



**Comisión de Normalización y Validación (CNV)**

**INFORME TÉCNICO SOBRE CEPAS DE TRABAJO EN  
EL LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

**Primera edición: noviembre 2006**

Han participado en la redacción del presente informe:

**Esperanza Garay, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (coordinación)**

**Rosa Aznar, Dep. de Microbiología y Ecología, Univ. de València**

**Jorge Lalucat, Microbiología, Dep. de Biología, Univ. de les Illes Balears**

**Ferran Ribas, Aigües de Barcelona**

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Definiciones de los diversos tipos de material microbiológico empleado en los laboratorios de análisis microbiológico	4
1.2. Tipos de proveedores	4
1.3. Reconstitución del material	5
2. USO DE CEPAS COMERCIALES COMO CEPAS DE TRABAJO	6
2.1. Importancia del proveedor	6
2.2. Número de subcultivos y tipos de presentaciones	7
2.3. Difusión de la información	8
2.4. Acuerdo de transferencia de materiales (MTA)	8
3. ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS DE TRABAJO	10
4. USO DE CEPAS SALVAJES	11
5. RECOMENDACIONES FINALES	12

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Definiciones de los diversos tipos de material microbiológico empleado en los laboratorios de análisis microbiológico

- **Cepas de colección**: Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, depositados y mantenidos en una Colección de Cultivos (CC) o Centro de Recursos Biológicos (BRC) y catalogados con el acrónimo de la colección/BRC seguido de un número identificativo. En dicho catálogo se reseña el origen de la cepa, sus condiciones de cultivo y, en muchas ocasiones, algunas de sus características, así como la equivalencia, si la hay, con otras colecciones. Es equivalente a **cepas de referencia**.
- **Cepas de reserva**: cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia suministrada por el proveedor, o que proceden directamente del proveedor como tales.
- **Cepas de trabajo**: subcultivos primarios obtenidos de una cepa de reserva.
- **Cepas comerciales**: cepas suministradas por casas comerciales diferentes de las colecciones de cultivo o Centros de Recursos Biológicos, y que pueden o no proceder de una colección de cultivos.
- **Cepas salvajes**: No proceden de CC ni de BRC.

## 1.2. Tipos de proveedores

- Colecciones de cultivos (CC)
- Casas comerciales
- Centros de Recursos Biológicos (BRC)

Los dos primeros son sobradamente conocidos:

- Las casas comerciales que ofrecen microorganismos entre sus productos tienen sus propias características y políticas de funcionamiento, y existe una gran diversidad de ellas. La mayoría cubren muchos otros aspectos, aparte del suministro de microorganismos, para el cual algunas han firmado acuerdos con CC. Muchas de ellas están certificadas según normas ISO y algunas acreditadas por ENAC para determinados ensayos.
- Las CC han tenido siempre bastante independencia en cuanto a sus políticas relacionadas con el depósito y suministro de microorganismos, existiendo diferencias importantes entre ellas, en cuanto a número de cepas mantenidas, recursos disponibles, etc. En la actualidad, todas las reconocidas internacionalmente han elaborado documentos públicos que regulan dichas transferencias, han implantado Sistemas de Gestión de la calidad y están certificadas (generalmente para la ISO 9001:2000). Este es el caso de la CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

- Los BRC son algo más que meras colecciones de cultivo, y la mayoría de CC internacionalmente reconocidas están evolucionando a BRC. La OCDE reunió en la conferencia de Tokio (1999) a expertos de los estados miembros para estudiar la recogida, manejo y distribución de los recursos biológicos, incluidos los microbianos. Se reconoció la importancia de realizar un correcto manejo, almacenamiento y transferencia de dichos recursos y se creó un grupo de trabajo (TFBRC, Task Force BRC).

Se definen los BRC como: "Una parte esencial de la infraestructura sobre la que descansan las Ciencias de la Vida y, muy particularmente, la Biotecnología". Se sustituye el concepto tradicional de Colección de Cultivo por uno más amplio que engloba el suministro de productos y servicios y supone la provisión y reposición de las células vivas, genomas de organismos y de la información relacionada con la heredabilidad y funciones de los sistemas biológicos. Sus funciones son:

- Conservar la Biodiversidad
- Realizar actividades de I+D sobre dichos recursos biológicos
- Actuar como depositarios de recursos biológicos para la protección de la propiedad intelectual
- Preservar y proveer recursos biológicos para actividades de I+D de carácter científico, industrial, agrícola, ambiental, médico, y sus aplicaciones
- Contener la información y los recursos para hacerla llegar al público y para el desarrollo de líneas de actuación
- Funcionamiento según criterios de calidad internacionales

Dentro del grupo de trabajo específico para microorganismos, las principales CC (entre ellas la CECT,) están participando en un estudio piloto junto con representantes de la OCDE y de los organismos de certificación/acreditación, para establecer los estándares de calidad de los BRC. El trabajo finaliza este año y está previsto que los resultados definitivos están publicados como normativa de la OCDE para mediados del 2007.

