



Tabla 9: Controles realizados durante el ensayo (PARTE A)

Control	Contenido del cultivo
Control negativo: control del medio de cultivo de los lotes de siembra analizados	YNB/glucosa sin inoculación
Control negativo: control de la solución de dilución (TSB estéril)	YSB/glucosa inoculadas con 0,1 mL de medio TSB estéril
Control positivo de <i>H. polymorpha</i>	YNB/glucosa inoculadas con 0,1 mL de una dilución del cultivo de <i>H. polymorpha</i> (10^5 UFC/mL para el WSL y 10^8 UFC/mL para el MSL)

PARTE B:

Se inoculan 10 cajas de Petri que contienen agar tríptico de soja (20 mL) con 0,1 mL de las diluciones 10^{-6} o 10^{-7} de la ampolla o el vial que se va a analizar. Las placas se incuban a entre $+30^{\circ}\text{C}$ y $+35^{\circ}\text{C}$ durante 4 días y se cuentan las colonias visibles. Luego las placas se incuban a aproximadamente $+20^{\circ}\text{C}$ a $+25^{\circ}\text{C}$ 5 días más (para optimizar el desarrollo de hongos y contaminantes de la levadura). Se realizan observaciones a diario.

Los controles de los medios y los controles positivos se detallan a continuación.

Tabla 10: Controles realizados durante el análisis (PARTE B)

Control	Contenido del cultivo
Control negativo: control del medio de cultivo de los lotes de siembra analizados	TSA sin inoculación
Control negativo: control de la solución de dilución (TSB estéril)	TSA inoculado con 0,1 mL de medio TSB estéril (solución de dilución)
Control positivo de <i>H. polymorpha</i>	TSA inoculado con 0,1 mL de una dilución del cultivo de <i>H. polymorpha</i> (10^5 UFC/mL para el WSL y 10^8 UFC/mL para el MSL)

Criterios de validez

- Crecimiento visible de los controles positivos
- Ausencia de crecimiento de todos los controles negativos

Criterios de aceptación

La prueba cumple con estos criterios si se observa lo siguiente:

- Una morfología uniforme de las colonias a alrededor de $+30^{\circ}\text{C}$ a $+35^{\circ}\text{C}$ y alrededor de $+38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,
- Un rango equivalente de la cantidad de colonias para una dilución dada en ambos medios (TSA a entre $+30^{\circ}\text{C}$ y $+35^{\circ}\text{C}$ e YNB/glucosa a $+38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$),
- Ausencia de contaminantes.



A modo de ejemplo, se presentan los resultados obtenidos para el lote MSL n.º MCB 160600BA y el lote WSL n.º MWCB 230600BA en la Tabla 11 y la Tabla 12.

Tabla 11: Resultados de crecimiento celular de algunas ampollas del lote MSL n.º MCB 160600BA

UFC/mL										
Medio	Ampolla 1	Ampolla 2	Ampolla 3	Ampolla 4	Ampolla 5	Ampolla 6	Ampolla 7	Ampolla 8	Ampolla 9	Ampolla 10
TSA	11.10 ⁸	9,6.10 ⁸	11,10 ⁸	12.10 ⁸	10.10 ⁸	9,5.10 ⁸	8,3.10 ⁸	7.10 ⁸	8,9.10 ⁸	9.10 ⁸
YNB/ glucosa	9,1.10 ⁸	8,5.10 ⁸	10,10 ⁸	13.10 ⁸	10.10 ⁸	9,2.10 ⁸	9,8.10 ⁸	8.2.10 ⁸	9,2.10 ⁸	10.10 ⁸

Tabla 12: Resultados de crecimiento celular de algunos viales del lote WSL n.º MWCB 230600BA

UFC/mL										
Medio	Vial 1	Vial 2	Vial 3	Vial 4	Vial 5	Vial 6	Vial 7	Vial 8	Vial 9	Vial 10
TSA	8,4.10 ⁸	8,2.10 ⁸	8,6.10 ⁸	8,7.10 ⁸	7,7.10 ⁸	8,1.10 ⁸	10.10 ⁸	8,9.10 ⁸	9,6.10 ⁸	6,5.10 ⁸
YNB/ glucosa	8,8.10 ⁸	8,4.10 ⁸	8,8.10 ⁸	7,5.10 ⁸	8,6.10 ⁸	10.10 ⁸	9,2.10 ⁸	9,2.10 ⁸	9,5.10 ⁸	7,7.10 ⁸

Resultados esperados

El recuento obtenido en TSA e YNB/glucosa no muestra diferencias significativas y la morfología de las colonias en ambos medios es homogénea. El título de las células de cada vial cumple con lo esperado. Tras 15 días de incubación, no se detectan contaminantes con morfología distinta en los cultivos.

5.1.2 Pruebas de identidad

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en determinar la identidad microbiológica de una muestra de *Hansenula polymorpha* del MSL o del WSL.

Conforme al principio de la prueba, se realiza una transferencia de las colonias individuales provenientes de los cultivos utilizados en la prueba de pureza, a medios que inducen un crecimiento particular a +30°C o +40°C y una fuente típica de nitrógeno (base nitrogenada para levaduras = YNB) o carbono (base carbono para levaduras = YCB) para el crecimiento de *Hansenula polymorpha*.

ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ SUPERVISOR SANOFI PASTEUR S.A.





Método

La identificación de *Hansenula polymorpha* se realiza a través de la inoculación de colonias individuales desde una placa de TSA en distintos medios selectivos con una única fuente de carbono o nitrógeno, observando el crecimiento a +30°C o +40°C.

