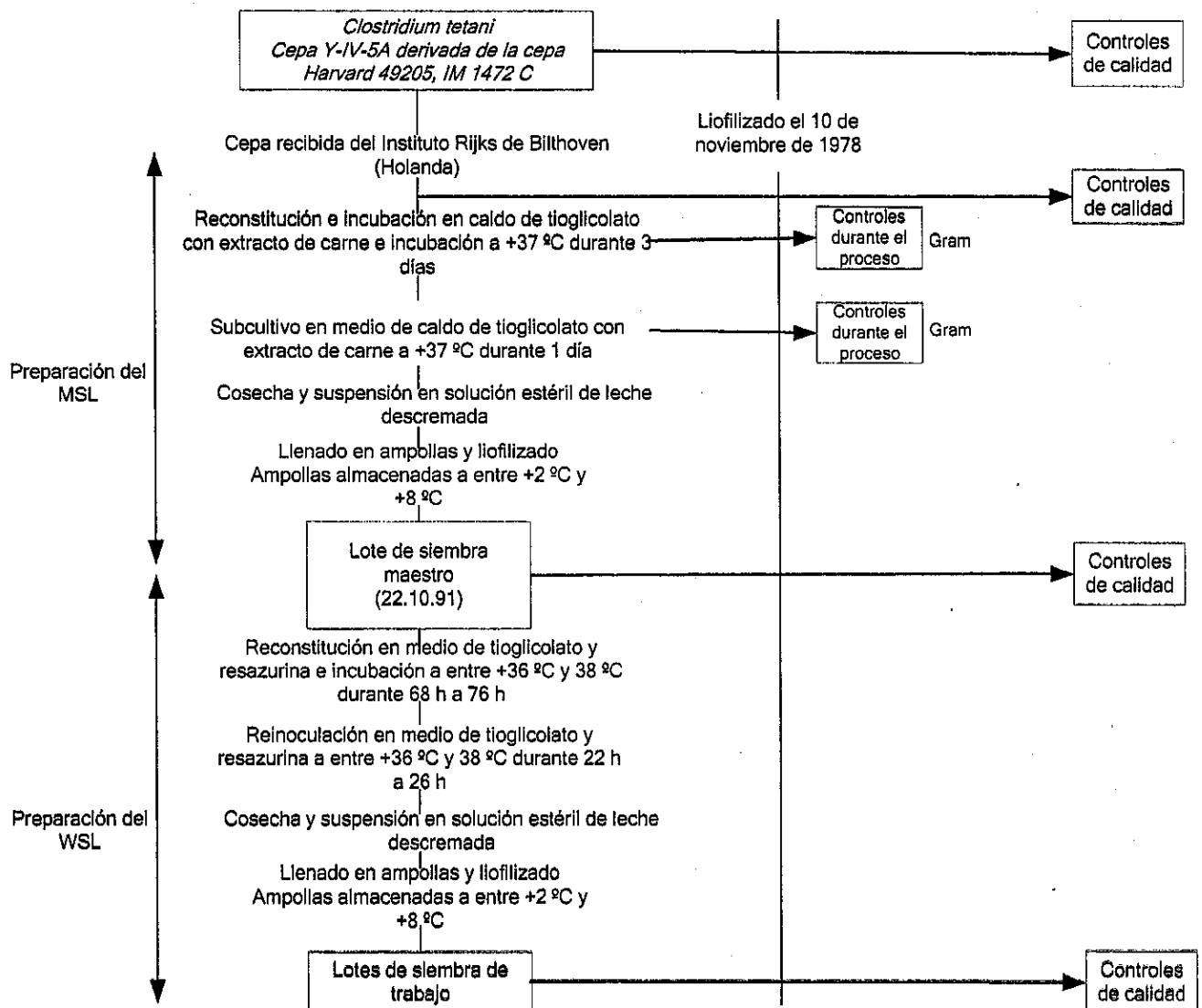


El sistema de lotes de siembra de *Clostridium tetani* se resume en la figura 4.

