

Conservación por congelación de *Bordetella pertussis* y *Corynebacterium diphtheriae*, empleados en la producción de vacunas para uso humano

Elsie Iglesias, Yilian Plasencia, Teresita Morales y Luis Izquierdo.

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

En el presente estudio se evaluó el método de congelación a -70°C para la preservación de *Bordetella pertussis* y *Corynebacterium diphtheriae*. Para verificar el sustento de los cultivos se realizó un adecuado control de calidad, que incluyó comprobación de pureza, viabilidad y estabilidad de las propiedades de interés. En este trabajo se probaron diferentes formulaciones. Se seleccionó la que arrojó los mejores resultados y se realizó un estudio de mantenimiento de las características evaluadas durante el tiempo. Para medir determinados parámetros se realizaron procesos a escala industrial, empleándose para esto un biorreactor Chemap de 35 L. Se tomaron como referencia los valores obtenidos por las cepas conservadas por liofilización. De esta forma se buscaron 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, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*

Introducción

Bordetella pertussis y *Corynebacterium diphtheriae* constituyen los agentes causales de la tos ferina y la difteria respectivamente (1), al ser microorganismos patógenos humanos; la vacunación contra ellos resulta de suma importancia como medio profiláctico por excelencia.

Ambos microorganismos constituyen las materias primas para la elaboración de la vacuna DPT, unido con *Clostridium tetani*, de ahí la necesidad de su correcta conservación.

Para llevar a cabo un correcto programa de preservación se deben conservar estos micro-organismos por dos métodos diferentes (2,3). Además se deben elaborar lotes de semilla con el objetivo de subcultivarse lo menos posible y garantizar estabilidad en el proceso productivo.

Uno de los aspectos claves en la conservación de microorganismos, en este caso *B. pertussis* y *C. diphtheriae* es definir qué aditivo o crioprotector es el más apropiado para su uso, además conocer por cuánto tiempo podemos mantener la viabilidad de ellos usando este método (4).

En la Colección de Cultivos Finlay (CCF) ambos microorganismos se encuentran conservados solo por liofilización, por tal motivo urge la necesidad de evaluar otra metodología para la preservación de los mismos (5), con lo cual se brindarían 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 objetivos principales comparar diferentes formulaciones para preservar las cepas *Bordetella pertussis* 134; 509 y 165 (CCF A0006, CCF A1161 y CCF A1160) y *Corynebacterium diphtheriae* Park-Williams 8 (CCF A0254) por congelación a -70°C , así como evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad y estabilidad de las cepas conservadas.

Materiales y Métodos

A) Comparación de diferentes formulaciones para la preservación por congelación a -70°C de *Bordetella pertussis* (CCF A0006, CCF A1161 y CCF A1160)

Se obtuvo crecimiento en medio líquido, a partir de la cepa original conservada por liofilización, para esto la ampolla se resuspendió con 0,5 mL de caldo casaminoácido al 1% y sembradas por agotamiento en placas de agar Bordet Gengou suplementadas con sangre desfibrinada de carnero al 20% (1), las mismas se incubaron durante 72 h a 35°C , se realizó un segundo pase en forma de césped en el mismo medio y se incubaron nuevamente por 48 h. El césped bacteriano crecido se recogió en 1 mL de caldo casaminoácido al

1%, se sembró en cuñas de agar Bordet Gengou y se incubó del mismo modo. La biomasa se resuspendió con 5 mL de medio líquido Stainer y Scholte (6). La suspensión se inoculó en un erlenmeyer con 100 mL del mismo medio. Se determinó densidad óptica inicial ($\lambda=530$ nm) y se incubó a 35 °C y 120 rpm por 24 h en un agitador orbital termostataado.

Cuando el cultivo se encontró en fase exponencial, se determinó la densidad óptica final, constatándose la pureza por tinción de Gram. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min, la biomasa se resuspendió en 50 mL de leche descremada al 20% y la suspensión se distribuyó en ampollas a razón de 0,4 mL por cada una, para su posterior liofilización.