### **1.3. Reconstitución del material**

El material de referencia se debe manipular y reconstituir siguiendo las instrucciones del proveedor. Éste adjuntará, con el material, información sobre la forma de reconstituir el cultivo (en función del tipo de presentación), así como el medio de cultivo a emplear y las condiciones de incubación, que varían de unos microorganismos a otros. El proveedor es responsable de la calidad del material suministrado (pureza, viabilidad, autenticidad), siempre que el receptor siga las instrucciones indicadas por dicho proveedor.

A partir de las cepas de referencia suministradas por las CC o BRC, se obtienen las cepas de reserva (primer subcultivo), y de éstas se obtienen las cepas de trabajo (segundo subcultivo). Las CC/BRC pueden suministrar directamente cepas de reserva o de trabajo obtenidas en la propia colección /BRC a partir de la cepa de referencia; de esta forma el receptor obtiene directamente las cepas de trabajo.

## 2. USO DE CEPAS COMERCIALES COMO CEPAS DE TRABAJO

### 2.1. Importancia del proveedor

El uso creciente de microorganismos en numerosos ensayos de laboratorio hace que la demanda de cepas microbianas de referencia haya crecido considerablemente en la última década. Los laboratorios recurren con frecuencia a cepas preparadas por casas comerciales debido a diversas razones (comodidad en la unificación de pedidos, publicidad y visitas de comerciales a los laboratorios, presentaciones de más fácil uso, posible desconocimiento del aspecto comercial de las colecciones de cultivo, etc.).

Los cultivos suministrados por el proveedor tienen que cumplir 3 requisitos:

- 1) pureza,
- 2) autenticidad y
- 3) estabilidad.

La pureza supone ausencia de contaminación, lo que se consigue trabajando en condiciones asépticas.

La autenticidad requiere disponer de personal cualificado con buenos conocimientos acreditados en Microbiología.

La estabilidad está inversamente relacionada con el número de subcultivos, por lo que éstos deben reducirse al mínimo.

Resulta evidente que para conseguir los 3 requisitos se requieren, tanto instalaciones y equipamiento adecuado, como personal técnico cualificado que acredite suficientes conocimientos en todas las facetas relacionadas con las tareas a desempeñar. Ello debe ser demostrado/acreditado mediante la adecuación a la norma ISO correspondiente a la actividad desempeñada. Muchas casas comerciales cumplen ya dichos requisitos, y también la mayoría de las CC (futuras BRC), una de cuyas principales misiones es, precisamente, mantener los cultivos con las tres características mencionadas durante largos periodos de tiempo vivos pero inactivos, utilizando las técnicas recomendadas por la OCDE (liofilización y/o crioconservación).

Las cepas microbianas ofrecidas por las casas comerciales, aún en el caso de que procedan de CC/BRC, han sufrido manipulaciones fuera de las mismas para obtener subcultivos a partir de la cepa de referencia o para modificar la presentación, lo que aumenta la probabilidad de cambios genéticos y fenotípicos, así como de contaminación. Todo ello requiere un mayor control por personal especializado.

Las CC/BRC poseen otras características que no son frecuentes en las casas comerciales por motivos obvios:

- mantienen un número elevado de cepas de diferentes géneros y especies (dependiendo de la colección, el número puede variar mucho). Entre ellas se encuentran tanto cepas "tipo" que representan a una especie concreta y son las que corresponden a la cepa con la que se describió dicha especie, como

otras de la misma especie que presentan comportamientos algo diferentes, que corresponden a la variabilidad intraespecífica. Según las características exigidas a la cepa de trabajo, se pueden seleccionar cepas de la especie en cuestión que presenten el patrón deseado. Esto sólo es posible si se dispone de una colección amplia de cepas de la misma especie, tarea propia de las CC/BRC.