Figura 4: 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 número Y-IV-5A (fecha de liofilización: 18 oct 1978) obtenida del Institut Rijks de Bilthoven (Holanda) 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 se 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, condado de Albany, y se 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" (Muller, J.H. y Miller, P.A.: Production of Tetanal Toxin; J. Immunology. 1945, 50, 377-384 and Muller J.H. and Miller P.A.: Variable factors influencing the production of tetanus toxin; J. Bacteriol. 1954, 67, 274-277). Se establecieron las propiedades toxinógenas de la cepa original n.º 49205 al evaluar la dosis letal mínima (DLM) y la ( $L^*1/10$ ) de la 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  $2,5 \cdot 10^5$  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 toxigenia de la cepa.

### 1.2.1 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 (vea el capítulo 2.2.2) 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.

Se resuspendieron las bacterias en una solución de leche descremada estéril (vea el capítulo 2.2.1), se trasvasó en ampollas (0,2 mL suspensión/ampolla) y se liofilizaron el 22 de octubre de 1991 (lote 22.10.91).

Se retiraron las ampollas para realizar pruebas de control de calidad (vea el capítulo 3.2).

### 1.2.2 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 1.2.1, excepto que se utiliza el medio de tioglicolato y resazurina sin extracto de carne (vea el capítulo 2.2.3). Después





de sellarlas 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 las ampollas para realizar pruebas de control de calidad, tal como se describe en el capítulo 3.2.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
SECRETARIO  
SANOFI PASTEUR S.A.





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

### 2.1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas durante la elaboración de los lotes de siembra de *Haemophilus influenzae* tipo b

#### 2.1.1 Caldo de tripcasa de soja

La composición del caldo de tripcasa de soja se describe en la sección 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha.

#### 2.1.2 Agar de carbón vegetal (medio sólido)

La composición del medio sólido de agar de carbón se describe en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha.

#### 2.1.3 Solución de leche descremada

- Leche descremada en polvo
- Agua purificada

La leche descremada se compra en polvo. La solución se trata con vapor a alta temperatura.

### 2.2 Medios de cultivo y soluciones utilizadas para la elaboración de los lotes de siembra de *Clostridium tetani*.

#### 2.2.1 Solución de leche descremada

La composición de la solución de leche descremada se detalla en el capítulo 2.1.3.

#### 2.2.2 Caldo de tioglicolato con extracto de carne

- Hidrolizado ácido de caseína
- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Tioglicolato de sodio
- Cloruro de sodio
- L-cistina
- Glucosa





- Agua purificada

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

### 2.2.3 Medio o caldo de tioglicolato y resazurina (sin extracto de carne)

El medio se compra en polvo listo para usar y diluir en agua purificada o como una solución líquida lista para usar. Luego, el medio se somete a esterilización con vapor a alta temperatura.

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





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

#### 3.1 Pruebas de control de calidad para los lotes de siembra de *Haemophilus influenzae* tipo b

Las pruebas de aprobación, realizadas en el pre-MSL, en el MSL y en el WSL de *Haemophilus influenzae* tipo b para controlar la identidad y la pureza de la cepa, se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1: Especificaciones de *Haemophilus influenzae* tipo b (pre-MSL, MSL y WSL)**