A partir de estas ampollas liofilizadas se obtuvo un cultivo de 24 h, se tomaron 0,5 mL que se adicionaron a viales plásticos con 0,5 mL de las formulaciones a evaluar: a) leche descremada 10%, b) glicerol 10%, c) Caldo Triptona Soya, dextrosa, leche descremada, glicerol (composición: 30, 5; 20 g y 40 mL para 1 L de agua destilada, esterilización, 20 min a 121 °C (7) y d) Infusión Cerebro Corazón y glicerol 70%.

Posteriormente, se guardaron en un congelador a -70 °C. A los 7 días se evaluó la conservación de pureza (8), viabilidad (9) y estabilidad (Unidades de Opacidad [UO] y seroaglutinación) (10 y 11 respectivamente) de los congelados. Como criterio positivo de conservación de los cultivos se consideró, un valor $> 10^5$ cel mL⁻¹ y >30 UO.

Se seleccionó la formulación que arrojó los mejores resultados, para esto se aplicó un ANOVA, y posteriormente se realizó un estudio de mantenimiento de las propiedades evaluadas durante el tiempo, (3 y 9 meses para las cepas CCF A1160 y CCF A1161 y 7 y 33 meses para la cepa CCF A0006).

Para medir DO y UO los cultivos conservados por esta formulación se llevaron a escala industrial, realizándose siete fermentaciones para CCF A1160, 10 para la cepa CCF A1161 y 13 para la cepa CCF A0006.

Para realizar estos procesos se empleó un biorreactor Chemap de 35 L, con un volumen efectivo de 10 a 20 L, temperatura de 35 °C y una agitación variable (680-180).

Se tomaron como referencia los valores obtenidos por las cepas de *B. pertussis* conservadas por liofilización.

B) Evaluación de diferentes formulaciones para la preservación por congelación a -70 °C de *C. diphtheriae* CCF A0254

A partir del cultivo original liofilizado, se obtuvo crecimiento en medio líquido, para esto se tomó una

ampolla y se resuspendió con 0,5 mL de caldo Lab Lemco 1% y se inoculó en 1 mL de este caldo que se incubó a 34,5 °C durante 24 h. El mismo se sembró en cuñas Löeffler (12) incubándose a 34,5 °C durante 48 h.

El crecimiento obtenido se arrastró e inoculó en erlenmeyers de 500 mL que contenían 100 mL de medio Stainer modificado más 10 mL de solución de maltosa al 25% (13).

Se determinó la densidad óptica inicial ($\lambda= 530$ nm) y se incubó a 34,5 °C durante 18 h a 160 rpm en un agitador orbital termostataado.

Cuando el cultivo llegó a la fase exponencial se detuvo el crecimiento, se determinó la densidad óptica final, se chequeó la pureza por tinción de Gram y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min.

La biomasa se resuspendió en 50 mL de leche descremada al 20% y la suspensión se distribuyó en ampollas a razón de 0,4 mL por cada una para ser liofilizadas.

Ambos procesos de liofilización fueron llevados a cabo en un liofilizador USIFROID SMH-15 por 18 h, con una presión de la cámara de 5×10^{-2} mbar y temperatura del condensador de -60 °C. Finalmente las ampollas se sellaron al vacío. A todos se les determinó el vacío, empleando un "Spark tester" tipo ST4M.

A partir de una ampolla se obtuvo un cultivo de 18 h, se tomaron 0,5 mL y se depositaron en viales plásticos con 0,5 mL de las formulaciones a ensayar: a) leche descremada al 10%, b) glicerol al 10%, c) Caldo Triptona Soya, dextrosa, leche descremada y glicerol (30, 5, 20 g, 40 mL respectivamente, para 1 L) (7).

Finalmente, se guardaron en un congelador -70 °C y se les realizó a los 7 días la comprobación de la pureza, viabilidad y estabilidad (producción de toxina, mediante la técnica de Floculación de Ramón) (14). Se tomó como criterio de aceptación un valor >80 Lf/mL.

Se seleccionó la formulación que dio los mejores valores, para esto los datos se procesaron estadísticamente mediante la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples (HDS-Turkey), posteriormente se comprobó la conservación de las características de interés al cabo de 2, 4, 6 y 8 meses.

Para medir el comportamiento de la estabilidad de los cultivos conservados por esta formulación, se llevaron a escala industrial, realizándose 10 fermentaciones en un biorreactor Chemap de 35 L; las condiciones fueron las siguientes: volumen efectivo de 10 a 20 L, 34,5 °C de temperatura y agitación variable 680-180 rpm.

