

Sistema de Lotes de Siembra de cepas de *Neisseria meningitidis* cultivadas en medios de origen no animal

Carmen Alina del Puerto-Sardiñas,* Marixa Hernández-Fundora, Humberto González-Rodríguez, Ana Lourdes Leyva-Rodríguez, Nadiezda Baños-Paiffer, Iris Mariela Fernández-Esperón, Alina Cruz-Ferrer, Roselyn Martínez-Rivera

Instituto Finlay. Ave 27 No. 19805 entre 198 y 202 La Lisa, La Habana, Cuba. AP. 16017, CP 11600.

email: carmen@finlay.edu.cu

En la producción de biológicos, especialmente aquellos obtenidos de microorganismos, resulta esencial contar con un suministro de cepas estable y bien caracterizado como materia prima para la producción. Para esto, es imprescindible conservar las cepas vacunales empleando el Sistema de Lotes de Siembra, así como contar con medios de cultivo que garanticen un óptimo crecimiento microbiano y la presencia de los antígenos de interés. En el Instituto Finlay de La Habana se trabaja en la obtención de una vacuna contra *Neisseria meningitidis* libre de componentes de origen animal. En el presente trabajo se elaboraron y caracterizaron Lotes de Siembra de Referencia y Trabajo de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, Y, W135 y X cultivados en medios de origen no animal y cumpliendo con las Buenas Prácticas de Producción vigentes. 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 claves: *Neisseria meningitidis*, vacunas, medios de cultivo.

Introducción

El Sistema de Lotes de Siembra es un elemento fundamental en el desarrollo y fabricación de productos biológicos, pues lograr la calidad y eficacia del producto final depende en gran medida de la conservación de los microorganismos empleados para ello. Este sistema se usa para prevenir los cambios o pérdida de propiedades de los microorganismos empleados como materia prima en la producción de biofármacos, a consecuencia de subcultivos repetidos o generaciones múltiples.

El concepto de 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, es considerado como la manera más práctica para asegurar la identidad y pureza del sustrato celular empleado como materia prima para la fabricación continua de un producto biológico. La caracterización de dichos lotes de siembra es un componente crítico del proceso, ya que permite confirmar la identidad, pureza y estabilidad del microorganismo de interés (1). De igual manera, la documentación apropiada de la preparación, ensayo y controles de rutina de dichos lotes, es una parte esencial del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción (BPP) vigentes (2).

En la elaboración de estos lotes es imprescindible contar con medios de cultivo que garanticen un óptimo crecimiento microbiano, así como la presencia de los antígenos de interés.

En el Instituto Finlay de La Habana, Cuba, se trabaja en la obtención de una vacuna contra *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, Y, W135 y X libre de componentes de origen animal, disminuyendo así los riesgos inherentes al uso de este tipo de productos (3). *Neisseria meningitidis* es considerado un microorganismo exigente en cuanto a los requerimientos para su cultivo, ya que sólo crece en medios enriquecidos, dentro de límites estrechos de temperatura y pH. Tradicionalmente se emplea el Agar Mueller Hinton suplementado con suero de ternero (4). Algunas empresas emplean enzimas de origen porcino en la fabricación de este medio.

Las cepas utilizadas tradicionalmente para este tipo de vacunas y que son recomendadas por la Organización Mundial de la Salud, tienen el inconveniente de ser aislamientos de la década de los 70, época en que los componentes de los medios eran fundamentalmente de origen animal, por lo que es necesario partir de nuevos aislamientos en medios de cultivo que no tengan dichos componentes.

* Master en Microbiología Clínica. Laboratorio de liofilización y conservación de cepas. Dirección de Calidad.

Teniendo en cuenta lo anterior nos propusimos como objetivo establecer el Sistema de Lotes de Siembra para cepas vacunales de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, Y, W135 y X cultivadas en medios de origen no animal, y cumpliendo con lo establecido en las BPP.

Materiales y Métodos

Cepas: Las cepas fueron aisladas de pacientes entre los años 1997 y 2003 y pertenecen a los serogrupos A, C, Y, W135 y X; dichos aislamientos constituyen los lotes maestros.

Medios de cultivo y soluciones:

- Caldo triptona soya de origen no animal (CTS).
- Agar triptona soya de origen no animal (caldo triptona soya de origen no animal + agar agar) (ATS).
- Soluciones de glicerol al 15% y al 20%.
- Medio líquido para *Neisseria meningitidis* (extracto de levadura, glucosa, L-cisteina monohidrato, L-glutamato y disodio hidrógeno fosfato) (MLNM).

Todos los medios y soluciones empleados en la elaboración de los lotes cuentan con la certificación de origen, que asegura que no contienen productos de origen animal.

