ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL MEDIO LOEFFLER MODIFICADO

Gutiérrez A *, Pineda K, Villarreal H

agutierrez@espromedbio.gob.ve/ df.espromedbio@gmail.com

RESUMEN: El proceso de producción del antígeno contra la difteria se divide principalmente en dos fases, la producción de la toxina y la producción del toxoide diftérico. Durante la fase de producción de la toxina, uno de los subprocesos es la activación y propagación de *Corynebacterium diphtheriae* en medio Loeffler, por lo cual es determinante que las condiciones del medio de cultivo sean las adecuadas para su crecimiento. Antiguamente, dicho medio de cultivo era preparado utilizando metodologías que bajo las condiciones del nuevo laboratorio de producción y las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) fueron modificadas, dando origen al medio "Loeffler modificado". Tomando en consideración una serie de requisitos que un medio de cultivo debe cumplir para asegurar su calidad, durante la estandarización del proceso de manufactura, se lograron establecer los parámetros fisicoquímicos (pH, color y consistencia) y microbiológicos (esterilidad y productividad), dando como resultado un medio Loeffler modificado estéril, sólido de color beige, con un pH de 7,6±0,2 y con un índice de productividad de 4,78 ± 0,15**.**

INTRODUCCIÓN

El proceso de producción del toxoide diftérico se divide principalmente en dos fases: Primera fase (producción de la toxina), segunda fase (producción del toxoide). Durante la fase 1, uno de los subprocesos es la activación y propagación de *Corynebacterium diphtheriae* en medio Loeffler [(1)]. Antiguamente, dicho medio de cultivo era preparado utilizando metodologías que bajo las condiciones del nuevo laboratorio de producción y las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) fueron modificadas dando origen al medio Loeffler modificado (figura 1).

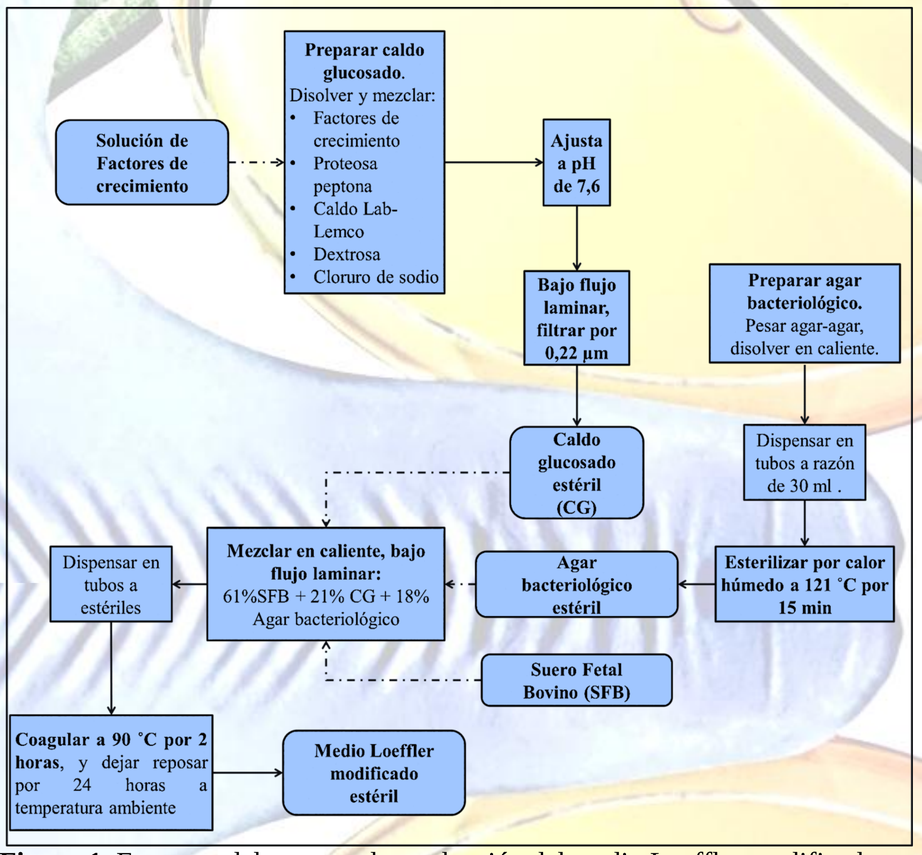

Figura 1. Esquema del proceso de producción del medio Loeffler modificado

Para el subproceso de activación y propagación de la cepa bacteriana, es determinante que las condiciones del medio de cultivo sean las adecuadas para el crecimiento de la bacteria. La ISO 11133 y la OMS en su informe 45 establecen una serie de requisitos que deben tener los medios de cultivos para asegurar su calidad (propiedades fisicoquímicas, esterilidad, productividad y condiciones de almacenamiento) [(2, 3)]. **Tomando en consideración los requisitos establecidos en estas normas y la importancia del medio Loeffler modificado para la activación y propagación de la cepa, se considera de gran importancia que la producción del medio sea consistente, por tal motivo nos propusimos como objetivo estandarizar dicho proceso.**

METODOLOGÍA

Tomando en consideración el diseño previo del proceso (figura 1), se elaboraron tres Lotes experimentales de medio Loeffler modificado, a los cuales se les realizaron pruebas de calidad fisicoquímica y microbiológica (tabla 1).

Tabla 1. Pruebas de calidad realizadas tanto al medio de cultivo como a sus componentes, según norma ISO 11133.