Los valores de referencia tomados fueron los obtenidos por la cepa de *C. diphtheriae* conservada por liofilización.

Resultados y Discusión

B. pertussis y *C. diphtheriae* se conservan en la colección sólo a través de la técnica de liofilización. De ahí la necesidad de buscar otro método de conservación, que evite la pérdida de estos cultivos, así como contar con un procedimiento rápido y más económico que la liofilización para la elaboración de lotes de trabajo. Por tanto, se evaluó el método de congelación utilizando diferentes formulaciones.

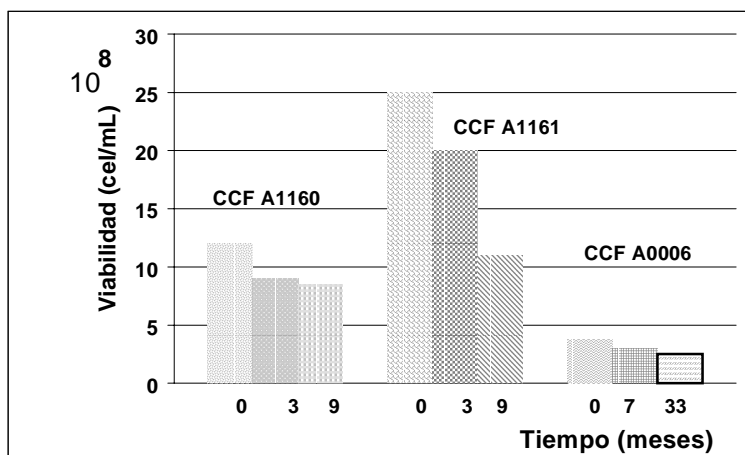
A) Comparación de diferentes formulaciones para la preservación por congelación a -70°C de *Bordetella pertussis* (CCF A0006, CCF A1161 y CCF A1160)

En la preservación de *B. pertussis* por congelación se mantuvo la pureza con todas las formulaciones ensayadas en los tiempos evaluados. Los resultados de viabilidad obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Conteo de células viables y porcentaje (%) de viabilidad (cel/mL^1) de *B. pertussis* (CCF00 A1161, CCF A1161 Y CCF A0006) en la congelación utilizando diferentes formulaciones

Viabilidad			
Formulación	Antes de congelar cel mL^{-1}	Después de congelar cel mL^{-1}	(%)
<i>B. pertussis</i> CCF A1161			
a	$3,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	71,4
b	$9,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	28,9
c	$9,0 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	32,2
d	$6,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$	5,7
<i>B. pertussis</i> CCF A1160			
a	$3,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	40
b	$1,0 \times 10^9$	$2,5 \times 10^7$	25
<i>B. pertussis</i> CCF A0006			
a	$4,2 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	90,5
b	$9,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	16,7

Figura 1. Comportamiento de la viabilidad durante el almacenamiento de las cepas CCF A1160, A1161 y A006 de *B. pertussis* congeladas a -70°C , con la formulación (a)



Como se observa, en la evaluación de la preservación de cepas de *B. pertussis* por congelación a -70°C con diferentes formulaciones, con todas las cepas, la leche descremada (a), resultó ser la mejor formulación para crioconservar. Los resultados obtenidos por este método empleando la formulación (a) fueron muy similares cuando se compararon con los alcanzados con el método de liofilización.

En la Figura 1 se muestra el comportamiento de la viabilidad de las tres cepas de *B. pertussis* evaluadas con el tiempo de almacenaje, empleando leche descremada (a) como aditivo.

Una vez seleccionada la formulación **a**, se realizaron diferentes fermentaciones para las cepas en estudio y los valores de UO y DO se mantuvieron dentro del rango del

criterio de aceptación. Estos resultados, comparadas con los obtenidos en el proceso de liofilización, se muestran en las Figuras 2-7.

