

Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay

Carmen A. del Puerto¹, Elsie Iglesias¹, Teresita Morales¹, Nadezda Baños¹, María Dolores Nocedo², Grettell Carnota², Roselyn Martínez¹

¹ Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805. La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

² Centro de Inmunología Molecular. Calle 216 Esquina 15. Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

email: carmen@finlay.edu.cu

La Colección de Cultivos Microbianos del Instituto Finlay está constituida por cepas para la producción, la investigación y desarrollo de vacunas, así como de referencia para el control de la calidad de medios de cultivo, desinfectantes e higienizantes, entre otros. Mientras que la metodología para el manejo de los lotes de siembra de referencia de las cepas vacunales se encuentra adecuadamente establecida, en el caso de las cepas de referencia, la colección no se encontraba en óptimas condiciones. Por este motivo se elaboraron nuevos lotes de referencia a partir de cepas obtenidas de colecciones reconocidas y se estableció la documentación adecuada que incluye: expedientes de cada lote, los procedimientos normalizados de operación, los registros de elaboración y control de los lotes, las especificaciones de calidad y los certificados de ensayo.

Palabras clave: Cepas de referencia, colección de cultivos, vacunas.

Introducción

La Colección de Cultivos Microbianos del Instituto Finlay está constituida por cepas para la producción, la investigación y desarrollo de vacunas, así como de referencia destinadas a evaluar la calidad de los medios de cultivo y los desinfectantes, el aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayos y la validación de ensayos microbiológicos de control de la calidad.

Por ello la necesidad de asegurar su origen y trazabilidad, contar con procedimientos normalizados para su adecuado manejo, así como preservarlas de modo que mantengan su pureza, viabilidad y características bioquímicas.

Con el fin de evitar la pérdida de las propiedades que pueden originarse por cultivos repetidos o por generaciones múltiples, la conservación de cepas se basa en un Sistema de Lotes de Siembra en dos niveles, en el cual el Lote de Siembra de Referencia es usado para generar el Lote de Siembra de Trabajo (1).

Desde la creación del Instituto Finlay en 1989, las cepas vacunales y las de referencia se conservaban en diferentes áreas, es a partir del año 2005 cuando se produce la centralización de las cepas en el Laboratorio de Liofilización y Conservación de Cepas, adscrito a la Vicepresidencia de la Calidad.

Mientras que la metodología para el manejo de los Lotes de Siembra de Referencia de las cepas vacunales se encontraba adecuadamente establecida, en el caso de las cepas de referencia la colección no se encontraba en óptimas condiciones, a saber:

- La documentación era insuficiente, por cuanto no existían datos sobre el origen y no se podía determinar la trazabilidad de los Lotes de Siembra.
- Algunos lotes tenían la viabilidad por debajo del límite de aceptación establecido.
- Faltaban actividades sin procedimientos normalizados de operación, en otros casos era necesario modificarlos.
- No existían las especificaciones de calidad de las cepas.

Teniendo en cuenta la importancia de las cepas de referencia en el control de la calidad de los productos biológicos y farmacéuticos, nos propusimos como objetivo de este trabajo establecer una metodología adecuada para la organización y el manejo de la Colección de Cepas de Referencia del Instituto Finlay, cumpliendo con los requerimientos de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de productos biológicos y farmacéuticos.

Materiales y métodos

Cepas de referencia

En este trabajo se emplearon cepas ATCC, adquiridas de colecciones reconocidas, todas cuentan con su correspondiente certificado de origen. Ellas son:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Escherichia coli* ATCC 11229
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
- *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Redacción de la documentación

Los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) para la elaboración y caracterización de los Lotes de Siembra de Referencia, así como las Especificaciones de Calidad (ESPE), se redactaron teniendo en cuenta la bibliografía especializada sobre la temática de la documentación en la industria farmacéutica, así como los documentos regulatorios de las BPM para productos biológicos y farmacéuticos (1-4).

Elaboración de los Lotes de Siembra de Referencia

Se elaboraron nuevos Lotes de Siembra de Referencia de aquellas cepas que no contaban con certificado de origen. La elaboración de los Lotes de Siembra se efectuó de acuerdo con los principios básicos de las Buenas Prácticas de Manufactura.

El trabajo se ejecutó por personal calificado siguiendo la metodología descrita en cada PNO. Se trabajó en un ambiente controlado garantizando la separación temporal y espacial del área de trabajo, con el objetivo de asegurar que no ocurriera contaminación cruzada. La identificación y almacenamiento de los lotes se realizó acorde con los procedimientos establecidos (1, 3).