Redacción de la documentación: Los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) para la elaboración y caracterización de los Lotes de Siembra, los Registros Maestros de Lote (RML), 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 BPP para productos biológicos y farmacéuticos (2, 5-8).

Elaboración de los Lotes de Siembra de Referencia: A partir del Lote Maestro se realizó una siembra por agotamiento en ATS. Las placas se incubaron a $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 durante 18 a 24 horas. A partir de las colonias aisladas se realizó una siembra en césped en el mismo medio, se incubó en iguales condiciones. La biomasa de cada placa se resuspendió en 3 mL de la solución crioprotectora constituida por una mezcla de Glicerol 20% + CTS.

Se comprobó la pureza por tinción de Gram para la observación de diplococos Gram negativos. Las suspensiones con resultado de pureza satisfactorio se mezclaron en un erlenmeyer estéril y se distribuyó a razón de 0,4 mL por criotubos, los cuales fueron identificados

(nombre y número de la cepa, número de lote y fecha de elaboración) y almacenados a -70°C .

Elaboración de los Lotes de Siembra de Trabajo: A partir de un criotubo del Lote de Siembra de Referencia se sembraron 100 μL de la suspensión por agotamiento en ATS, se incubaron las mismas como se describió previamente. La biomasa obtenida se resuspendió en 3 mL de medio MLNM y se comprobó la pureza por tinción de Gram. A partir de esta suspensión se inocularon erlenmeyers con 100 mL de medio MLNM, los cuales se incubaron a $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ con agitación en zaranda orbital termostataada a 200 rpm, hasta obtener valores de absorbancia $\geq 1,0$. Se realizó tinción de Gram para comprobar la pureza del cultivo. Se añadieron 100 mL de Glicerol 15%. La mezcla se homogeneizó y se distribuyó a razón de 3 mL en viales, los cuales fueron identificados y almacenados a -70°C .

Caracterización de los Lotes de Siembra de Referencia y Trabajo: Cada lote se caracterizó empleando los siguientes ensayos: viabilidad, observación de características culturales, pureza (tinción de Gram y siembra en diferentes medios), crecimiento a 25°C , potencialidad de crecimiento en medio líquido e identidad (pruebas bioquímicas y serológicas).

Confección de los expedientes: A cada lote se le confeccionó un expediente con toda la documentación que garantiza el cumplimiento de las BPP.

Resultados y Discusión

Redacción de la documentación: Previo a la elaboración de los nuevos Lotes de Siembra se confeccionaron los PNO, RML y ESPE. 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 (2) e internacionales (5-8).

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. Los RML deben ser llenados a medida que se realizan las operaciones, lo que demuestra que el procedimiento ha sido realizado

y que se ha alcanzado la calidad requerida. Las ESPE constituyen estándares de calidad críticos para asegurar la calidad y consistencia del producto.

Elaboración de los Lotes de Siembra: La elaboración de todos los Lotes de Siembra se ejecutó por personal calificado y entrenado 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 a los procedimientos establecidos. Cada cepa empleada como Lote Maestro cuenta con su historia lo que garantiza su trazabilidad (1, 3). Todas las operaciones se efectuaron de acuerdo a los principios básicos de las Buenas Prácticas de Producción (2, 5-8).

Caracterización de los Lotes de Siembra

Viabilidad

En la Tabla se presentan los resultados de la determinación de viabilidad de los lotes. En todos los casos la viabilidad fue superior a 10^5 UFC/mL por lo que estos resultados cumplen con el límite de aceptación del ensayo establecido en las especificaciones ($\geq 10^5$ UFC/mL).

La congelación de cultivos a temperaturas inferiores a -70°C sigue siendo el método más común de preservación por largos periodos de tiempo (9). Los altos recobrados de viabilidad y la conservación de las características genéticas de los cultivos, hacen que sea ampliamente utilizado en la industria biofarmacéutica.

Para obtener mejores resultados se utilizan sustancias llamadas crioprotectores, de ellas el glicerol es una de las más empleadas ya que mejora la supervivencia de las células al minimizar el contenido de agua intracelular, apoya el proceso de vitrificación y protege las estructuras celulares (10).

Ensayos de identidad

Los ensayos de identidad de todas las cepas mostraron que el comportamiento de las características culturales, fisiológicas, bioquímicas y serológicas se mantuvieron de acuerdo a lo descrito para *Neisseria meningitidis* (4, 11), cumpliendo así con los criterios de aceptación establecidos en las ESPE.

El crecimiento en ATS permitió observar colonias de color crema, de bordes enteros, convexas y brillantes. Todas las cepas produjeron la enzima citocromo oxidasa

Tabla. Clasificación de serotipos y subtipos del serogrupo B de *Neisseria meningitidis* aisladas en un estudio de 93 pacientes.

