

# Evaluación de distintas metodologías para la preservación de *Clostridium tetani*, empleado en la producción de vacunas para uso humano

Elsie Iglesias<sup>1</sup>, Naylet Marrero<sup>1</sup>, Tomas Moreira<sup>2</sup>, Tania Martínez<sup>1</sup>, Boris A. García<sup>1</sup>, Alfredo Alfaro<sup>1</sup> y Luis Izquierdo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Finlay. Centro de Investigación- Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: elsie@finlay.edu.cu

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba.

En el presente estudio se evaluaron diferentes metodologías para la preservación de *Clostridium tetani*. Para verificar el sustento del cultivo se realizó un adecuado control de calidad, que incluyó comprobación de pureza, viabilidad y estabilidad de las propiedades de interés. En este trabajo se compararon dos procedimientos para liofilizar y se evaluó el método de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para preservar *C. tetani*. Para medir determinados parámetros se realizaron procesos a escala industrial, empleándose para esto un Biorreactor Chemap de 35 L. Con este trabajo se buscó alternativas y soluciones a problemas presentados en su conservación. Los resultados obtenidos sugieren la posible inclusión en el Programa de Mantenimiento establecido.

**Palabras claves:** Conservación, *Clostridium tetani*.

## Introducción

El patógeno responsable del tétanos, *Clostridium tetani*, se aisló en 1889 por Kitasato y en 1890 Knud Faber, demostró la existencia de la toxina responsable de la enfermedad (1).

La enfermedad producida por *C. tetani* provoca una letalidad muy alta. Por tanto lo más importante es su prevención. Esta depende de: 1) inmunización activa con toxoides, 2) tratamiento adecuado de las heridas contaminadas con tierra, etc., 3) uso profiláctico de antitoxina y 4) administración de penicilina (2).

En septiembre de 1990, en la Cumbre de la Infancia, se identificaron varios desarrollos tecnológicos, que están actualmente en proceso de implantación. Uno de ellos es la producción de vacuna DPT perfeccionada y su utilización como posible soporte para la formulación de vacunas combinadas (3).

El programa de desarrollo de vacunas en Cuba contempla esta línea de trabajo, para ello emprendió el mejoramiento de las tecnologías de producción de los tres componentes vacunales (4).

En el Instituto Finlay se elabora la vacuna antitetánica (vax-TET<sup>®</sup>), obtenida a partir de cultivos de *C. tetani*, destoxificación con formaldehído-calor y purificación por métodos físicos. La anatoxina tetánica se adsorbe finalmente en gel de hidróxido de aluminio de partículas de tamaño controlado.

Para las investigaciones, desarrollo y producción de esta vacuna, resulta imprescindible la conservación adecuada de los cultivos en colecciones microbianas.

En la Colección de Cultivos Finlay este microorganismo se encuentra conservado solo por liofilización y con una metodología que no resulta la más conveniente, por tal motivo urge la necesidad de evaluar otro procedimiento para la conservación por liofilización, así como, buscar otro método de

conservación (5), con lo cual se brindaría alternativas y soluciones a problemas relacionados con su conservación.

Para dar cumplimiento a este programa y garantizar el suministro de un cultivo estable a la producción, conservando el material almacenado en óptimas condiciones, el presente trabajo tiene como objetivo principal comparar dos procedimientos para liofilizar y evaluar el método de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  para preservar *C. tetani*.

## Materiales y Métodos

1. Comparación de dos procedimientos para la conservación por liofilización de *C. tetani*.

Este estudio se realiza con la cepa Harvard Caracas 80, procedente del Instituto de Salud Pública de Chile y donada por el Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud en Brasil.

Esta cepa conservada por liofilización, constituyó el lote maestro. A partir de esta se elaboraron los lotes de semilla primarios o de referencias, según el procedimiento siguiente:

Se tomó una ampolla liofilizada y se resuspendió con 1 mL de Tioglicolato (2), inoculándose 0,4 mL en tubos que contienen 10 mL de Tioglicolato y se incubó durante 48 h a  $35^{\circ}\text{C}$ , se realizó un segundo pase inoculándose 3 mL en tubos que contienen 50 mL de Tioglicolato, pasado 24 h, se chequeó pureza y se procedió a realizar dos lotes de liofilización, realizando dos procedimientos diferentes.

