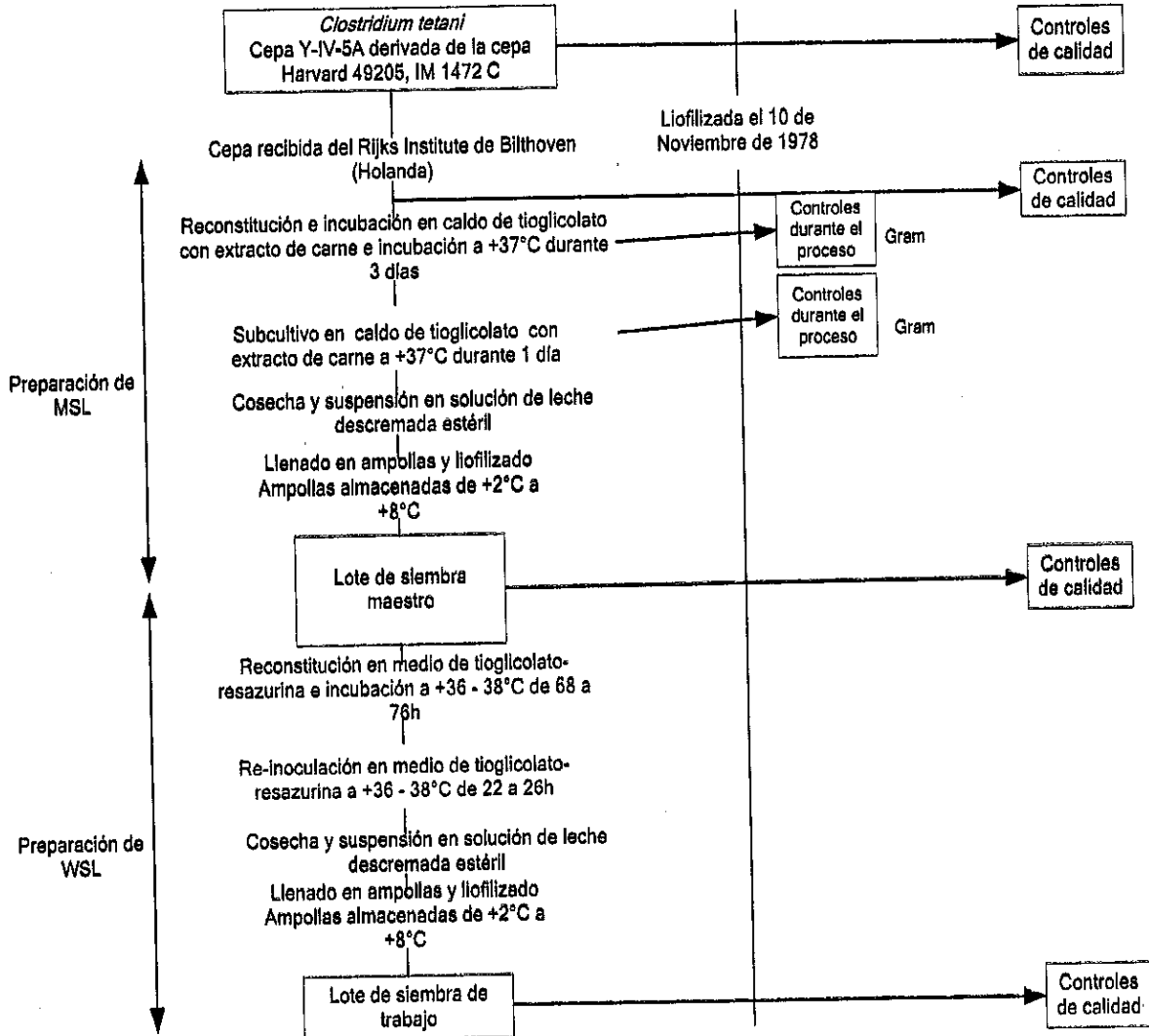




El sistema de lotes de siembra de *Clostridium tetani* se resume en la figura 2.  
Figura 2: Preparación del lote de siembra de *Clostridium tetani*



Se obtuvo una cepa liofilizada de *Clostridium tetani*, derivada de la cepa Harvard 49205 e identificada con el n.º Y-IV-5A (fecha de liofilización: 18.10.78) del Instituto Rijks de Bilthoven (Países Bajos) el 17 de noviembre de 1982.