Serogrupo	Viabilidad (UFC/mL)	
	LSR	LST
A	1×10^7	$1,96 \times 10^8$
C	$4,6 \times 10^9$	$4,53 \times 10^7$
Y	6×10^9	$1,66 \times 10^7$
W	$1,67 \times 10^8$	$3,85 \times 10^8$
X	$1,37 \times 10^9$	$7,8 \times 10^8$

LSR: Lotes de Siembra de Referencia.

LST: Lotes de Siembra de Trabajo.

y degradaron la glucosa y maltosa con producción de ácido, no así la sacarosa, lactosa y fructosa.

No se observó crecimiento a 25°C , mientras que los cultivos en medio líquido presentaron valores de absorbancia mayores que 1,0 a las 4 horas de incubación. El ensayo de aglutinación en lámina demostró la identidad de cada cepa al observarse aglutinación frente a cada antisuero del serogrupo específico.

Para los microorganismos, el análisis del crecimiento en medios selectivos así como las propiedades bioquímicas, fisiológicas y serológicas son adecuados para confirmar la identidad (1, 3).

Ensayos de pureza

Un aspecto muy importante en la caracterización de lotes de siembra, lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes (1, 3).

Las características de los cultivos realizados en agar sangre de carnero 5%, agar triptona soya y caldo triptona soya y tioglicolato, incubados a $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y 25°C coincidieron con *Neisseria meningitidis*, y no se observaron otras colonias con características morfológicas diferentes. La observación al microscopio de los cultivos teñidos por el método de Gram demostró la presencia de diplococos Gram negativos (4, 11). Todo lo anterior nos permite afirmar que los lotes de siembra mantuvieron resultados de pureza satisfactorios.

Confección de los expedientes

Cada lote cuenta con su expediente que incluye: certificado de origen, registro de elaboración del lote, informes de resultados de los ensayos realizados, registros de existencia y certificados de liberación.

Conclusiones

Se estableció en el Instituto Finlay de La Habana, el Sistema de Lotes de Siembra para cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupos A, C, Y, W y X, cultivadas y conservadas en medios de origen no animal. Durante todo el proceso se cumplió con lo establecido en las BPP. Esto garantiza la disponibilidad de cultivos puros, viables, estables genéticamente y con una trazabilidad adecuada, para producir vacunas con calidad y eficacia.

Referencias

1. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva: ICH; 1997.
2. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Regulación 16-2012. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. La Habana: CECMED; 2012.
3. WHO. Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of group A meningococcal conjugate vaccines. Geneva: WHO; 2006.
4. Martínez I. Neisserias y Moraxella catarrhalis. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL et al. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001. p. 217-38.
5. WHO. Annex 4. Good Manufacturing Practices for pharmaceutical products: main principles. WHO Technical Report Series No. 908. Geneva: WHO; 2003.
6. WHO. Annex 2. WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. WHO Technical Report Series No. 961. Geneva: WHO; 2011.
7. FDA. Code of Federal Regulations, Title 21. Part 610. General Biological Products Standards. Section 610.18 Cultures. Silver Spring, US: FDA; 2002.
8. Pharmaceutical Inspection Convention. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. PH 1/97 (Rev. 3). Geneva: PIC/S; 2002.
9. Cody WL, Wilson JW, Hendrixson DR, McIver KS, Hagman KE, Ott CM, Nickerson CA, Schurr MJ. Skim milk enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods* 2008;75:135-8.
10. Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl. Environ. Microbiol* 2004;70:268-72.
11. Martínez I. Enfermedad meningocócica. Diagnóstico microbiológico. En: Ochoa RF, Sierra G, Martínez I, Cuevas I. Prevención de la enfermedad meningocócica. La Habana: Finlay Ediciones; 2010. p. 3-27.

Seed Lot System from *Neisseria meningitidis* strains cultured in non-animal origin media

Abstract

During the manufacturing of biological products derived from microorganisms, stable and well-characterized cells to be used as production source should be provided. In this sense, it is essential to preserve strains using Seed Lot System as well as to have culture media ensuring an optimal growth of microorganisms and the presence of the relevant antigens. Currently, Finlay Institute from Havana works in obtaining a free- from-animal-origin-component vaccine against *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, Y and W. Reference and Working Seed Lots from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, Y, W and X were developed and characterized, using culture media free from animal-origin components and in compliance with current Good Manufacturing Practices. New documentation was established, including: lot master files, standard operational procedures, lot records, quality control specifications and assay certificates.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, vaccines, culture media.

Recibido: Noviembre de 2015

Aceptado: Diciembre de 2015