- Disponen de personal altamente cualificado en Microbiología, tanto a nivel técnico como científico (para poder considerarse BRC esto es un requisito obligatorio), que puede resolver numerosas dudas relacionadas con el cultivo de los microorganismos, sus métodos de conservación o problemas derivados de los frecuentes cambios de denominación de los microorganismos. En efecto, como consecuencia de los grandes avances en taxonomía microbiana que se han producido en las dos últimas décadas, se ha modificado sustancialmente el esquema de clasificación de los microorganismos, dando lugar a numerosas confusiones. Esto quiere decir que muchos de los microorganismos depositados en cualquier colección bajo una denominación han cambiado de nombre de especie o incluso de género sin dejar de ser los que eran. Precisamente, una de las tareas del personal científico es conocer los últimos avances en taxonomía para poder actualizar los nombres a medida que se producen los cambios.
- Por disponer de personal altamente cualificado, las CC/BRC pueden "certificar" determinadas cepas de referencia que poseen las características necesarias para ser empleadas en determinados ensayos.

## **2.2. Número de subcultivos y tipos de presentaciones**

Las cepas comerciales suelen proceder de cepas de colección. No obstante, a no ser que las casas comerciales actúen como simples distribuidores sin manipular las cepas de la CC/BRC, necesariamente han sido subcultivadas un mayor número de veces para obtener la presentación comercial. No es habitual que dispongan de instalaciones y personal específico y con la cualificación adecuada para someter las cepas a los controles previos al suministro. Por lo general, no pueden mantener grandes reservas propias de cepas por falta de espacio o condiciones y han de obtenerlas de las colecciones, por lo que, en muchos casos, el plazo para su recepción suele ser mayor.

Los cultivos suministrados por las CC/BRC (liófilo, cultivo activo u otra presentación) proceden directamente del lote de reserva (mantenido liofilizado o congelado en las condiciones adecuadas), que se somete siempre a una comprobación antes de ser suministrado (caso de la CECT en la actualidad). Por tanto, el laboratorio receptor recibe una cepa de referencia en formato de cultivo activo o liófilo con las máximas garantías, a partir del cual el usuario puede preparar su propio lote de reserva (que representa el primer subcultivo). De este lote de reserva se preparará los cultivos o cepas de trabajo (segundo subcultivo).

Las presentaciones facilitadas por el proveedor, deben ser de tal manera que la manipulación y subcultivos a realizar por el laboratorio de ensayo resulten mínimos, para reducir la probabilidad de cambios o modificaciones. Existen en el mercado numerosas presentaciones de cultivos microbianos ofrecidos por diversas casas comerciales, que, en mayor o menor grado, presentan los inconvenientes apuntados anteriormente.

Las CC/BRC pueden desarrollar formatos que permitan al usuario prepararse fácilmente los lotes de reserva. Otra solución sencilla para el usuario son los

formatos “de un solo uso”, de forma que cada vez que se necesite el cultivo se solicite ya listo para su uso. La CECT ofrece ya un producto (ACTICULT 3R) que combina ambos aspectos. Otra buena solución es suministrar directamente varios viales que procedan todos ellos del lote de reserva de la CC y puedan constituir el lote de reserva del usuario sin necesidad de realizar subcultivos. La CECT está desarrollando un nuevo formato que presenta dichas ventajas y que estará disponible en un futuro próximo.

### **2.3. Difusión de la información**

Las casas comerciales tienen una activa política de difusión de sus productos muy enfocada hacia los consumidores en forma de folletos publicitarios, visitas de comerciales, campañas de promoción, páginas web, etc., ya que su éxito deriva directamente de las ventas y además disponen de personal específico dedicado a los aspectos comerciales.

Por el contrario, las CC/BRC no poseen este tipo de personal y tienen otras funciones no directamente relacionadas con la venta de microorganismos u otros servicios. Hasta fechas muy recientes, no han desarrollado políticas dedicadas a dar difusión a sus servicios, excepto en su página web, revistas especializadas o reuniones científicas. Por tanto, pueden facilitar el trabajo de los laboratorios de ensayo dando a conocer sus productos en forma de publicaciones o folletos publicitarios que contengan información sobre:

- La existencia, características y servicios prestados por las colecciones de cultivo. Todas las colecciones reconocidas internacionalmente disponen de una página web propia ([www.cect.org](http://www.cect.org), en el caso de la CECT, con enlaces a las principales colecciones) donde aparece reseñada toda la información sobre las cepas que mantienen. Además del catálogo *on-line*, mantienen sus bases de datos actualizadas con los cambios que se van produciendo en cuanto a nuevos depósitos, cambios de denominación y otras posibles novedades.