Se recibieron dos ampollas y se registraron con el número IM 1472 C después de verificar la identidad bacteriológica y la pureza.

- La cepa n.º Y-IV-5A deriva de la cepa Y.
- La cepa Y (liofilizada por el Instituto Rijks de Utrecht el 16 de noviembre de 1956) proviene del aislamiento de las bacterias del cultivo de la cepa V.





- La cepa V proviene de un subcultivo de la cepa E.
- La cepa E proviene de "Investigación y Laboratorios", división del Ministerio de Salud del estado de Nueva York, Albany, y deriva de la cepa Harvard n.º 49205.

La cepa Harvard n.º 49205, enviada a Utrecht en mayo de 1943 por el Dr. Mueller, fue descrita como "altamente toxinógena" (1) (2). Las propiedades toxinogénicas de la cepa original n.º 49205 se establecieron por evaluación de la dosis letal mínima (DLM) y de la (L\*1/10) de su toxina.

La DLM es la menor cantidad de toxina por ratón que genera un nivel de mortalidad del 100 % de estos animales en un período de 4 días después de la inyección por vía intraperitoneal.

La (L\*1/10) es la menor cantidad de toxina que, después de una 1 hora de incubación a +20 °C con 1/10 UI de antitoxina en un volumen final de 0,5 mL y después de la inyección en ratones, demuestra ser mortal para el 50 % de los ratones en un período de 4 días después de la inyección.

El valor de la DLM para la toxina tetánica purificada producida por la cepa Harvard n.º 49205 es de  $2,5 \times 10^5$  por Lf.

El valor de la (L\* 1/10) para la toxina tetánica purificada producida por la cepa Harvard n.º 49205 es de 0,063 Lf.

Ambos valores, DLM y (L\*1/10), demuestran la alta toxinogenia de la cepa.

### 1.1 Preparación del lote de siembra maestro

Se reconstituyó una ampolla de células liofilizadas de la cepa n.º Y-IV-5A de *Clostridium tetani* en 2 tubos de caldo de tioglicolato con extracto de carne (ver 2.2) y se incubó a + 37 °C durante 3 días. Se realizó una prueba de tinción de Gram como control durante el proceso.

Se realizó un subcultivo en 11 tubos de caldo de tioglicolato con extracto de carne y se incubaron a + 37 °C durante 1 día. Se realizó una prueba de tinción de Gram como control durante el proceso.

Posteriormente, las bacterias se volvieron a suspender en una solución de leche descremada estéril (ver 2.1), se introdujeron en ampollas y se liofilizaron el 22 de octubre de 1991 (lote 22.10.91).

Las ampollas se utilizan para realizar pruebas de control de calidad (ver 3.1).

### 1.2 Preparación de los lotes de siembra de trabajo

El inóculo se prepara con una ampolla de células liofilizadas de *Clostridium tetani* correspondientes al lote de siembra maestro, tal como se indica en el párrafo 1.1, excepto que se utiliza el medio de tioglicolato-resazurina sin extracto de carne (ver 2.3). Después del sellado al vacío, las ampollas de los lotes de siembra de trabajo se almacenan a una temperatura de entre + 2 °C y + 8 °C.

Se retiran ampollas para realizar pruebas de control de calidad, tal como se describe en el párrafo 3.1.





## 2 Medios de cultivo y soluciones utilizadas para la elaboración de lotes de siembra

### 2.1 Solución de leche descremada

*Composición cualitativa:*

- Leche descremada en polvo
- Agua purificada

La leche descremada se compra en forma de polvo. La solución se trata con vapor caliente.

### 2.2 Caldo de tioglicolato con extracto de carne

*Composición cualitativa:*

- Hidrolizado ácido de caseína (triptona USP)
- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Tioglicolato de sodio
- Cloruro de sodio
- L-cistina
- Glucosa
- Agua purificada

El medio se compra en forma de polvo listo para usar y para diluir en agua purificada. Luego, el medio se somete a esterilización con vapor.

