

Universidad Iberoamericana

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**INVESTIGACION DE CEPAS TOXIGENICAS DE CORYNEBACTERIUM
DIPHTHERIAE POR INMUNOFLUORESCENCIA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACO - BIOLOGO
P R E S E N T A :
BERTA RAL FUENTES

MEXICO, D. F., 1966.

12255



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con todo cariño a mis Padres:

Sr. Adolfo Ral Tort y
Sra. Guadalupe H. de Ral



A mi Hermano, Maestros
y Amigos.

Agradezco a los Laboratorios Clínicos de México de Frontera 4,

la ayuda prestada para la realización de este trabajo y a la

Sra. Q.B.P. Ma. del Refugio Balcázar de Aztegui

por su desinteresada supervisión.

INDICE DE CAPITULOS

	Pág.
I.—INTRODUCCION	5
II.—METODOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACION DE CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE	7
a) Morfología.	
b) Propiedades Bioquímicas.	
c) Pruebas de virulencia.	
d). Métodos de inmunofluorescencia.....	34
III.—DISCUSION	35
IV.—CONCLUSIONES	42
V.—BIBLIOGRAFIA	43

CAPITULO I

INTRODUCCION

Corynebacterium diphtheriae, es una de las bacterias más estudiadas desde el nacimiento de la Bacteriología: fué reconocida por Klebs en 1883; aislada por Löffler, 1884, Roux y Yersin en 1888 descubrieron la toxina diftérica. En 1890 Behring inmunizó animales con su toxina. En 1913 se usaba la antitoxina para inmunizar pasivamente. El mismo año Schick descubrió su prueba para investigar susceptibilidad y en 1915 Park usó la toxina para la vacunación de niños. De donde se ve que en 32 años se había conocido el poder patógeno de *Corynebacterium* y se podía controlar la susceptibilidad y la manera de inmunizar activa y pasivamente.

Estos trabajos notables desarrollados cuando la Bacteriología apenas daba sus primeros pasos sirvieron de base para un sinnúmero de estudios sobre: la morfología, fisiología, patología e inmunología de *Corynebacterium*, así como sobre la bioquímica de la toxina y la antitoxina.

No obstante que los estudios sobre *Corynebacterium diphtheriae* y sus anticuerpos, pueden llenar una Biblioteca, esta bacteria sigue siendo un serio problema en los laboratorios bacteriológicos que rutinariamente colaboran con los clínicos en el diagnóstico de difteria.

Estos problemas tienen diferentes causas:

- 1.—Su marcado pleomorfismo.
- 2.—La variación de sus propiedades Bioquímicas.
- 2.—La existencia de numerosos portadores sanos.
- 4.—La variación del poder tóxico de *Corynebacterium*.
- 5.—La existencia de numerosas cepas atóxicas.

La experimentación de diferentes métodos propuestos para investigar cepas de *Corynebacterium diphtheriae* productor de toxina constituyen el objeto de esta tesis.

CAPITULO II

METODOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACION DE CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE.

a) MORFOLOGIA.

Mediante una encuesta realizada en varios laboratorios clínicos de la Ciudad de México, se concluye que la mayoría de ellos se concretan a identificar *Corynebacterium diphtheriae* morfológicamente, previa tinción con Gram y azul de metileno de Löffler; siendo ésto de lamentar, ya que por medio de un frotis no se puede decir con seguridad si se trata o no, de un caso de difteria. En la práctica se realiza la tinción en el frotis tomado directamente del exudado de la rinofaringe o bien del cultivo en medio de Löffler.

Con objeto de estudiar los posibles cambios morfológicos de *Corynebacterium diphtheriae* se sembraron diferentes cepas, conocidas por su toxicidad, proporcionadas por la E. N. C. B. del I. P. N.

y del Instituto de Higiene, conservadas mediante leofiliación; otras cepas se obtuvieron de los Laboratorios Zapata y de los Laboratorios de Frontera 4, las cuales estaban sembradas en medios de Muller y Telurito respectivamente, de estos cultivos de 24 horas se hicieron resimbras en otros diferentes medios:

1.—Caldo Cerebro Corazón con extracto de levadura al 10% y suero de caballo al 10%, pH de 7.8.

2.—Caldo Cerebro Corazón.

3.—Cultivo en medio de gelosa telurito, que es uno de los métodos de aislamiento e identificación más utilizados. Se usó el Disco o en su defecto Gelosa Chocolate adicionado de 0.004% de telurito de potasio 2.11.