- El procedimiento seguido para la obtención de sus cepas a partir de los lotes de reserva, así como del tiempo transcurrido entre los subcultivos.

La CECT, como única colección de microorganismos oficial y pública en España, está potenciando los aspectos comerciales en la medida de sus posibilidades, mediante acuerdos con empresas para la comercialización de sus productos, elaboración de folletos publicitarios, etc.

### **2.4. Acuerdo de transferencia de materiales (MTA)**

Las casas comerciales tienen su propia política en cuanto a la comercialización de sus productos, que depende de su tamaño, sus características y su enfoque comercial.

En la actualidad, y para regular las condiciones de transferencia de sus cultivos, conseguir trazabilidad y velar por el mantenimiento de la calidad de los mismos, la mayoría de colecciones de cultivos han elaborado el denominado MTA (“Acuerdo de Transferencia de Materiales”). Este documento es muy similar en todas las principales colecciones y ha sido objeto de varias reuniones para llegar a una versión consensuada.

En estos acuerdos se elimina la posibilidad de que las cepas de una determinada colección puedan ser manipuladas por terceros y sacadas a la venta con el nombre

de la colección, a no ser que se suscriba algún tipo de acuerdo que vele por la calidad de los cultivos por parte de personal cualificado (por ejemplo de la propia colección). Estos acuerdos pueden ser de varios tipos y en el mercado existen varios ejemplos, pero se debe especificar claramente quien realiza dichos controles y si éstos se hacen siempre tras el último subcultivo antes de su suministro.

Una vía para facilitar la comercialización de sus productos es que las CC/BRC suscriban acuerdos con casas comerciales. Estas pueden actuar como meros distribuidores, sin manipular las cepas pero ofreciendo las ventajas de su mejor acceso a los usuarios. Otra posibilidad es que las casas comerciales manipulen las cepas para darles el formato adecuado. La CECT, de momento, prefiere suscribir acuerdos con casas comerciales que ofrezcan los cultivos de la colección pero sin manipularlos, de tal forma que las cepas van directamente de la colección al usuario aunque el pedido se realice a través de la casa comercial correspondiente. De esa forma, la calidad microbiológica de las cepas que recibe el usuario final está plenamente garantizada.

La ventaja de recurrir a colecciones de cultivo directamente es que, como se ha indicado anteriormente, en ellas existe personal especializado que puede asesorar al usuario ante cualquier problema o duda que se presente con sus cepas.

### 3. ESTANDARIZACIÓN DE CEPAS DE TRABAJO

La estandarización de cepas de trabajo es necesaria tanto a nivel cualitativo como a nivel cuantitativo:

- Cuando se realizan análisis microbiológicos en los que se incluyen pruebas bioquímicas, se recomienda la utilización cepas de referencia como control positivo para comparar y valorar los resultados del análisis. Sin embargo, dada la diversidad intraespecífica propia de los microorganismos, no todas las cepas de una misma especie responden por igual a la selección de pruebas diagnóstico para la identificación de la especie. Por ello, debería especificarse en los ensayos microbiológicos la cepa de referencia que se recomienda como patrón, en cuanto a su respuesta a las pruebas bioquímicas.
- La acreditación de nuevos procedimientos de análisis microbiológico en laboratorios requiere de ensayos de validación con respecto a los procedimientos estándar, lo que incluye una valoración de su sensibilidad. Para ello se requiere de un cultivo cuantificado que puede bien ser preparado por el propio laboratorio a partir de un cultivo de referencia, bien obtenerse como material de referencia cuantificado. También a este nivel sería conveniente la estandarización de dicho material de referencia cuantificado.

La presentación más habitual de los cultivos suministrados como cepas de referencia por las colecciones es el cultivo activo o el cultivo liofilizado en donde no se conoce el número de microorganismos. En el momento actual pueden suministrarse liofilos con un número aproximado de microorganismos, y algunas colecciones (y casas comerciales) ofrecen materiales de referencia cuantificados con diferentes formatos. Pero en estos casos hay que ajustarse necesariamente a las características de la presentación.