Controles	Requeridos por	Métodos	Criterios de aceptación
<b>Prueba de pureza</b>	Ph. Eur. 1219, edición actual Ph. Eur. 0153, edición actual	Características de crecimiento en diversos medios	Cumple (ausencia de contaminantes)
<b>Pruebas de identificación:</b>	Ph. Eur. 1219, edición actual Ph. Eur. 0153, edición actual		
<b>Examen morfológico</b>	/	Tinción de Gram	Cocobacilos gram negativos
<b>Características de crecimiento</b>	/	Características de crecimiento en diversos medios	Cumple (colonias convexas, planas, grisáceas y translúcidas de 0,5 a 1 mm de diámetro)
<b>Características bioquímicas:</b>			Cumple:
<b>Catalasa</b>		Prueba de catalasa	Positivo
<b>Indol</b>		Prueba de indol (se observa una interacción entre las colonias y los reactivos)	Positivo
<b>Identificación bioquímica</b>		Sistema de identificación bioquímica VITEK®	Positivo (características del perfil metabólico bioquímico de las especies de <i>Haemophilus influenzae</i> )
<b>Características antigénicas:</b>			Cumple:
<b>Polivalente (agrupación a+b+c+d+e+f)</b>		Reacción entre células y 6 sueros específicos para los isotipos a-f de <i>Haemophilus influenzae</i>	Positivo
<b>Monovalente b</b>			Positivo
<b>Monovalente a, c, d, e, f</b>			Negativo
<b>Control</b>			Negativo





**3.2 Pruebas de control de calidad para los lotes de siembra de *Clostridium tetani***

Las pruebas de aprobación, 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 2.

**Tabla 2: Especificaciones para el *Clostridium tetani* (MSL y WSL)**

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





### 3.3 Procedimientos analíticos

#### 3.3.1 Prueba de pureza

##### 3.3.1.1 Principio

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

##### 3.3.1.2 Método de la prueba de pureza para *Haemophilus influenzae* tipo b

Se reconstituye una ampolla liofilizada del lote de siembra premaestro, maestro o de trabajo con caldo de trip casa de soja. Después de la incubación a entre +35 °C y +38 °C durante 48 a 72 horas, se inocula esta suspensión en cajas de Petri que contienen:

- Agar de soja con 5 % de sangre ovina.
- Agar chocolate con Polyvitex,
- Agar chocolate con Polyvitex VCAT3 (antibióticos)
- Agar de caldo de trip casa de soja con factores de crecimiento (hemina bovina y/o NAD).

Se incuban los medios a entre +35 °C y +38 °C, con o sin CO<sub>2</sub> (3-10 %), de 5 a 7 días y se observan las placas todos los días para determinar las características de crecimiento.

##### 3.3.1.3 Método de la prueba de pureza para *Clostridium tetani*

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

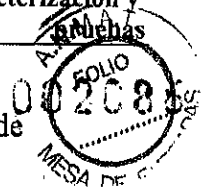
- Agar de caldo de trip casa de soja.
- Agar de caldo de trip casa de soja con 5 % de sangre ovina.
- Agar Columbia con 5 % de sangre ovina.
- Agar Schaedler con 5 % de sangre ovina.

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.

##### 3.3.1.4 Criterios de aceptación

Cepa pura (es decir, sin contaminantes) después de la siembra en:





- Agar chocolate con Polyvitex y agar de caldo de trip casa de soja con factores de crecimiento para *Haemophilus influenzae* tipo b,
- Medios y condiciones apropiados (los cuatro medios en condiciones anaerobias) para *Clostridium tetani*.

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

### 3.3.2 Prueba de identidad

#### 3.3.2.1 Examen morfológico

##### 3.3.2.1.1 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 lavarlas con etanol al 95 %, mientras que las bacterias gram negativas pierden el colorante púrpura.

##### 3.3.2.1.2 Método

Después de fijar el frotis bacteriano en un portaobjetos, se tiñen las células con cristal violeta y se enjuagan con agua. Posteriormente, se cubre 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.

##### 3.3.2.1.3 Criterios de aceptación

*Haemophilus influenzae* tipo b: presencia de pequeños cocobacilos gram negativos.

*Clostridium tetani*: presencia de pequeños bacilos gram positivos.