### Procedimiento A

Se tomaron 300 mL de un cultivo de 24 h en medio Tioglicolato, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y la biomasa se resuspendió en igual volumen de Solución

Salina Tamponado con Fosfato (SSTF). Este procedimiento se repitió y a la biomasa final se le añadió leche descremada al 20%, se homogeneizó, a la suspensión obtenida se le

determinó pureza y viabilidad y se distribuyó en ampollas para liofilizar.

### Procedimiento B

Se tomaron 50 mL de un cultivo de 24 h en medio Tioglicolato; se inocularon en 25 L de medio Lathan (6) en un fermentador Chemap de 35 L. A las 48 h de crecimiento, (que corresponde con la fase media exponencial), se chequeó pureza y se tomó 100 mL de cultivo, se centrifugó 10000 rpm por 10 min, la biomasa final se resuspendió con 30 mL de leche descremada al 20%, se homogeneizó, se determinó pureza y viabilidad y la suspensión obtenida se distribuyó en ampollas para ser liofilizada.

La liofilización fue llevada a cabo en un liofilizador USIFROID SMH-15 por 17 h, con una presión de la cámara de  $4 \times 10^{-2}$  mbar y temperatura del condensador de  $-60^\circ\text{C}$ . Finalmente las ampollas fueron selladas al vacío. Determinándosele el mismo (vacío) por el empleo de un "Spark tester" tipo ST4M.

A las cero horas se evaluó la pureza, viabilidad y estabilidad de los cultivos liofilizados.

La pureza se desarrolló a través de la observación macroscópica (siembra en Agar Nutriente y Agar Sangre), y microscópica, (respuesta a la tinción de Gram), según Fernández en 1983 (7). La viabilidad se analizó por el método de número más probable (NMP) (8, 9 y 10) y un valor  $> 1,1 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> indicó la viabilidad de este microorganismo.

La comprobación de la conservación de la estabilidad de las propiedades, se realizó mediante la determinación de la producción de toxina (Lf/mL) en procesos industriales mediante la técnica de Ramón (11), se tomó como criterio de aceptación un valor  $> 40$  Lf/mL para *C. tetani*. También se siguió el comportamiento del pH y la D.O en las diferentes corridas fermentativas.

Se evaluó la predicción de viabilidad (12) a cultivos liofilizados por ambos procedimientos, los cuales se

almacenaron a 37, 45 y 55 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) y se les determinaron los niveles de viabilidad. Se estimó el nivel de viabilidad a obtener en cultivos liofilizados, después de un año de almacenamiento

**Tabla No. 1. Resultados obtenidos en la producción de toxinas (Lf/mL y Kf) después de liofilizada la cepa *C. tetani* por los Procedimientos A y B**

N° de corridas fermentativas	Procedimiento A		Procedimiento B	
	Lf/mL	Kf (min)	Lf/mL	Kf (min)
1	50	10	40	20
2	55	15	45	8
3	50	5	55	5
Promedio	51	15	45	11
Desv. Estándar	2,9	5	7,6	7,9

Como se observa en esta Tabla, la producción de toxina se mantuvo con valores similares en ambos procedimientos, obteniéndose una desviación estándar más pequeña en el procedimiento A. Para evaluar la estabilidad de la producción de toxina se estudió el comportamiento de los valores de pH y DO (Figuras 1-4), en tres

a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Para procesar los datos se utilizó el programa BIOEST 2 (3).

### 2. Evaluación del método de congelación $-20^\circ\text{C}$ para la preservación de *C. tetani*.

Los tubos con cultivo de *C. tetani* en Tioglicolato, obtenidos del último pase, se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Se evaluó la pureza, viabilidad y estabilidad (de igual forma) a los siete días y al mes.

El cultivo conservado por ambas metodologías (liofilización y congelación), se llevaron a escala industrial para la medición de su estabilidad. Se realizaron varias fermentaciones (3 por cada variante a evaluar) para comprobar la reproducibilidad de los datos; para ello se empleó un fermentador o Bioreactor del tipo Chemap con capacidad nominal de 35L y volumen efectivo de 25 L, temperatura de  $35^\circ\text{C}$  y velocidad de agitación 70 rpm.