Teniendo en cuenta el tipo de microorganismo a conservar se estableció tres metodologías de trabajo:

- Bacterias aerobias y levaduras
- Bacterias anaerobias
- Hongos

a) Conservación de bacterias aerobias y levaduras

Las bacterias se cultivaron en Caldo Triptona Soya, con la excepción de los enterococos, para los cuales se empleó Infusión Cerebro Corazón. La levadura se cultivó en medio glucosa – peptona – extracto de levadura.

La ampollita del Lote Maestro liofilizado fue resuspendida inicialmente en 1 mL de medio líquido y posteriormente inoculado en un volumen de 15 mL, la incubación se efectuó durante 18 a 24 h a la temperatura adecuada para cada microorganismo. El cultivo se inoculó en un Erlenmeyer con 100 mL del mismo medio, el cual se incubó a la misma temperatura en zaranda orbital termostataada, hasta alcanzar la fase media logarítmica.

Se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram y se centrifugó a 10000 rpm por 30 min. La biomasa se resuspendió con leche descremada al 20%. Se tomó 0,1 mL de suspensión para recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL). El resto se distribuyó en

bulbos de vidrio 2R a razón de 500 mL por frasco. La liofilización se realizó en un equipo Usifroid SMH 15.

Una vez concluido el proceso, los bulbos se sellaron al vacío y fueron identificadas con una etiqueta con los siguientes datos: género y especie, código de la cepa, número de lote y fecha de liofilización. Posteriormente se almacenaron entre 2 y 8 °C para garantizar su estabilidad a largo plazo.

b) Conservación de bacterias anaerobias

El Lote Maestro se resuspendió con 1 mL de medio tioglicolato a partir del cual se sembraron 0,5 mL en 2 tubos con 5 mL del mismo medio. Los tubos se incubaron durante 48 h a 35 °C. Se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram y se inocularon 6 tubos con 15 mL de medio, los cuales se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y tiempo.

Posteriormente se chequeó la pureza por tinción de Gram. Los cultivos puros se mezclaron con igual volumen de leche descremada al 10% en un Erlenmeyer estéril. La suspensión se distribuyó en criotubos en volúmenes de 1 mL. Cada criotubo se identificó adecuadamente. El lote se almacenó a -70 °C .

c) Conservación de hongos

El Lote Maestro se resuspendió con 1 mL de agua destilada estéril, dejando rehidratar por 30 min. La suspensión se inoculó en cuñas de Agar Sabouraud Dextrosa, las cuales se incubaron durante 7 días a 28 °C. Posteriormente, se inspeccionó el crecimiento en busca de colonias contaminantes, así como se observaron al microscopio las estructuras típicas del hongo.

Se resuspendió el crecimiento de las cuñas con 10 mL de leche descremada 10% más inositol 5%. La suspensión se distribuyó en bulbos de vidrio 2R a razón de 500 mL para su posterior liofilización, identificación y almacenamiento según se describió previamente.

Ensayos de control de los Lotes de Siembra de Referencia

a) Viabilidad

Después de la liofilización se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) por diluciones seriadas hasta 10⁻⁸ y siembra en superficie en Agar Triptona Soya para las bacterias y Agar Sabouraud Dextrosa para hongos y levaduras. Cada dilución se sembró por triplicado. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10⁵ UFC/mL. En el caso de *Clostridium sporogenes*, se descongeló un criotubo a 37 °C y el contenido se inoculó en dos tubos con 5 mL de tioglicolato a razón de 0,5 mL en cada uno. Los tubos se incubaron

durante 48 h a 35 °C. Se consideró satisfactoria la observación de abundante turbidez en todo el medio.

b) Ensayo de pureza

La pureza de las bacterias y levadura se evaluó por observación microscópica del cultivo, teñido por el método de Gram. En el caso del hongo, se efectuó por observación del crecimiento en busca de colonias contaminantes, en microscopio estereoscópico.

c) Ensayos de identidad

La identidad de los cultivos bacterianos se llevó a cabo a través del empleo de galerías API, pruebas de oxidasa y catalasa, observación de características culturales en medio sólido según la especie, así como la observación al microscopio de los caracteres morfológicos tintoriales.

Para *C. albicans* se observaron las características culturales en Agar Sabouraud Dextrosa. Se determinó la formación de clamidosporas y de tubo germinativo. Se realizó la caracterización bioquímica por API.

En el caso de *A. niger* se observaron al microscopio estereoscópico las características morfológicas del cultivo. También se realizaron preparaciones en fresco para examinar las estructuras de reproducción.

Confección de los expedientes

A cada Lote de Siembra de las diferentes cepas de referencia se le confeccionó un expediente con la documentación adecuada, acorde con lo establecido de las BPM.