#### 3.3.2.2 Características de crecimiento

##### 3.3.2.2.1 Principio

La finalidad de esta prueba es estudiar las características de crecimiento de:

- *Haemophilus influenzae* tipo b en agar chocolate con Polyvitex;
- *Clostridium tetani* en 4 medios de cultivo (agar Columbia con 5 % de sangre ovina, agar de caldo de trip casa de soja, agar de caldo de trip casa de soja con 5 % de sangre ovina y agar Schaedler con 5 % de sangre ovina).

##### 3.3.2.2.2 Método para *Haemophilus influenzae* tipo b

Se reconstituye una ampolla liofilizada del lote de siembra en caldo de trip casa de soja. Se inocula una gota de esta suspensión en agar chocolate con Polyvitex y se incuba a entre +35 °C y +38 °C





durante 16 a 24 horas. El cultivo se mantiene en condiciones anaerobias facultativas en presencia de CO<sub>2</sub> (10 %).

### 3.3.2.2.3 Método para *Clostridium tetani*

Se suspende una ampolla liofilizada del lote de siembra con medio de tioglicolato y 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.

### 3.3.2.2.4 Criterios de aceptación

*Haemophilus influenzae* tipo b: se observan colonias convexas, planas, grisáceas, translúcidas y lisas de 0,5 a 1 mm de diámetro.

*Clostridium tetani*: se observan colonias planas y transparentes con bordes irregulares y extensiones filamentosas.

### 3.3.2.3 Características bioquímicas para la identificación de *Haemophilus influenzae* tipo b

#### 3.3.2.3.1 Principio

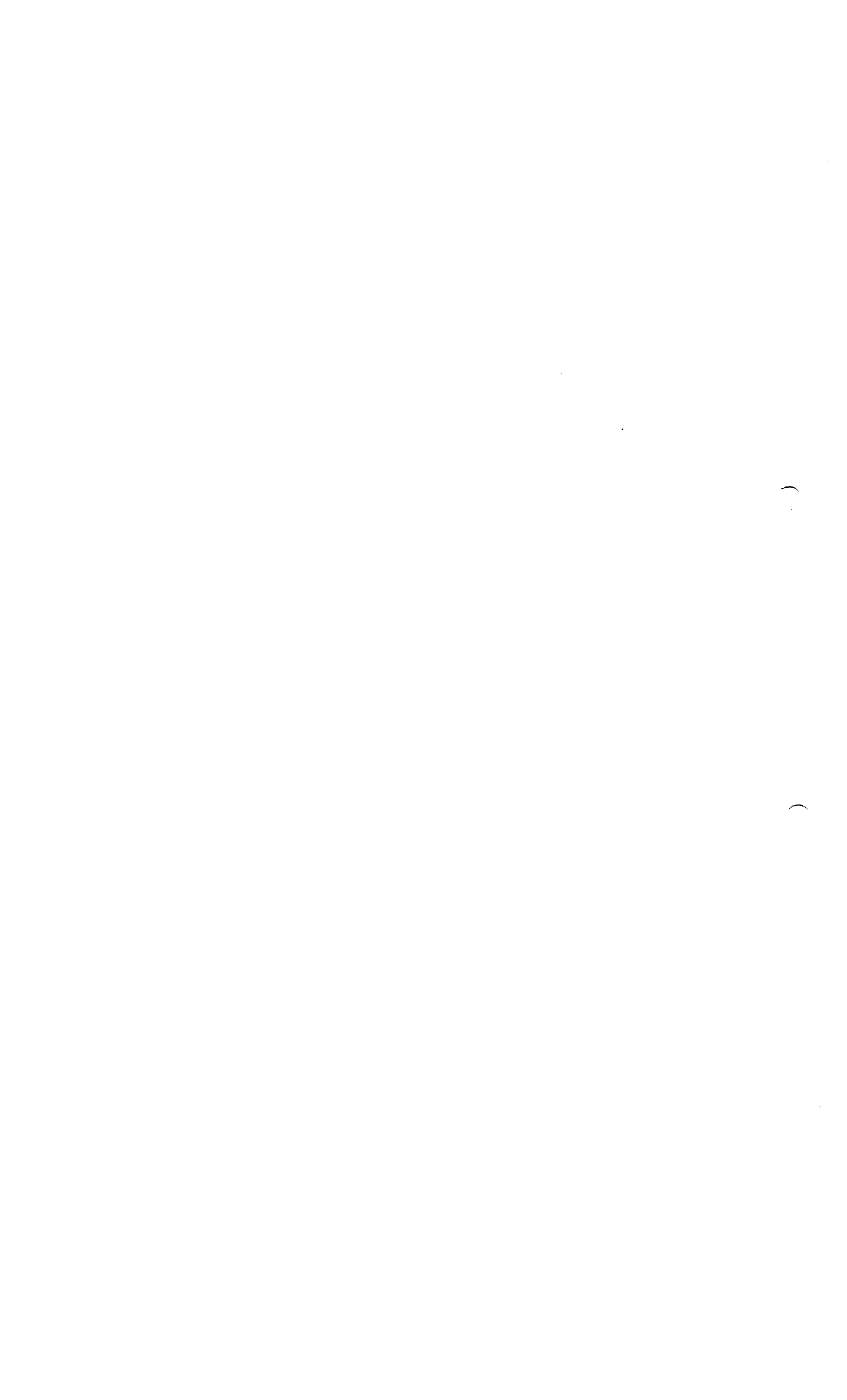
La finalidad de esta prueba es identificar el lote de siembra de *Haemophilus influenzae* mediante las pruebas de indol y catalasa, y la identificación en el sistema VITEK®.