Se aplicó un ANOVA de observaciones repetidas para el análisis estadísticos de los resultados obtenidos con los Procedimientos (A ó B) para la conservación de *C. tetani* por liofilización, los obtenidos por el método de congelación a  $-20^\circ\text{C}$  y los de la cepa original.

## Resultados

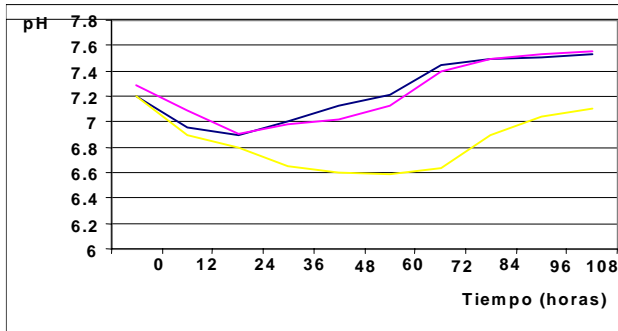
### 1) Comparación de dos procedimientos para la conservación de *C. tetani* por liofilización.

En la evaluación de la metodología para la liofilización de *C. tetani* por los Procedimientos A y B, los resultados indicaron el mantenimiento de la pureza. Con respecto a la viabilidad, los valores de la concentración celular obtenidos, antes y después de la liofilización por ambos procedimientos fueron:  $> 1,100 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> y  $1,100 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Como se puede apreciar ambos valores son similares, por lo que se consideró que los dos procedimientos evaluados, mantuvieron la viabilidad del cultivo liofilizado.

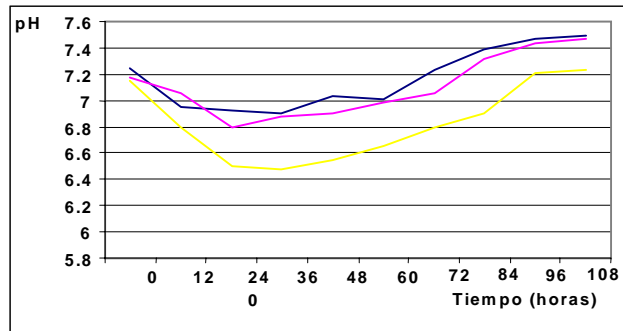
Los resultados de la evaluación de la conservación de la estabilidad para el proceso de liofilización en *C. tetani* en cuanto a Lf/mL y Kf (tiempo de expresión de toxina), por ambos procedimientos, se presentan en la Tabla 1.

corridas fermentativas, utilizando los dos procedimientos (A y B). Las Figuras muestran que los parámetros ensayados mantuvieron valores similares en las tres fermentaciones a través de los dos procedimientos.

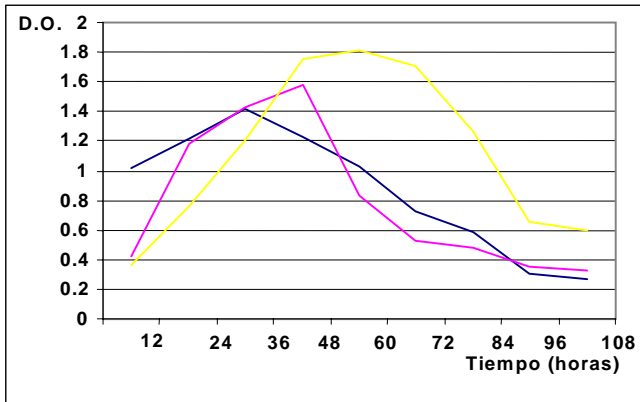
**Figura 1. Comportamiento del pH con el tiempo en tres procesos fermentativos de *C. tetani*, empleando el Procedimiento A**