Componentes del Medio	Pruebas de calidad	Criterio de aceptación
Suero Fetal Bovino (SFB)	Esterilidad	Ausencia de crecimiento microbiano
Caldo Glucosado (CG)		
Agar bacteriológico		
Medio Loeffler modificado	pH	El pH óptimo de crecimiento de *C. diphtheria*e es 7, 6 [(4)]
	Apariencia física (color y consistencia)	El medio debe ser sólido sin grumos y de color beige
	Esterilidad	Ausencia de crecimiento microbiano
	* Factor de productividad ***Pr*** (usando como medio de referencia el agar tripticasa de soya)	*Pr* ≥ 0,7

*durante el desarrollo de esta prueba se realizan controles de pureza y estabilidad a la cepa bacteriana

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Durante la elaboración de los tres lotes experimentales, se establecieron las características fisicoquímicas y microbiológicas del medio de cultivo. El Loeffler modificado resultó ser de consistencia sólida, homogéneo, sin grumos y de color beige cremoso (figura 2), con un **pH de 7,6 ± 0,2**, lo cual concuerda con el pH óptimo de crecimiento de *C. diphtheriae*, y el pH de medios Loeffer comerciales[(4, 5)].

Figura 2. Medio Loeffler modificado.

Microbiológicamente, tanto los componentes del medio como el medio Loeffler modificado, resultaron conformes ante las pruebas de esterilidad. Por otra parte el medio de cultivo resultante presentó un ***Pr* de 4,78 ± 0,15** (tabla 2), este valor en comparación con el medio de referencia, nos indica que posiblemente la formulación de nuestro medio de cultivo lo hace más nutritivo e ideal para el crecimiento de *C. diphtheriae*, lo cual era de esperarse ya que en 1887 Friedrich Loeffler desarrolló por primera vez este medio nutritivo para ser utilizado en la identificación de Corynebacterias[(6)], y posteriormente en 1949 Buck lo modificó para ser utilizado específicamente como un medio para el crecimiento de *C. diphtheriae* [(7)].

Tabla 2. Productividad del medio Loeffler modificado.

Placas de medio Loeffler modificado	Factor de productividad (*Pr*)
Lote 1	4,568245125
Lote 1	4,902506964
Lote 2	4,724233983
Lote 2	4,947075209
Lote 3	4,902506964
Lote 3	4,657381616
Promedio ± desviación estándar	**4,78365831 ± 0,155457378**

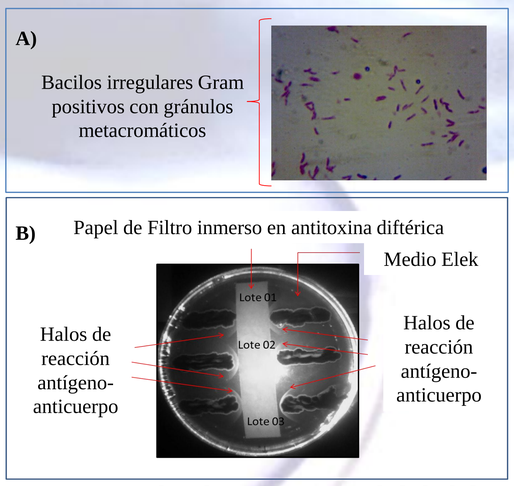

Figura 3. controles de pureza y estabilidad de *C. diphtheriae*. **A)** morfología por Tinción Gram. **B)** prueba de toxicidad de Elek.

Durante todo el desarrollo de las pruebas de productividad del medio de cultivo, se realizaron controles de pureza y estabilidad de la cepa bacteriana utilizada, como una manera de asegurarnos que el medio Loeffler desarrollado nos permitiera mantener las características inherentes de nuestra cepa de producción. En la figura 3A podemos observar por tinción Gram que se mantienen las características morfológicas de bacilos irregulares Gram positivos en forma de letras chinas [(4)], y en la figura 3B la presencia de halos de reacción antígeno-anticuerpo, lo que nos indica que las propiedades toxigénicas de la bacteria no se ven afectadas durante su crecimiento en el medio Loeffler modificado.

CONCLUSIÓN

En base a los resultados de las pruebas de calidad del medio, se pudo concluir que el proceso de producción del medio de cultivo es confiable, dando como resultado un medio Loeffler modificado que cumple con los requisitos de calidad establecidos por las normas ISO 11133 y la OMS en su informe 45, asegurándonos de esta manera que las condiciones del medio son las mas adecuadas para la cepa de producción.

BIBLIOGRAFÍAS

1. World Health Organization. Manual for the production and control of vaccines: Difterial-toxoid. Geneva: WHO; 1977.
2. International Organization for Standardization. ISO/TS 11133-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media, Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. Switzerland: ISO; 2009.
3. World Health Organization. Forty-fifth report of the WHO Expert Committee on specifications for pharmaceutical preparation, WHO technical report series n° 937. Geneva: WHO; 2006.
4. Romero R. Microbiología y parasitología humana. 3ra ed. Panamericana; 2007. pp 970.
5. Ficha técnica de (Medio Loeffler): Medio Loeffler inclinado, BD, 2007.
6. Loeffler F. Darawf theilte herr Loeffler en einem Zweiten Vortrag die ergehnisse seiner weiteren uter suchungen uber die Diphtherie-Bacillen mit., Zentrailbl Bakteril Parasitenkd. 1887; (2): 105-112.
7. Buck T C. A modified Loeffler`s medium for cultivating *Corynebacterium diphtheriae*., J. Lab Clin. Med. 1949; (34): 582-583.