### 2.3 Medio o caldo de tioglicolato-resazurina (sin extracto de carne)

- Hidrolizado ácido de caseína (peptona de caseína)
- Extracto de levadura
- Tioglicolato de sodio
- Cloruro de sodio
- L-cistina
- Glucosa
- Bacto-agar
- Resazurina



La tioglicolato-resazurina se compra en forma de polvo listo para usar y para diluir en agua purificada (caldo de tioglicolato-resazurina) o como una solución líquida lista para usar (medio de tioglicolato-resazurina). Luego, el medio se somete a esterilización con vapor.







### 3 Pruebas de control de calidad para los lotes de siembra

#### 3.1 Especificaciones

Las pruebas de liberación, realizadas en el MSL y en el WSL de *Clostridium tetani* para controlar la identidad y la pureza de la cepa, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Especificaciones para el *Clostridium tetani* (MSL y WSL)

| Controles   | Requerido por                 | Métodos   | Criterios de aceptación  |
|---|-------------------------------|---|--|
| Prueba de pureza  | Ph. Eur. 0153, edición actual | Características de crecimiento en varios medios   | Cumple (ausencia de contaminantes)   |
| <b>Pruebas de identificación:</b><br>Examen morfológico<br>Características de crecimiento<br><br>Características bioquímicas:<br>Indol<br>Identificación bioquímica | Ph. Eur. 0153, edición actual | Tinción de Gram<br>Características de crecimiento en varios medios<br><br>Prueba de indol<br>Sistema API® | Bacilos gram positivos<br>Cumple (colonias transparentes y planas, con bordes irregulares y extensiones filamentosas)<br><br>Cumple:<br>Negativa<br><br>Perfil metabólico y bioquímico característico de la especie <i>C. tetani</i> |





## 3.2 Procedimientos analíticos

### 3.2.1 Prueba de pureza

#### 3.2.1.1 Principio

La finalidad de esta prueba es controlar la ausencia de contaminantes en los lotes de siembra de *Clostridium tetani* mediante el cultivo en diversos medios de cultivo.

#### 3.2.1.2 Método

Se reconstituye una ampolla liofilizada del lote de siembra maestro o de trabajo con un medio de tioglicolato-resazurina o caldo de tripcasa de soja y se inocula en diversos medios líquidos y sólidos:

- Agar de caldo de tripcasa de soja.
- Agar de caldo de tripcasa de soja con 5 % de sangre ovina.
- Agar Columbia con 5 % de sangre ovina.
- Agar Schaedler con 5 % de sangre ovina.

Posteriormente, se incuban las células a entre + 34,5 °C y + 39,5 °C de 5 a 7 días en condiciones aerobias y anaerobias. Se observan regularmente los cultivos para determinar las características de crecimiento.

#### 3.2.1.3 Criterios de aceptación

Cepa pura (es decir, no contaminada) tras la siembra en un medio adecuado (agar Columbia con 5 % de sangre ovina).