Se analizan cuarenta colonias por ampolla de MSL o vial de WSL. Las colonias se toman de distintas placas de TSA (placas obtenidas luego del análisis de la prueba de pureza de la siembra) y se inoculan en placas con distintos medios de crecimiento, con un control positivo para *H. polymorpha* (veinte colonias por placa) y controles negativos con *S. cerevisiae* (veinte colonias por placa). Se realiza un duplicado de la colonia analizada en una placa de TSA al comienzo y al final de la serie de inoculación para garantizar que el inóculo de cada colonia se reparta de manera suficiente en cada placa de la serie. Se utiliza TSA como medio no selectivo que permite el crecimiento de cualquier colonia contaminante.

Los medios y las condiciones de crecimiento de las 8 placas inoculadas es el siguiente, en orden:

- 1) TSA (+30°C)^a
- 2) Agar YNB/metanol (+30°C)
- 3) Agar YCB/nitrato (+30°C)
- 4) Agar YNB/maltosa (+30°C)^a
- 5) Agar YNB/sacarosa (+30°C)^a
- 6) Agar YNB/glucosa (+30°C)^a
- 7) Agar YNB/glucosa (+40°C)^a
- 8) TSA (+30°C)^a

Se realiza la incubación hasta que las colonias son visibles o hasta los 10 días si no se observa crecimiento.

Simultáneamente, se analizan 5 colonias en el kit API® para levadura, de ser necesario.

Criterios de validez

Se observa crecimiento en los 2 cultivos en TSA de cada colonia.

El control negativo con *S. cerevisiae* no crece en el agar YNB/metanol (sólo para el lote MSL n.º MCB 160600BA y el lote WSL n.º MWCB 230600BA).

El control positivo de *H. polymorpha* crece en todos los medios.

Criterios de aceptación

Las colonias resultantes de la inoculación se identifican como Tipo = *Hansenula* y Especie = *polymorpha* si se cumple lo siguiente:

^a Estas pruebas fueron realizadas para el lote MSL 060600BA y para el primer lote WSL MWCB 230600BA pero no para el WSL siguiente.





- 1) Se observa crecimiento en los medios con metanol, maltosa y sacarosa como únicas fuentes de carbono para las colonias de cada placa;
- 2) Se observa crecimiento en los medios con nitrato como única fuente de nitrógeno para las colonias de esta placa;
- 3) Se observa crecimiento en los medios con glucosa a +30°C y +40°C;
- 4) Las pruebas API® realizadas para identificar *H. polymorpha*, si se llevan a cabo, cumplen con una probabilidad $\geq 95\%$.

Resultados esperados

El crecimiento del cultivo cumple con los criterios de aceptación indicados anteriormente.

5.1.3 Prueba de viabilidad

Finalidad/principio

La finalidad de esta prueba consiste en determinar la viabilidad de muestras de *Hansenula polymorpha* del MSL o del WSL.

El principio de esta prueba se basa en el recuento de colonias luego de la incubación de diluciones de muestras de los lotes de siembra.

Método

Se diluyen 0,5 mL de las muestras de los lotes de siembra (ampollas del MSL y viales del WSL) (1:10) con caldo de trip casa-soja o peptona al 0,1% para obtener diluciones de 10^{-1} a 10^{-10} . Luego las diluciones de 10^{-5} a 10^{-10} se siembran en cajas con agar de trip casa-soja (0,1 mL y 2 placas por dilución) y se incuban a +35°C durante 72 h y luego a +25°C durante 8 días o +37°C durante 48 h.

Nota: Estas condiciones de incubación se aplicaron al lote MSL n.º MCB 160600BA y al lote WSL n.º MWCB 230600BA. Para el lote WSL siguiente (MWCB 140308BA), las condiciones de incubación actuales son: 5 días a +30 - 35°C.

Luego se consideran las diluciones que presentan entre 30 y 300 UFC para calcular la cantidad de UFC viables por ampolla o vial del lote de siembra.

Se realizan controles negativos en el mismo tiempo en el medio de incubación y el medio de dilución.

También se efectúa un control positivo en el mismo tiempo con *S. aureus* y *C. albicans*.

Criterios de validez

Los controles negativos y positivos deben cumplir con lo esperado (sin crecimiento en los controles negativos y crecimiento en el control positivo).

Resultados esperados

Mínimo de $5,0 \cdot 10^4$ UFC/vial





5.2 Análisis de lote de los lotes de siembra maestros y de trabajo de *Hansenula polymorpha*

Los resultados de liberación obtenidos para el lote MSL MCB 160600BA, el lote WSL MWCB 230600BA y el lote WSL MWCB 140308BA se presentan en la Tabla 13.

Todos los lotes cumplen con las especificaciones.

Tabla 13: Datos de control de calidad referidos a los lotes MSL y WSL de *Hansenula polymorpha*

Controles		Criterios de aceptación	Resultados		
			MSL* MCB 160600BA	WSL* MWCB 230600BA	WSL MWCB 140308BA
Pureza	Ausencia de contaminantes bacterianos	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
	Ausencia de contaminantes de levaduras y hongos	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Identidad		Tipo = <i>Hansenula</i> Especie = <i>polymorpha</i>	Cumple Cumple	Cumple Cumple	Cumple Cumple
Viabilidad		Mínimo de $5,0 \cdot 10^4$ UFC/vial	$1,4 \cdot 10^9$	$0,96 \cdot 10^9$	$1,7 \cdot 10^9$

* La liberación del lote MSL (MCB 160600BA) y del primer lote WSL (MWCB 230600BA) se realizó tomando en cuenta también los resultados de las pruebas de caracterización detalladas en el párrafo 6 de esta sección.