En este campo, las colecciones de cultivos pueden realizar dos tipos de contribuciones:

- 1) establecer los procedimientos necesarios para estandarizar los cultivos de trabajo, especificando muy bien todos los pasos a seguir. En este caso, el laboratorio de ensayo debe disponer de personal con unos mínimos conocimientos prácticos de las técnicas microbiológicas, y establecer sus propios estándares mediante experimentos repetidos.
- 2) dado que disponen de personal cualificado para ello, pueden realizar ellas mismas las experiencias necesarias para definir curvas de crecimiento patrón para los microorganismos más solicitados, definiendo muy bien las condiciones de cultivo en cuanto al medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación, agitación, inóculo, etc., y estableciendo algún procedimiento informático que permita al laboratorio de ensayo conocer de forma inmediata el número de microorganismos de su cultivo a partir de la densidad óptica del mismo. De esta forma, el usuario solamente tendría que seguir exactamente las instrucciones dadas por la colección y no tendría que elaborar sus propias curvas de calibrado, lo cual facilitaría enormemente la tarea de los laboratorios de ensayo a la hora de obtener valores de referencia adecuados a cada necesidad.

## 4. USO DE CEPAS SALVAJES

Está totalmente desaconsejado el uso de cepas salvajes/silvestres procedentes de ejercicios de intercomparación de laboratorios, debido a que estas pueden presentar comportamientos "atípicos", no conocidos, que invaliden completamente los resultados, aparte de los riesgos anteriormente mencionados por haber sufrido manipulación en el laboratorio, y también por las diferencias en las condiciones de trabajo que existen en cada laboratorio.

Para los controles de calidad, ensayos de validación, etc., se deberían emplear siempre "cepas certificadas" por colecciones de cultivo en cuanto a sus propiedades y perfil. Estas cepas de referencia suelen ser representantes "típicos" de su especie, seleccionados del conjunto de cepas de cada especie que se mantienen habitualmente en las colecciones de cultivos. Eso no significa que sean necesariamente las cepas "tipo", ya que la cepa "tipo" de la especie puede no resultar "típica" para el ensayo, ya que si lleva muchos años conservada puede haber perdido alguna característica deseada, en cuyo caso se puede seleccionar otra que cumpla mejor los requisitos exigidos y se establezca como referencia para una metodología determinada. Las colecciones tienen un papel importante en cuanto a comprobar que dichas cepas responden al patrón esperado para la especie en cuanto a crecimiento en los medios de cultivo y a sus propiedades fenotípicas. Las colecciones, por su parte, deben dar difusión de la existencia de dichas cepas y de su comportamiento, y además ofrecerlas a precios asequibles siempre que sea posible.

Dado que las CC/BRC, como se ha mencionado anteriormente, disponen de un número variable de cepas de la misma especie, con comportamientos no típicos, pueden seleccionar también, si interesa, representantes "atípicos" en alguna de sus propiedades para determinados ejercicios de intercomparación, con el fin de comprobar la pericia de los laboratorios participantes.

Solamente en el caso de que una CC/BRC no disponga de la cepa deseada para los ensayos (su búsqueda es fácil pues los catálogos son accesibles a través de las páginas web), se pueden usar cepas salvajes (ambientales, clínicas, etc.) que muestren las características deseadas. Dichas cepas deberían ser depositadas en las CC/BRC para su caracterización y conservación, y para garantizar su libre disposición para futuros ensayos.

## **5. CONSIDERACIONES FINALES**

Como comentario final, las recomendaciones que hace la SEM con el fin de que los ensayos realizados en los laboratorios microbiológicos ofrezcan las máximas garantías son:

- 1. Utilizar como cepas de referencia siempre microorganismos procedentes de una Colección de Cultivos (CC) internacionalmente reconocida o de un Centro de Recursos Biológicos (BRC), que cumplan por tanto las requisitos de calidad exigidos por una norma ISO o alguna específica acreditada por ENAC para los BRC.**
- 2. Utilizar como cepas de trabajo preferentemente microorganismos procedentes de una Colección de Cultivos internacionalmente reconocida o de un BRC, que cumplan por tanto los requisitos de calidad exigidos por una norma ISO o alguna específica acreditada por ENAC para los BRC. Las casas comerciales que quieran proporcionar cepas comerciales como cepas de trabajo deben someterse a los mismos criterios de calidad o haber llegado a acuerdos con la CC/BRC para su comercialización.**
- 3. Prescindir en lo posible de cepas salvajes aisladas y caracterizadas en los laboratorios participantes en ejercicios de intercomparación y recurrir a cepas existentes en CC/BRC. Si ello no es posible, acudir a una CC/BRC para que caracterice y mantenga la cepa en condiciones adecuadas.**