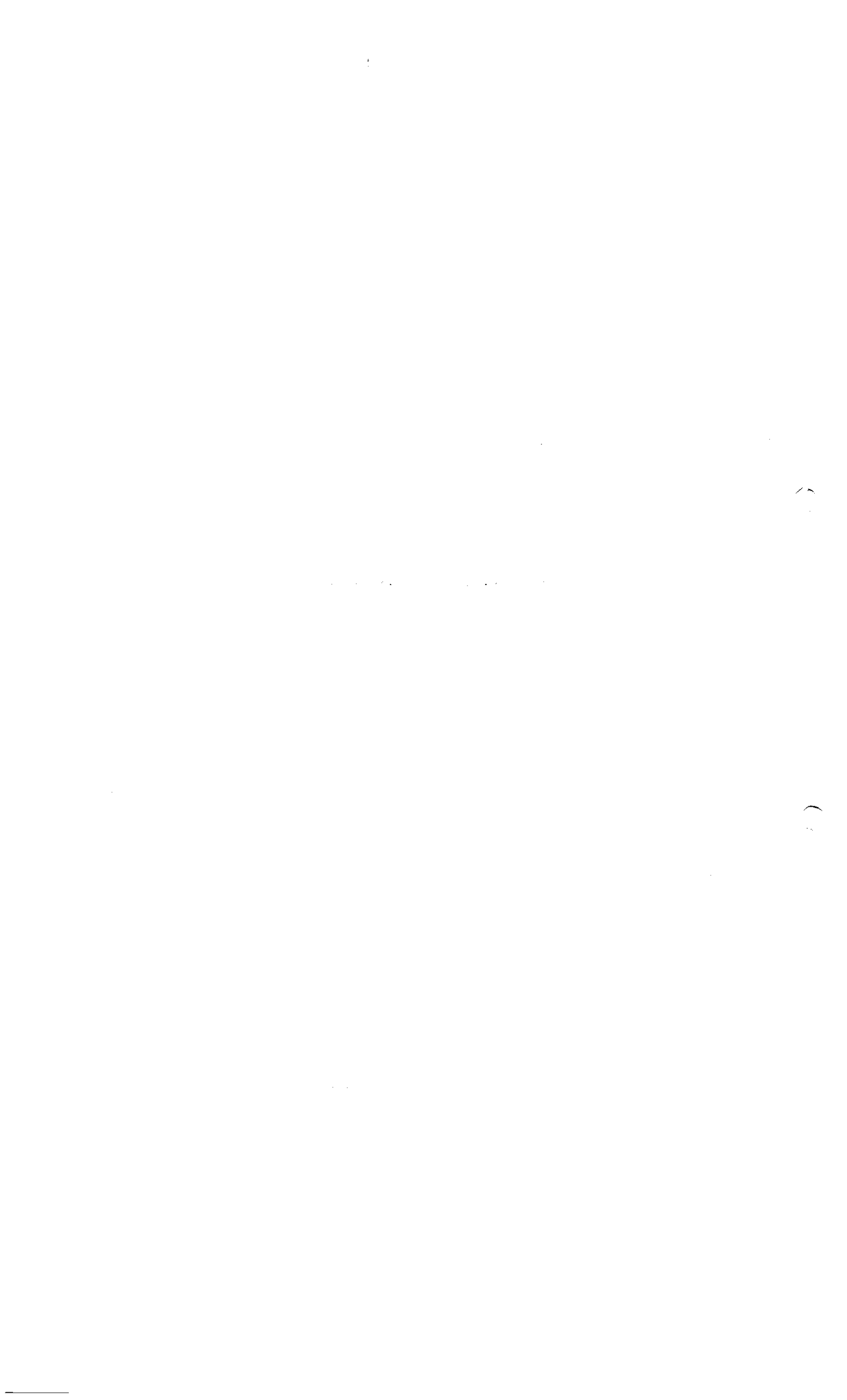
No se observa crecimiento alguno en ninguno de los otros medios.

### 3.2.2 Prueba de identidad

#### 3.2.2.1 Examen morfológico

##### 3.2.2.1.1 Principio

La finalidad de esta prueba es determinar la morfología bacteriana mediante una tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta después de ser lavadas con etanol al 95 %, mientras que las bacterias Gram negativas pierden el colorante púrpura.





### 3.2.2.1.2 Método

Después de fijar el frotis bacteriano en un portaobjetos, se tiñen las células con cristal violeta y se enjuagan con agua. Posteriormente, se recubre el portaobjetos con una solución de yodo de Gram y se enjuaga nuevamente con agua. Luego se destiñen las células con una solución de ácido acético y etanol, se enjuagan con agua y se realiza una tinción de contraste con safranina. Finalmente, se enjuagan las bacterias con agua y se secan. Se examinan las muestras con un microscopio.

### 3.2.2.1.3 Criterios de aceptación

Presencia de pequeños bacilos gram positivos.