#### 3.3.2.3.2 Método

- Catalasa: esta prueba se realiza con las colonias que crecen en agar chocolate con Polyvitex, el cual se utiliza para determinar las características de crecimiento. Se coloca una gota de reactivo de catalasa de color en el cultivo en la región de colonias bien separadas.
- 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 (método VITEK®). Se prepara una serie de medios de identificación inoculados con un cultivo de 24 h en agar chocolate, para confirmar las características bioquímicas de la cepa.

#### 3.3.2.3.3 Criterios de aceptación

- Las pruebas de catalasa e indol son positivas.
- El perfil metabólico bioquímico es característico de *H. influenzae*.





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

#### 3.3.2.4.1 Principio

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

#### 3.3.2.4.2 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.

#### 3.3.2.4.3 Criterios de aceptación

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

### 3.3.2.5 Características antigénicas

#### 3.3.2.5.1 Principio

La finalidad de esta prueba es verificar las características serológicas (tipo b) del lote de siembra de *Haemophilus influenzae*.

#### 3.3.2.5.2 Método

Se estudian las características antigénicas mediante la aglutinación de los cortes microscópicos con antiseros específicos. Se utilizan un control positivo y negativo, que consisten, respectivamente, en una agrupación de antiseros con o sin el antisuero específico tipo b.

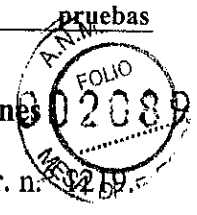
#### 3.3.2.5.3 Criterios de aceptación

- La aglutinación es positiva con la agrupación de antiseros (a+b+c+d+e+f).
- La aglutinación es positiva con el antisuero b.
- La aglutinación es negativa con los antiseros a, c, d, e, f.
- La aglutinación es negativa sin los antiseros (control).



### 3.3.3 Prueba de caracterización adicional: Prueba de inmunogenicidad en ratones

Esta prueba se lleva a cabo utilizando las referencias TRS n.º 814 de la OMS y Ph. Eur. n.º 2.2.19.5



#### 3.3.3.1 Principio del método

El principio de esta prueba consiste en inyectar el principio activo, diluido en suero fisiológico, a ratones hembra y luego realizar una determinación de anticuerpos con un método ELISA en los sueros individuales.