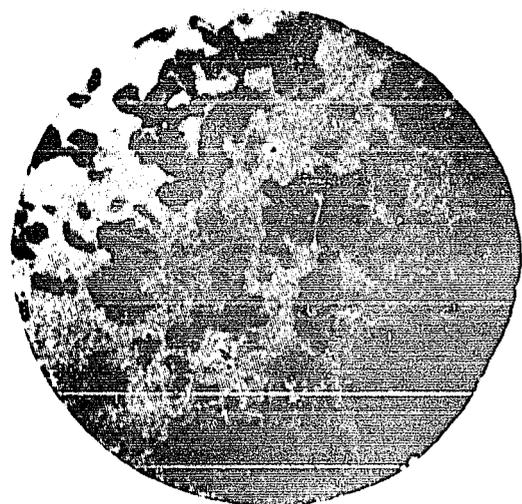
Los diferentes textos de Bacteriología describen las colonias de distintas especies y variedades de *Corynebacterium*, no obstante, en la práctica, este método de aislamiento en telurito da resultados pobres por su falta de precisión, puesto que es difícil apreciar con uniformidad las diferentes colonias negruzcas y grisáceas; también se observan resultados que no concuerdan con la Bibliografía

trabajando con cepas reconocidas por su toxicidad en el laboratorio, mediante pruebas de virulencia.

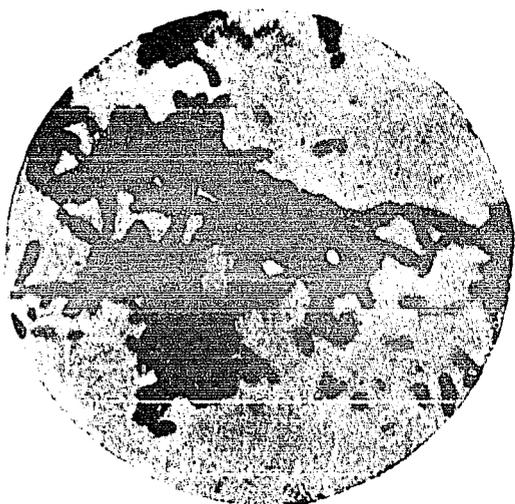
4.—Gelosa Chocolate.—Este medio se usó fundamentalmente para conservar la cepa de *Corynebacterium diphtheriae* y en él las colonias eran grises y pequeñas; presentándose en forma brillante o mate.

5.—El medio de Frobisher 6.7 es el que fué utilizado con éxito para la investigación de cepas tóxicas en el método de Elek.

La morfología de una misma cepa en los diferentes medios se observa en las fotos Núm. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.



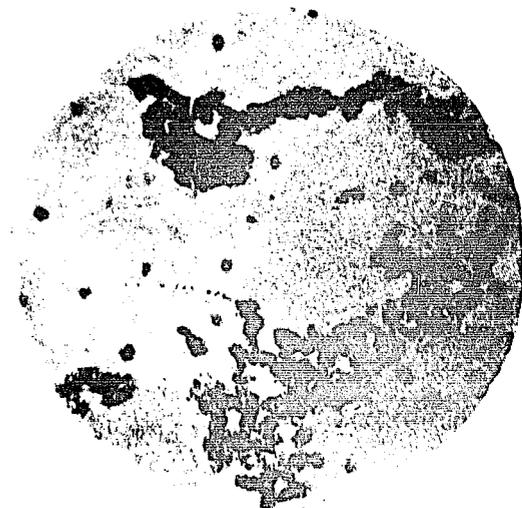
1. En medio de Caldo Cerebro Corazón con 10% de suero de caballo y levadura.



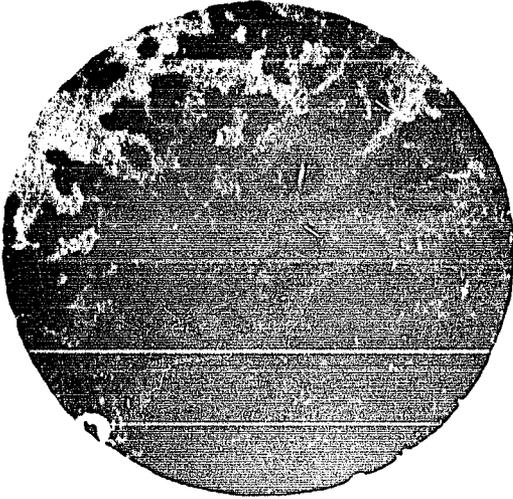
2.—En medio de Frobisher.



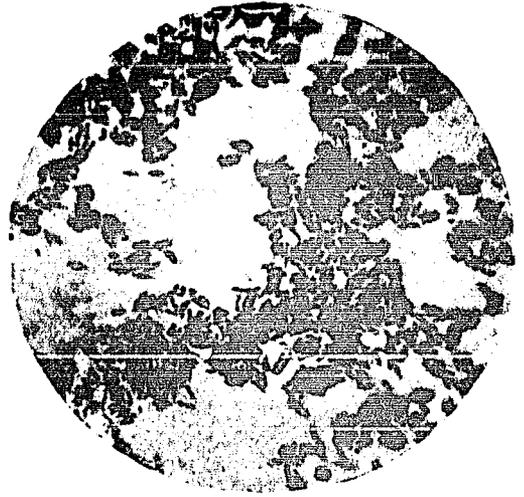
3. En medio de Löffler.