Figura 2. Comportamiento de la D.O. en los diferentes procesos de la CCF A1160 de *B. pertussis*, empleando la formulación (a)

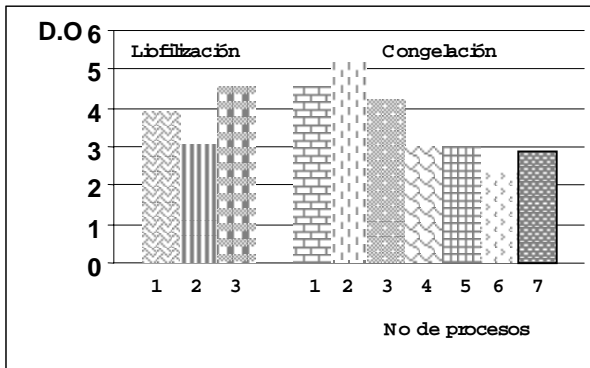


Figura 3. Comportamiento de las U.O. en los diferentes procesos de la cepa CCF A1160 de *B. pertussis*, empleando la formulación (a)

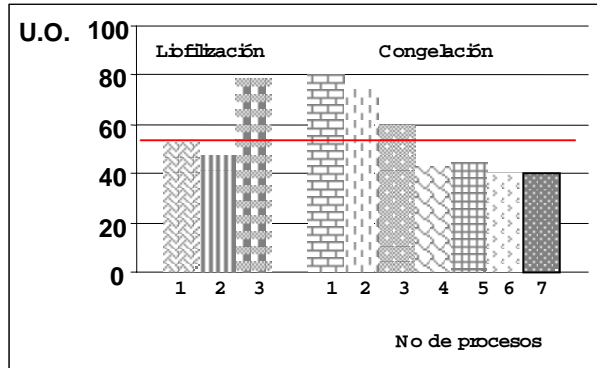


Figura 4. Comportamiento de la D.O. en los diferentes procesos de la cepa CCF.A1161 de *B. Pertussis*, empleando la formulación (a)

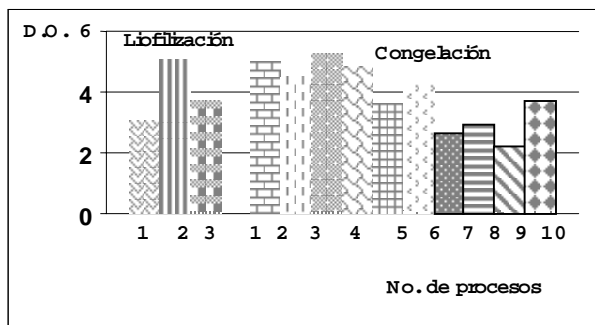


Figura 5. Comportamiento de la UO en los diferentes procesos de la cepa CCF A1161 de *B. Pertussis*, empleando la formulación (a)

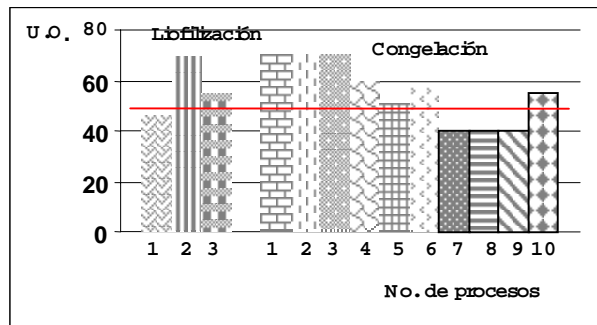


Figura 6. Comportamiento de la D.O. en los diferentes procesos de la cepa CCF A0006 *B. Pertussis*, empleando la formulación (a)

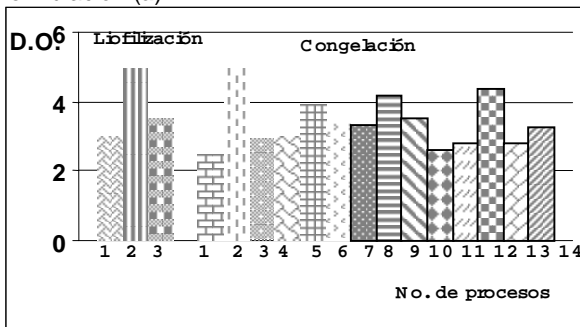
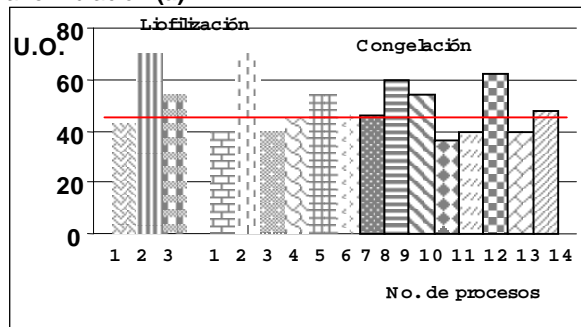