Resultados y Discusión

Redacción de la documentación (PNO y ESPE)

Previo a la elaboración de los nuevos Lotes de Siembra de Referencia se modificaron 9 PNO, así como se redactaron los dos PNO que no existían. También fueron redactadas todas las Especificaciones de Calidad de las cepas. Toda la documentación fue aprobada por la Vicepresidencia de Calidad del Instituto Finlay.

La documentación apropiada para el procesamiento, preparación y ensayo de los Lotes de Siembra es una etapa esencial del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación de productos farmacéuticos y constituye una exigencia de las autoridades regulatorias nacionales (3) e internacionales (1, 4, 5).

Los PNO están diseñados de manera tal que establecen, entre otros aspectos, las operaciones detalladas del proceso, etapa por etapa, respetando los requerimientos de cultivo y conservación del microorganismo en cuestión, garantizando que dichas operaciones se realicen de manera uniforme.

Además incluyen los registros de elaboración y ensayo de los lotes, los que deben ser llenados a medida que se realizan las operaciones, para demostrar que el procedimiento ha sido realizado y que se ha alcanzado la calidad requerida. En el caso de las especificaciones, estas constituyen estándares de calidad críticos para asegurar la calidad y consistencia del producto.

Elaboración de los Lotes de Siembra de Referencia

Se realizaron 11 nuevos Lotes de Siembra, tanto de las cepas que no contaban con certificado de origen, como de otras de nueva incorporación. Estas fueron adquiridas de colecciones reconocidas, lo que permite demostrar su trazabilidad. Es esencial tener una fuente fiable de cultivos madre de referencia para su uso en programas de garantía de calidad en microbiología (6). De igual forma podemos asegurar que los mismos han sido consistentemente producidos, ya que se aseguró el cumplimiento de las BPM durante todo el proceso de elaboración de los lotes. La conservación de cepas mediante el Sistema de Lotes de Siembra es considerada la forma más práctica para asegurar la identidad, pureza y viabilidad de los microorganismos que se emplean en la producción y control de productos biológicos (6,7).

Ensayos de control de los Lotes de Siembra de Referencia

Una vez que los lotes de siembra han sido elaborados estos deben ser controlados por métodos específicos que permitan evaluar su calidad de acuerdo con las especificaciones de calidad establecidas para cada tipo de cepa de referencia en cuestión.

a) Viabilidad

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la determinación de viabilidad de los lotes. En todos los casos la viabilidad fue superior a 10⁵ UFC/mL, por lo que estos resultados cumplen con el límite de aceptación del ensayo establecido en las especificaciones.

Hay que señalar que todos los lotes no tienen el mismo tiempo de almacenamiento. En el caso de *Escherichia coli* ATCC 10536 (elaborado en 2004) este resultado pudiera deberse a que siempre ocurre pérdida de la viabilidad durante el almacenamiento. Estudios previos han encontrado que *E. coli* disminuye significativamente su viabilidad en el primer año, más ligeramente hasta los primeros 5 años y después se estabiliza (8).

En cuanto a *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, a pesar que tiene sólo 1 año de almacenamiento la pérdida de viabilidad es muy grande, lo que pudiera estar influido por el uso de un lioprotector inadecuado. Los aditivos o lioprotectores son sustancias que se añaden con el objetivo

Tabla 1. Viabilidad de los Lotes de Siembra de Referencia.

Cepa	Viabilidad (UFC/mL)
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1 x 10 ⁸
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1,8 x 10 ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1,4 x 10 ⁹
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1,3 x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	1 x 10 ⁹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3,4 x 10 ⁸
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	1,4 x 10 ⁹
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	6,6 x 10 ⁵
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	6,6 x 10 ⁶
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1,1 x 10 ⁹
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1,2 x 10 ⁹

de mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización o el almacenamiento.

Se emplean gran variedad de sustancias, siendo la leche descremada uno de los más recomendados por sus buenos resultados en la preservación de la viabilidad (9,10). Sin embargo, para la mayoría de estos aditivos los mecanismos del efecto protector son poco conocidos. Por lo tanto no existe una formulación universal, pues depende de la especie biológica a conservar (11). Es por ello que para un microorganismo dado existen sólo uno o dos lioprotectores adecuados (12).

Por otra parte, en ambos casos son bacterias gramnegativas y se ha reportado previamente que este grupo de microorganismos presenta menor resistencia a la liofilización debido a la estructura de su pared celular (8, 9, 13).

La liofilización es uno de los métodos más empleados para la conservación de microorganismos debido a sus numerosas ventajas, entre las que podemos resaltar el mantenimiento de la viabilidad a largo plazo. Esto implica que la oportunidad de que se introduzcan cambios en los caracteres del cultivo sea menor, ya que como el tiempo de supervivencia es prolongado no es necesario realizar pases frecuentes. Además, dicho método permite mantener la esterilidad del producto, es conveniente para la producción y distribución masiva de cultivos y el espacio para el almacenamiento es reducido.