### 3.2.2.2 Características de crecimiento

#### 3.2.2.2.1 Principio

La finalidad de esta prueba es estudiar las características de crecimiento de *Clostridium tetani* en 4 medios de cultivo (agar Columbia con 5 % de sangre ovina, agar de caldo de tripcasa de soja, agar de caldo de tripcasa de soja con 5 % de sangre ovina y agar Schaedler con 5 % de sangre ovina).

#### 3.2.2.2.2 Método

Se suspende una ampolla liofilizada del lote de siembra con medio de tioglicolato-resazurina. Se inocula una gota de esta suspensión en varios medios líquidos y sólidos (agar Columbia con 5 % de sangre ovina, agar de caldo de tripcasa de soja, agar de caldo de tripcasa de soja con 5 % de sangre ovina y agar Schaedler con 5 % de sangre ovina). Se incuban las células a entre + 34,5 °C y + 39,5 °C durante 24 h en condiciones estrictamente anaerobias.

#### 3.2.2.2.3 Criterios de aceptación

Se observan colonias planas y transparentes con bordes irregulares y extensiones filamentosas.

### 3.2.2.3 Características bioquímicas para la identificación de *Clostridium tetani*

#### 3.2.2.3.1 Principio

La finalidad de esta prueba es identificar el lote de siembra de *Clostridium tetani* mediante la prueba de indol y la identificación según el sistema API®.

#### 3.2.2.3.2 Método

- Indol: el principio de la prueba se basa en la coloración azul del reactivo indol.
- Identificación bioquímica: el principio de la prueba se basa en la degradación de sustratos específicos, detectados por indicadores (sistema API®). Se prepara una serie de medios de





identificación inoculados con un cultivo de 24 horas en medio de Columbia + sangre para confirmar las características bioquímicas de la cepa.

**3.2.2.3.3 Criterios de aceptación**

- La prueba de indol es negativa.
- El perfil metabólico bioquímico es característico de *Clostridium tetani*.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
INGENIERO  
SANOFI PASTEUR S.A.





#### 4 Datos de control de calidad

Los resultados de liberación obtenidos para el MSL 22.10.91 y los WSL FA123048, FA229010 y FA356142 se incluyen en la tabla 2. Todos los lotes cumplen con las especificaciones.

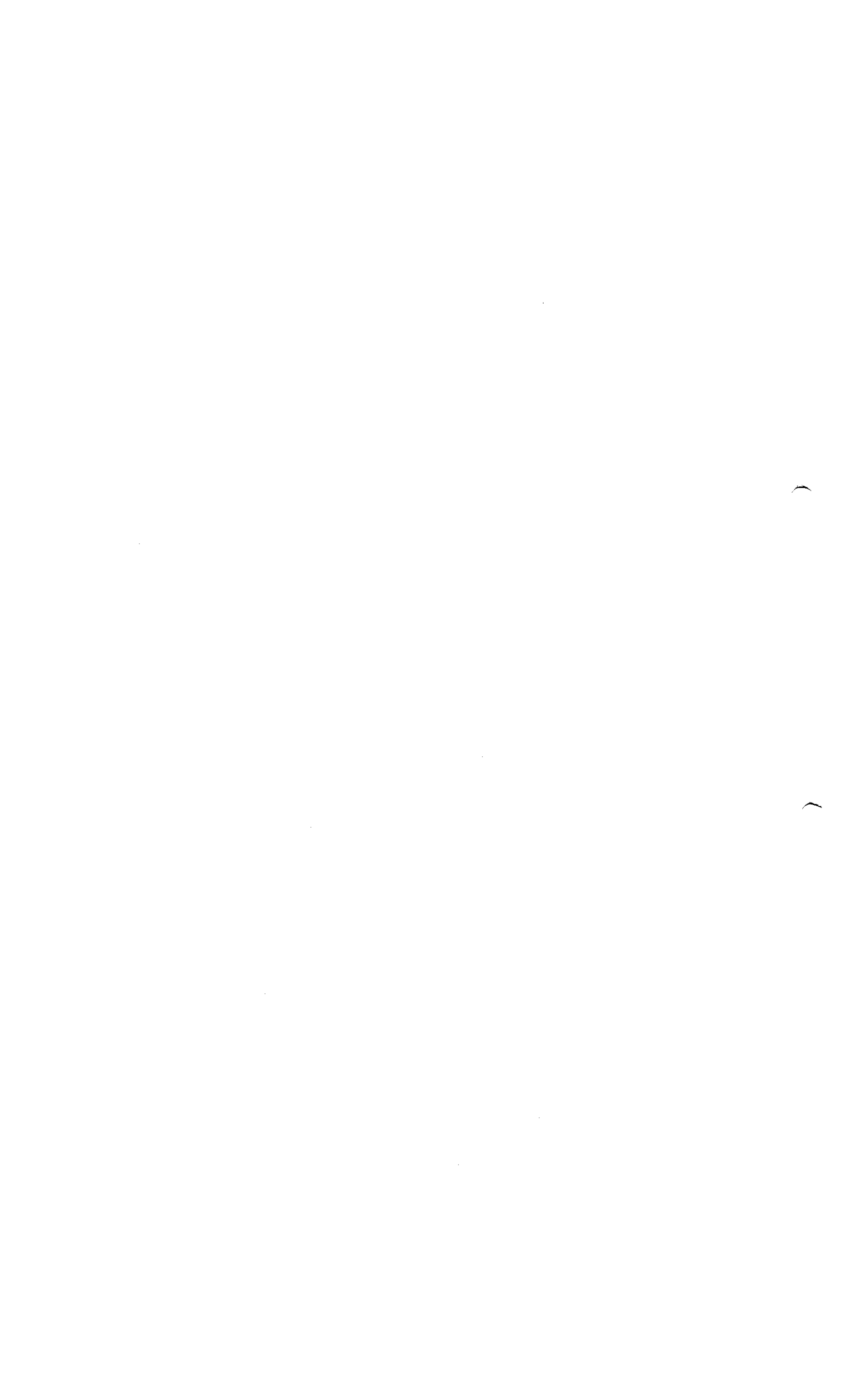
Tabla 2: Datos de control de calidad para *Clostridium tetani*