Figura 7. Comportamiento de la UO en los diferentes procesos de la cepa CCF A0006 *B. Pertussis*, empleando la formulación (a)



Como se aprecia, los comportamientos tanto de DO como de UO de todas las cepas conservadas por congelación fueron similares a los obtenidos con las mismas cepas conservadas por liofilización. Los resultados son semejantes cuando se comparan estos parámetros entre las tres cepas evaluadas.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en la congelación a -70°C de las tres cepas de *B. pertussis*, se realizó mediante el ANOVA con los porcentajes de viabilidad resultantes de las diferentes formulaciones empleadas. En la cepa CCF A1161, los resultados demostraron que existió diferencia significativa entre las formulaciones probadas, con una significación de $p=1,4 \times 10^{-14}$ y la prueba de comparaciones múltiples apuntó que todas las parejas son distintas entre sí, con una significancia $< 4 \times 10^{-4}$; en las cepas CCF A1160 y CCF

A0006, la prueba t para muestras independientes, señaló que existieron diferencias entre las dos formulaciones ($p=0,028$ y $p = 1,69 \times 10^{-8}$).

B) Evaluación de diferentes formulaciones para la preservación por congelación a -70°C de *C. diphtheriae*

En la preservación de *C. diphtheriae* por congelación se mantuvo la pureza con todas las formulaciones ensayadas en los tiempos evaluados.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la viabilidad con el empleo de las diferentes formulaciones, así como el mantenimiento de la estabilidad, referente a Lf/mL y Kf (valores todos obtenidos a pequeña escala (100 mL en incubadora termostataada con agitación orbital).

Tabla 2. Resultados del control de calidad de la cepa de *C. diphtheriae* conservada por congelación a -70°C , empleando tres formulaciones distintas

Formulación	Cel mL^{-1}	D.O.	Lf/mL	Kf
a	$1,4 \times 10^8$	6,28	55	0,5 min
b	$2,3 \times 10^5$	5,87	40	4 min
c	$1,3 \times 10^8$	5,94	43	1½ min

En el estudio de preservación de *C. diphtheriae* mediante congelación a -70°C utilizando diferentes formulaciones, resultó mejor la formulación compuesta por leche descremada (**a**). La formulación (**c**) también presentó buenos resultados, por lo que se recomienda como segunda opción.

En la Tabla 3 se muestra el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la congelación de *C. diphtheriae*, utilizando los valores de porcentajes de viabilidad, DO y Lf/mL con las diferentes formulaciones empleadas.

Tabla 3. Análisis estadístico aplicado a los valores de viabilidad (%), DO y Lf/mL obtenidos en la congelación de *C. diphtheriae* con el empleo de diferentes formulaciones

Análisis Estadístico	%	DO	Lf/mL
ANOVA	Diferencia Significativa $p < 1 \times 10^{-8}$	Diferencia Significativa $p = 2,65 \times 10^{-5}$	Diferencia Significativa $p = 7,6 \times 10^{-4}$
HSD-Tukey	a y c muy parecidos, $p = 0,85$ b muy diferente con c y a, $p = 0,22 \times 10^{-4}$	b y c son muy parecidas, $p=0,057$ a diferente con b y c, $p < 3 \times 10^{-3}$ $0,3 \times 10^{-4}$	b y c son muy parecidas, $p=0,32$ a muy diferente con b y c, $p < 3 \times 10^{-3}$

Como se observa en la Tabla 3, existen diferencias significativas en los resultados obtenidos, entre las formulaciones. Los valores de DO y la cantidad de toxina (Lf), obtenidos con el empleo de la formulación

(**a**), fueron superiores a los alcanzados por los obtenidos con (**b**) y (**c**). Con respecto a la concentración celular, las formulaciones **a** y **c** mostraron resultados similares.