Se utiliza el método "sándwich" de ELISA para identificar la IgG (inmunoglobulina tipo G antipoliósidos de *Haemophilus* tipo b) mediante una reacción entre el antígeno de Hib, la IgG y el anticuerpo de cabra anti-IgG murina conjugado a peroxidasa. El complejo producido se identifica por un color amarillo que se genera a partir de la reacción enzimática con O-fenilendiamina (el sustrato enzimático) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El suero de agrupamiento del grupo de ratones no inmunizados (prueba testigo) debe ser negativo (DO < 0,2 para la dilución más baja). No se pueden eliminar más de 2 resultados de 8, como resultados aberrantes, para el grupo de ratones inmunizados.





#### 4 Datos de control de calidad para los lotes de siembra de *Haemophilus influenzae* tipo b y de *Clostridium tetani*

##### 4.1 Análisis de lote de los lotes de siembra maestro y de trabajo de *Haemophilus influenzae* tipo b

Los resultados de liberación obtenidos para el MSL 14.10.98 y los WSL FA201145, FA201147 y FA201435 se proporcionan en la tabla 3. Todos los lotes cumplen con las especificaciones.

**Tabla 3: Datos de control de calidad para *Haemophilus influenzae* tipo b**

Controles	Criterios de aceptación	Resultados (fecha de elaboración)			
		MSL (14 oct 1998)	WSL FA201145 (21 ene 2005)	WSL FA201147 (11 feb 2005)	WSL FA201435 (17 feb 2005)
Prueba de pureza	Ausencia de contaminantes	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Pruebas de identificación: Examen morfológico	Cocobacilos gram negativos	Cocobacilos gram negativos delgados	Cocobacilos gram negativos delgados	Cocobacilos gram negativos delgados	Cocobacilos gram negativos delgados
Características de crecimiento	Colonias convexas, planas, grisáceas, translúcidas y lisas de 0,5 a 1 mm de diámetro	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Características bioquímicas:	Cumple:	Cumple:	Cumple:	Cumple:	Cumple:
. Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
. Indol	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
. Identificación bioquímica con VITEK	Perfil metabólico característico de <i>H. influenzae</i>	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Características serológicas	Cumple:	Cumple:	Cumple:	Cumple:	Cumple:
. Agrupación (a+b+c+d+e+f)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
. b	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
a, c, d, e, f	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
. Control					

Los lotes de siembra obtenidos a partir del MSL (14.10.98) se utilizarán en la elaboración de *Haemophilus influenzae* tipo b hasta octubre de 2011.





Los resultados de liberación obtenidos para el nuevo MSL (FA340193) y para el WSL FA341387 se proporcionan en la tabla 4. Todos los resultados cumplen con los criterios de aceptación.

**Tabla 4: Datos de control de calidad para *Haemophilus influenzae* tipo b**

Controles	Criterios de aceptación	Resultados (fecha de elaboración)	
		MSL FA340193 (12 feb 2009)	WSL FA341387 (26 mar 2009)
Prueba de pureza	Ausencia de contaminantes	Cumple	Cumple
Pruebas de identificación:			
Examen morfológico	Cocobacilos gram negativos	Cocobacilos gram negativos delgados	Cocobacilos gram negativos delgados
Características de crecimiento	Colonias convexas, planas, grisáceas, translúcidas y lisas de 0,5 a 1 mm de diámetro	Cumple	Cumple
Características bioquímicas:	Cumple:	Cumple:	Cumple:
. Catalasa	Positivo	Positivo	Positivo
. Indol	Positivo	Positivo	Positivo
. Identificación bioquímica con VITEK	Perfil metabólico característico de <i>H. influenzae</i>	Cumple	Cumple
Características serológicas	Cumple:	Cumple:	Cumple:
. Agrupación (a+b+c+d+e+f)	Positivo	Positivo	Positivo
. b	Positivo	Positivo	Positivo
a, c, d, e, f	Negativo	Negativo	Negativo
. Control	Negativo	Negativo	Negativo