Por otra parte, los productos liofilizados no necesitan una atención estricta durante el almacenamiento ya que son menos propensos a sufrir afectaciones por fallos en el fluido eléctrico, como es el caso de los cultivos conservados por congelación (12, 14, 15).

En el caso de *Clostridium sporogenes* no fue posible determinar la viabilidad cuantitativamente por no disponer de la jarra de anaerobiosis necesaria para el cultivo en medio

sólido de este germen. La determinación de la viabilidad en medio tioglicolato es cualitativa.

Este inconveniente debe ser solucionado, ya que en la mayoría de los ensayos es imprescindible cuantificar la viabilidad de la cepa para su uso.

b) Ensayos de identidad

Los ensayos de identidad de todas las cepas mostraron que el comportamiento de las características culturales, morfológico-tintoriales y fisiológico-bioquímicas ensayadas se mantuvieron de acuerdo con la descripción de las especies.

Para los microorganismos, el análisis del crecimiento en medios selectivos, así como las propiedades bioquímicas y fisiológicas, son adecuados para confirmar la identidad (7).

c) Ensayos de pureza

La observación microscópica y macroscópica de los cultivos demostró la presencia en cultivo puro de las cepas conservadas.

Un aspecto crítico en la caracterización de los microorganismos lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes (5, 7).

Confección de los expedientes

A cada cepa se le confeccionó un expediente que incluye los siguientes documentos: certificado de origen, registro de elaboración del lote, registros de resultados de los ensayos realizados, registros de existencia, certificados de calidad y de liberación. Finalmente, se estableció en el Instituto Finlay, una metodología adecuada para el manejo de las cepas de referencia que se emplean en el control de la calidad cumpliendo con lo establecido en las BPM.

Referencias

1. European Communities. Pharmaceutical legislation. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Good Manufacturing Practices. 1998. (Vol. 4).
2. Pharmaceutical Inspection Convention. Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme. Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. PH 1/97 (Rev. 3). 2002.
3. Regulación 16-2006. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos; 2006.
4. WHO. Annex 4. Good Manufacturing Practices for pharmaceutical products: main principles. WHO Technical Report Series No. 908. 2003.
5. Food and Drugs Administration. Code of Federal Regulations, Title 21. Part 610. General Biological Products Standards. Section 610.18 Cultures. Rockville, Maryland; 2002.

6. American Type Culture Collection Technical Bulletin No.6 Reference strains: How many passages are too many? Reprinted from ATCC Connection 2003; 23(2):6-7.
7. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. Step 4, 16 July 1997.
8. Miyamoto-Shinohara Y, Imaizumi T, Sukenobe J, Murakami Y, Kawamura S, Komatsu Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. Cryobiology 2000; 41:251-5.
9. Simone FP, Brown EM, editors. ATCC Preservation Methods: freezing and freeze-drying. Second edition. Published by: American Type Culture Collection; 1991.
10. Delgado H, Moreira T, Luis L, García H, Martino TK, Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. Cryo-Letters 1995;16: 91-101.
11. Moreira T, Gutiérrez A, Delgado H. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. Biotecnología aplicada 1994; 11:113-117.
12. Theunissen JJH, Stolz E, Michel MF. The effects of medium and rate of freezing on the survival of chlamydias after lyophilization. J Appl Bacteriol 1993;75:473-7.
13. Stell KJ, Ross HE. Survival of freeze dried bacterial cultures. J Appl Microbiol 2008;26:370-5.
14. Murgatroid K. The freeze drying process. En: P. Cameron, editor. Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice. Buffalo Grove: Interpharm Press, Inc.; 1997. p. 1-6.
15. Nakamura LK. Preservation and maintenance of eubacteria. En: Hunter-Cervera JC, Belt A, editors. Maintaining cultures for biotechnology and industry. Berkeley, California: Academic Press Inc.; 1996. p. 65-84.

Organization and management of the collection of the reference strains of Finlay Institute

Abstract

The collection of microbial cultures of Finlay Institute consists of strains for the production, research and development of vaccines and reference strains for the quality control of culture media, and disinfectants and hygienizing products. The methodology for the management of the reference seed lots is adequately established, however the collection of reference strains was not in the same conditions. Considering this, new reference lots were established from well-known collections and the new documentation was established, which include lot files, standard operational procedures, registries of lot control quality specifications and assay certificates.

Keywords: Reference strains, culture collection, vaccines.

Recibido: Noviembre de 2008

Aceptado: Febrero de 2009