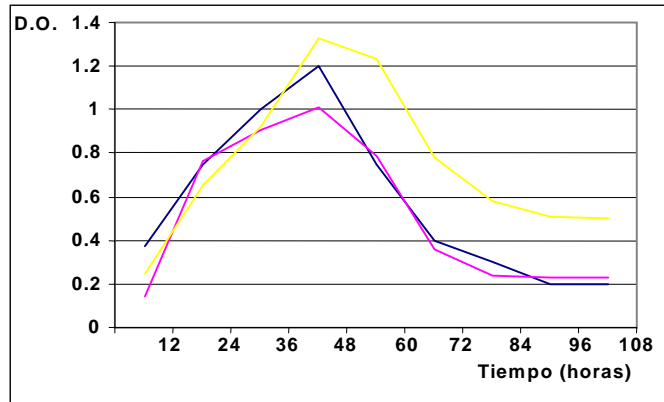
**Figura 2. Comportamiento del pH con el tiempo de tres procesos industriales de *C. tetani*, empleando el Procedimiento B**



**Figura 3. Comportamiento de la DO con el tiempo en tres procesos industriales de *C. Tetani*, empleando el Procedimiento A**



**Figura 4. Comportamiento de la DO con el tiempo en tres procesos industriales de *C. Tetani*, empleando el Procedimiento B**



Los procedimientos A y B analizados para la liofilización de *C. tetani*, mantuvieron la pureza, viabilidad y estabilidad de las características de interés del cultivo. Los niveles de viabilidad y estabilidad obtenidos fueron similares en ambos procedimientos. Por tanto, pueden utilizarse indistintamente para la conservación de este microorganismo por liofilización.

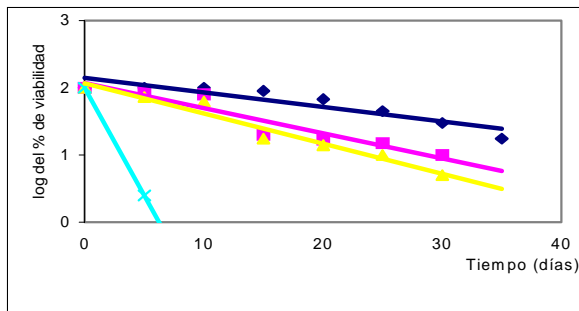
Sin embargo, desde el punto de vista económico, atendiendo al medio de cultivo utilizado para la obtención de biomasa, el Procedimiento A resulta menos costoso y complejo que el B, aunque en este último se utiliza un medio de cultivo líquido, que se sugiere para lograr la máxima calidad del producto. Sin embargo, en el Procedimiento B, se necesita realizar un subcultivo adicional, lo cual no es recomendable, pues el incremento de subcultivos aleja al cultivo cada vez más del original.

Por tanto, se infiere que teniendo en cuenta que ambos procedimientos ensayados dieron buenos resultados para la preservación del cultivo y que ambos tienen ventajas y desventajas, la selección de uno u otro es un proceso de compromiso entre los factores implicados y las necesidades e intereses del usuario. No obstante se sugiere incorporar el Procedimiento A para la conservación de *C. tetani* en el Programa de Mantenimiento.

Con respecto, a la predicción de viabilidad por el método de almacenaje acelerado descrito por Moreira en 1991, en la Figura 5 se muestra la disminución del porcentaje de viabilidad obtenida, al aumentar el tiempo y la temperatura de almacenamiento después de liofilizada la cepa *C. tetani*, por los Procedimientos A y B.

Para cada temperatura, el gráfico logarítmico de los puntos experimentales resultó en líneas rectas, como también ha sido observado para otras bacterias (14, 15 y 16).

**Figura 5. Logaritmo del porcentaje de células viables de *C. tetani* en función de la temperatura y del tiempo de almacenamiento**



En la Tabla No. 2 se muestran los valores de las constantes de velocidad aparente ( $k$ ) o pendientes de las rectas para el producto liofilizado según los Procedimientos A y B.