Figura 8. Comportamiento de la viabilidad durante el tiempo de la cepa CCF A0254 de *C. diphtheriae* congelada a -70°C , con la formulación (a)

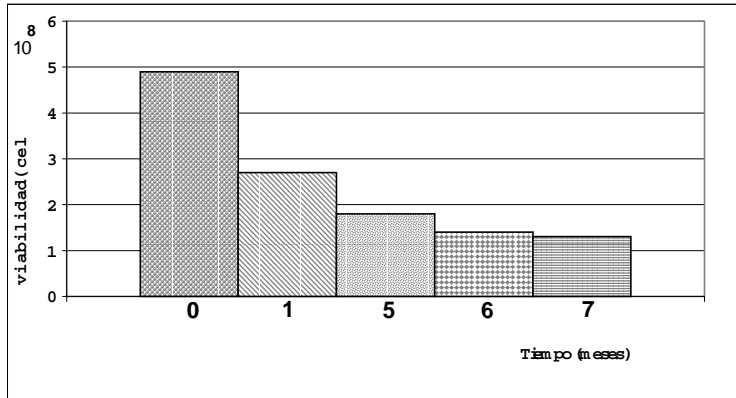
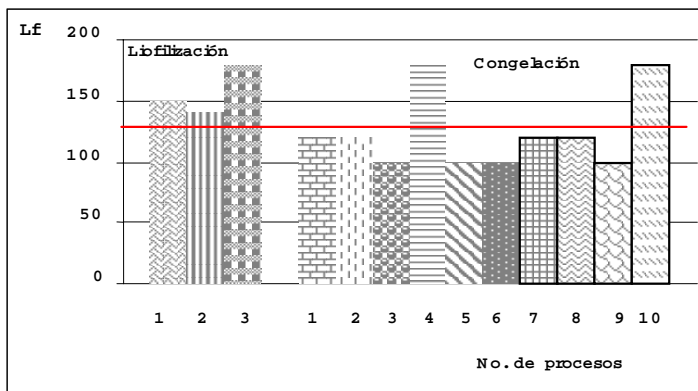
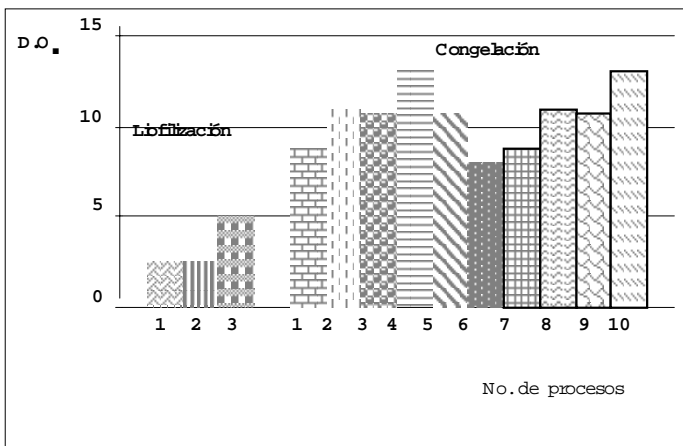


Figura 9. Comportamiento de la DO en los diferentes procesos de la cepa CCF A0254 de *C. Diphtheriae*, empleando la fórmula (a)



de la cepa CCF A0254 de *C. Diphtheriae*, empleando la formulación a



En la Figura 8 se observan los resultados de viabilidad (pequeña escala) de la cepa de *C. diphtheriae* conservada por congelación a -70°C , empleando leche descremada (a) como aditivo; la viabilidad (cel/mL) se mantuvo en el mismo orden.

En las Figuras 9 y 10 se presentan los resultados de la evaluación de la estabilidad para el proceso de congelación de *C. diphtheriae* con respecto a la producción de toxina en Lf/mL y mediciones de DO, en los diferentes procesos fermentativos, empleando la formulación (a). Los valores de DO y Lf/mL obtenidos se mantuvieron por encima del nivel adecuado del criterio de aceptación.

En la Figura 9, comparando los resultados de la congelación, con los de la liofilización, se observa que los valores de DO en la primera fueron muy superiores.

Los valores de Lf/mL que se muestran en la Figura 10 fueron obtenidos en un rango de Kf que fluctúa entre 0,5 y 2 min, tiempos que corresponden con el rango de aceptación. Los valores de Lf/mL en la congelación resultaron similares a los obtenidos por liofilización.

