabla 1: Ensayos de estabilidad a largo plazo**

CEPA	Nº DMic	Porcentaje de discos ensayados que cumplen con los requisitos de viabilidad, pureza e identidad a distintos tiempos de almacenamiento		
		4°C	-20°C	28°C
<i>C. glabrata</i>	113884	100% luego de doce meses, y continúan en evaluación	100% luego de seis meses, y continúan en evaluación	0% luego de un mes
<i>C. tropicalis</i>	113920			0% luego de seis meses
<i>C. krusei</i>	134341			100% luego de seis meses, y continúan en evaluación
<i>C. parapsilosis</i>	113911			100% luego de seis meses, y continúan en evaluación
<i>C. albicans</i>	113874			100% luego de seis meses, y continúan en evaluación
<i>C. gattii</i>	073122			100% luego de seis meses, y continúan en evaluación
<i>C. neoformans</i>	083456			

### **CONCLUSION**

El panel de cultivos autóctonos fue caracterizado utilizando dos métodos definidos lo que permitió confirmar la identidad de las cepas.

La caracterización se realizó a nivel de género y especie, cumpliendo con las propiedades cualitativas descriptas taxonómicamente.

Los lotes producidos fueron Homogéneos y Estables por 12 meses a 4°C y al menos durante seis meses a -20°C.

La utilización de esta metodología de producción y evaluación resultó adecuada para la producción de CR, y sirve de base para la producción de CR de otras especies de microorganismos.

Un cultivo microbiano se considera trazable cuando sus propiedades cualitativas son establecidas por consenso entre los expertos, y están descriptas por su taxonomía.

Demostrar la trazabilidad a nivel internacional de cultivos autóctonos -que responden a las propiedades y características de la región de origen-, establecerá la equivalencia de los mismos con cepas de otras colecciones. Además, el uso de aquéllos permitirá prescindir del ingreso de cultivos foráneos, los cuales pueden dañar la flora natural, o generar focos de enfermedades y afectar a la ecología regional.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Kurtzman C. P. Fell, J. W. Boekhout, T. The Yeast, a Taxonomic Study 2011 Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam 5th edition

Norma IRAM 14950 Cultivos microbianos de referencia –Requisitos para la competencia de los productores de cultivos microbianos de referencia