**Tabla No. 2. Constantes de velocidad aparente ( $k$ ) o pendientes de las rectas para *C. tetani* liofilizada según los Procedimientos A y B**

Temperatura (°C)	$k$ (días <sup>-1</sup> )	
	Procedimiento A	Procedimiento B
37	- 2,6863	- 2,7300
45	- 2,4234	- 2,3220
55	- 1,0062	- 1,0062

Dichas pendientes se ajustaron a la ecuación de Arrhenius y las expresiones de ajuste fueron:

Procedimiento A:  $\ln k = - 9700 (1/T) + 28,41$

Procedimiento B:  $\ln k = - 9907 (1/T) + 29,08$

Con estas expresiones se calculó el valor de  $k$  correspondiente a diferentes temperaturas de almacenamiento y mediante la ecuación de la cinética de primer orden se determinó el porcentaje de células viables para un año de almacenamiento a 4 ° C. Los resultados obtenidos fueron:

Procedimiento A:  $6,6 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>. Procedimiento B:  $6,9 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>

Como puede observarse ambos procedimientos arrojaron iguales resultados. Los valores obtenidos inmediatamente después de la liofilización, y los del estudio de la predicción fueron similares, lo cual indicó la posible conservación de viabilidad del cultivo liofilizado por un período de un año, mediante los dos procedimientos.

- Evaluación del método de congelación a -20 ° C para la conservación de *C. tetani*.

La cepa *C. tetani* se conserva en la Colección a través de la técnica de liofilización, teniendo en cuenta, que este cultivo es necesario para la producción de la vacuna vax-TET® y con el objetivo de buscar otro método de preservación, que evitara la posible pérdida del cultivo, se evaluó el método de congelación a -20 °C.

En este estudio, los cultivos congelados mantuvieron la pureza durante el tiempo evaluado. La viabilidad fue de  $1 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> antes y  $7 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> después de la congelación.

Los resultados de la evaluación de la estabilidad para este proceso en cuanto a Lf/mL y Kf, fue de 40, 40 y 60 Lf/mL y 13, 11 y 5 Kf respectivamente.

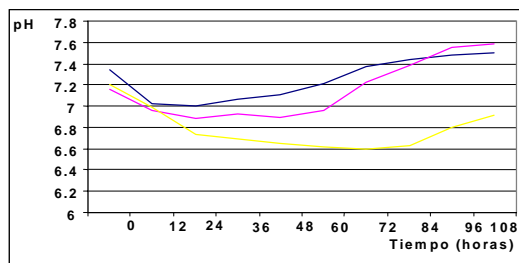
Como se aprecia, la producción de toxina mantuvo en valores comparables con los obtenidos por los dos procedimientos de liofilización. Los valores de pH y DO se muestran en las Figuras 6 y 7 respectivamente, estos dos parámetros se comportan de forma similar en las tres fermentaciones y en comparación con los resultados alcanzados en la liofilización.

Este método resulta satisfactorio para la conservación de esta cepa al igual que el proceso de liofilización. La ventaja del método de congelación a -20 °C es que resulta menos costoso que la liofilización, confirmando lo señalado por Smith y Onions en 1994 (17), quienes apuntan que a pesar de sus ventajas, el proceso de liofilización es complejo y costoso, pues aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío. Se propone la incorporación del método de congelación en el Programa de Mantenimiento de la Subcolección para la conservación de *C. tetani*. De esta manera se conservaría este cultivo por dos métodos diferentes, previendo así su posible pérdida. Con ello, se cumple con uno de los requisitos recomendados por Hawksworth y colaboradores (1990) (18) para el establecimiento y operación de colecciones de cultivos microbianos.

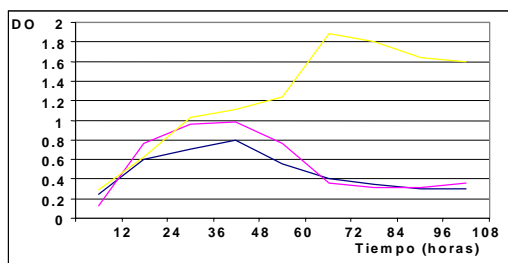
El análisis estadístico de los resultados obtenidos en *C. tetani* con el Procedimiento A y Procedimiento B de liofilización, la congelación y los datos de la cepa original se relaciona a continuación: Se aplicó un ANOVA de observaciones repetidas y se compararon los diferentes valores de DO y pH. Se constató que no existió diferencia significativa en los parámetros probados,  $p = 0,46$  y  $p < 1 \times 10^{-9}$  respectivamente, mientras que sí hubo diferencia significativa en el factor de respuesta,  $p = 1 \times 10^0$ .