| Controles                              | Criterios de aceptación  | Resultados (fecha de elaboración) |                                  |                                  |                                  |
|--|--|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|  |  | MSL*<br>22 oct 1991               | WSL<br>FA123048<br>(17 feb 2002) | WSL<br>FA229010<br>(20 dic 2005) | WSL<br>FA356142<br>(22 jul 2009) |
| <b>Prueba de pureza</b>                | Ausencia de contaminantes  | Cumple                            | Cumple                           | Cumple                           | Cumple                           |
| <b>Prueba de identificación:</b>       |  |                                   |                                  |                                  |                                  |
| Examen morfológico                     | Bacilos gram positivos   | Bacilos gram positivos            | Bacilos gram positivos           | Bacilos gram positivos           | Bacilos gram positivos           |
| Características de crecimiento         | Colonias transparentes y planas, con bordes irregulares y extensiones filamentosas | Cumple                            | Cumple                           | Cumple                           | Cumple                           |
| Características bioquímicas:           | Cumple:  | Cumple:                           | Cumple:                          | Cumple:                          | Cumple:                          |
| . Indol                                | negativo   | negativo                          | negativo                         | negativo                         | negativo                         |
| . Identificación con el sistema API® † | Perfil metabólico y bioquímico característico de la especie <i>C. tetani</i>       | NA‡                               | Cumple†                          | Cumple†                          | Cumple†                          |

\* Se llevó a cabo la prueba de patogenicidad en el lote MSL 22.10.91 y se observó la muerte de cobayos con síntomas tetánicos.

† Los lotes WSL FA123048, FA229010 y FA356142 se liberaron utilizando el sistema VITEK®.

‡ No se aplica. El lote MSL 22.10.91 solo se liberó utilizando el sistema VITEK®.





## Lista de referencias

- 1 Muller JH, Miller PA. Production of tetanal toxin. The journal of immunology, virus-research & experimental chemotherapy: official journal of the American Association of Immunologists 1945;50(6):377-384.
- 2 Muller JH, Miller PA. Variable factors influencing the production of tetanus toxin. J Bacteriol 1954;67(3):271-277.