Teniendo en cuenta que este método arrojó resultados satisfactorios de pureza, viabilidad y estabilidad, consideramos que debe incorporarse al Programa de Mantenimiento para la preservación de las cepas de *B. pertussis* y *C. diphtheriae*. De esta manera se mantendrían estos cultivos por dos métodos diferentes, evitando su pérdida, según recomienda la WFCC para las colecciones de micro-organismos (2). Se concluye que la leche descremada al 10% es la formulación que permite obtener los mejores resultados en la preservación de *B. pertussis* y *C. diphtheriae* por congelación a -70°C . Con este método se mantiene la viabilidad y estabilidad de ambas cepas por

varios meses. No obstante se recomienda incorporar al Programa de Mantenimiento de la Subcolección, las metodologías (en forma de PNO) para la preservación de *B. pertussis* y *C. diphtheriae*,

evaluadas como satisfactorias y continuar los estudios de evaluación de este método a largo plazo.

Referencias

1. Joklik WJ, Willett HP, Amos DB, y Wilfert CM. *Zinsser Microbiología*. 20ª Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 1995:651-660, 670-683.
2. Hawthorth DL, Sastramihardja I, Kokke R y Stevenson R. Guidelines for the Establishment and operation of Collections of Cultures of Microorganisms. WFCC Standards Committee. UK: Simworth, Press, Richmond, Surrey; 1990.
3. Yamasato K. Deteriorated/Deteriorating Culture Collections. In: Colwell RR. (ed.). *Endangered Culture Collections*. Proceedings of the First and Second International Symposia. 1992:45-50.
4. Moreira T. *Principios básicos de la Liofilización*. [Folleto] La Habana: CNIC; 1991.
5. Snell JJ. General Introduction to Maintenance Methods. En: Kirsop BE y Doyle A (eds.). *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods*. 2da edición. London: Academic Press; 1991:21-30.
6. Stainer DW, y Scholte MJ. A simple chemically defined medium for the Production of phase I of *Bordetella pertussis*. *J. Am. Microbiol.* 1970; (63):211-220.
7. Gibson LF y Khoury JT. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Letter in Applied Microbiology*. 1986; (3): 127-129.
8. Fernández P. *Microbiología General*. Ciudad de La Habana: Editorial Pueblo y Educación; 1983.
9. Koch AL. Growth Measurements. In: Gerhardt P (ed.). *Am. Society for Microbiology; Washington, DC. Manual of Methods for General Bacteriology*. 1981: 179-207.
10. World Health Organization. Pertussis. The Immunological Basis for Immunization. Module 4; Series. Geneva; 1993. (WHO/EPI/ GEN/93, 14.)
11. Portwood LM. International Standards for Bacterial Content of Vaccines. International Symposium on Pertussis. In "Symposia Series in Immunobiological Standardization", *Bilthoven*. 1969:235-239.
12. Stainer DW y Scholte MJ. The Production of high Potency Diphtheria Toxin in Submerged Culture in Relatively Simple Equipment Using a Semisynthetic Medium. Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.* 1973; (4):283-293.
13. Stainer DW. Problems in the large-scale production of tetanus toxin. Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada. 1976. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*
14. Ramón G. Flocculation dans un élange neutre de toxine-antitoxine diphtériques. *C. R. Soc. Biol.* 1922: 86:661

Preservation by freezing of *Bordetella pertussis* and *Corynebacterium diphtheriae* used in the production of human vaccines

Abstract

In this study the method of -70°C freezing, for the preservation of *Bordetella pertussis* and *Corynebacterium diphtheriae*, was evaluated. An adequate quality control, which included purity, viability and stability testing of the main characteristics, was carried out to verify culture maintenance. For this study different formulations were tested. The one with the best results was selected and a study of maintenance of the characteristics was evaluated through time. In order to measure certain parameters, some industrial scale processes were performed, using a 35 L Chemap bio-reactor. The values obtained from lyophilization-preserved strains were taken as a reference. Thus, the search for alternatives and solutions to problems in their preservation was carried out. The results obtained suggest their possible inclusion in the already established Maintenance Program.

Key words: Preservation, *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*.