Se concluye que en la evaluación de diferentes metodologías para la preservación de *C. tetani* se encontró que: los Procedimientos A y B de liofilización y la congelación a -20 °C resultaron satisfactorios para la preservación de *C. tetani*. No obstante se recomienda continuar los estudios a largo plazo y además realizar un estudio de conservación por congelación a -70 ° C y compararlo con los obtenidos en este trabajo

**Figura 6. Comportamiento del pH con el tiempo de tres procesos industriales de *C. tetani*, empleando la congelación**



**Figura 7. Comportamiento de la DO con el tiempo en tres procesos industriales de *C. tetani*, empleando la congelación**



## Referencias

- Bizzini B. Tetanus Bacterial vaccines. De Germanier, R., Academic Press, Orlando. 1984:1-36.
- Brooks GF, Butel JS y Ornston, LN. Microbiología Médica DE Jawetz, Melnick y Adelberg. 15ª. Edición. De la 20ª Edición en inglés. 1996:210-212.
- Alvarez M y Alvarez H. Propuesta tecnológica para la obtención de una vacuna antipertussis de células enteras. [ Trabajo de Tesis] . La Habana: Instituto Politécnico de Química. "Mártires de Girón", 1996.
- González P. Vacuna DPT mejorada. Rev. Ciencias Farmacéuticas. 1995; 2:116-118.
- Snell J.J. S. General Introduction to Maintenance Methods. En: B.E. Kirsop y A. Doyle (eds.) Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods. 2da edición. London: Academic Press; 1991:21-30.
- Latham WC, Bent DF y Levine, L. Tetanus Toxin Production in the Absence of Protein. Applied Microbiology. 1962; 10: 146-152.
- Fernández, P. Microbiología General. La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1983.
- Collins CH. Métodos Microbiológicos. España: Editorial Acribia. 1969:163-169.
- International Standard. ISO 7251 (E). Microbiology—General guidance for enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique. 1984:1–9.
- Peeler JT, Houghtby GA y Rainosek AP. The Most Probable Number Technique. Chapter 6. En: C. Vanderzant y DF Splittstoesser. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Third Edition. 1992:105-119.
- Ramón G. Flocculation dans un élange neutre de toxine antitoxine diphtériques. C. R. Soc. Biol. 1922; 86: 661.
- Moreira T. Principios básicos de la Liofilización. Folleto CNIC; 1991.
- Alvarez E, Moreira T y Cabrera L. BIOEST: Sistema para la predicción de la estabilidad de productos biológicos. Rev. CNIC de Ciencias Biológicas. 1991; 22 (3).
- Mitic S, Otenhajmer I y Demjanovic V. Predicting the stabilities of freeze-dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test. Cryobiology 11. 1974:116-120.
- Griffin CW, Cook EC y Mehaffey MA. Predicting the stability of freeze-dried *Fusobacterium mortiferum* proficiency testing samples by accelerated storage test. Cryobiology. 1981; 18:420-425.
- Koshelev AV y Nesterov IA. Acelerated test for predicting survival of lyophilized culturas of Methanotrophic bacteria. Mikrobiologiya. 1987; 56:399-403.
- Smith D y Onions AHS. The preservation and maintenance of living fungi. Second edition. IMI Technical Handbooks. Walling ford, UK: CAB International. 1994; 2:122
- Hawsworth DL, Sastramihardja I, Kokke R y Stevenson, R.- Guidelines for the Establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. WFCC Standards Committee. UK: Simwort Press, Richmond Surrey; 1990.

## Evaluation of different methodologies for the preservation of *Clostridium tetani*, used in the production of human vaccines

### Abstract

In this study different methodologies for the preservation of *Clostridium tetani* were evaluated. To verify the culture maintenance, an adequate quality control was carried out, including tests for purity, viability and stability of the main characteristics. Two procedures for liofilization were compared and a method to preserve *C. tetani* by freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  was evaluated. In order to measure certain parameters, some processes were performed at an industrial scale, using a 35L Chemap biorreactor. Alternatives and solutions to conservation problems were looked for. The results obtained suggest the possibility of its inclusion in the Maintenance Program already established.

**Key words:** Conservation, *Clostridium tetani*.