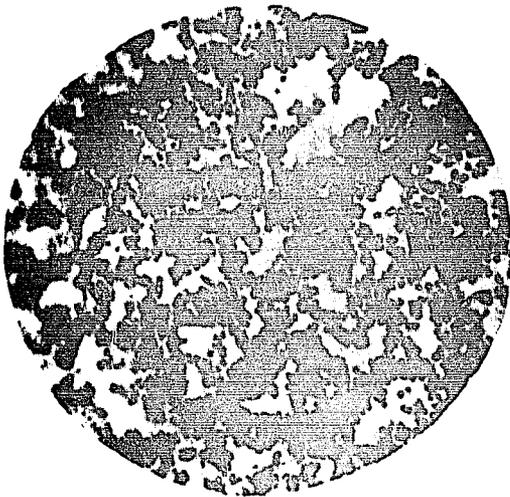
4 En medio de Agar Telurito.



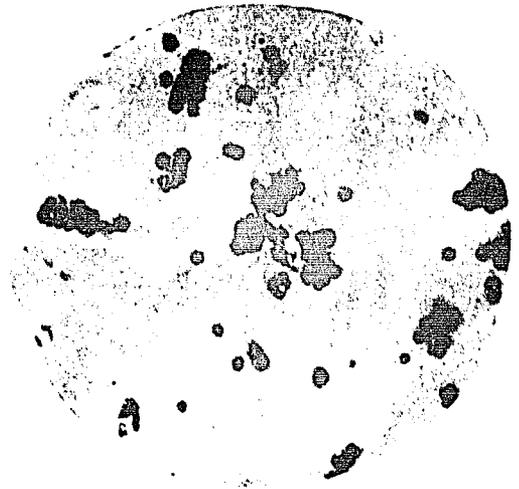
5. En medio de Gelosa Sangre.



6.- En Gelosa Chocolate.



7. Al resembrar en Gelosa Chocolate se observó un cambio en la morfología de *Corynebacterium diphtheriae*.



8. Nueva resimbria en Gelosa Chocolate.

b) PROPIEDADES BIOQUIMICAS:

Todas las Bacteriologías 3,4 consultadas presentan la misma tabla de fermentación de glucosa, maltosa y almidón; y los autores señalan variaciones en estas propiedades bioquímicas, por lo que no se pueden tomar en forma básica para la identificación de *Corynebacterium*. Además, por ser demasiado tardadas no se les da ningún valor diagnóstico.

c) PRUEBAS DE VIRULENCIA.

1.—METODO "in vivo" DE ROMER 3, 4, 10, 11.

Material necesario:

- 1.—Cepa pura de *Corynebacterium* problema desarrollado en medio de Löffler.
- 2.—Caldo Cerebro Corazón estéril.
- 3.—Antitoxina diftérica.
- 4.—Jeringa y agujas estériles.
- 5.—Dos cobayos depilados ventralmente.

Técnica:

El organismo problema desarrollado en el medio de Löffler se emulsiona con 3 o 5 ml. de caldo. De éstos se inyectan de 0.1 a 0.2 ml. en la parte ventral de un cobayo, previamente depilado ventralmente.

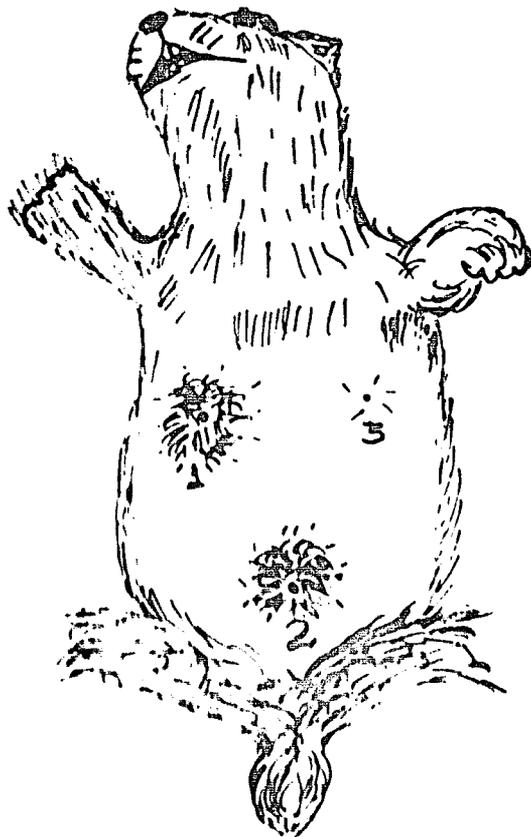
Se necesitan dos cobayos: a uno se le administra una dosis protectora de 500 unidades de antitoxina diftérica, inyectada intraperitonealmente, doce a catorce horas antes de inyectarlo las copas.

Al segundo cobayo se le inyectan de 30 a 50 unidades de antitoxina diftérica, tres o cuatro horas después de la inyección de las copas; con lo que eso evitará la muerte al cobayo, sin que interfiere con la reacción cutánea específica.

La observación se hace después de 24 horas; el primer cobayo no debe presentar ninguna reacción. El segundo cobayo a las 24 horas presentará una área inflamada, que seguirá progresando hacia la necrosis, entre las 48 y 72 horas.

Este método es muy preciso para la investigación de copas toxigénicas de *Corynebacterium*, pero resulta demandado tardada pa-

ra llevarse a cabo en el laboratorio, como método de rutina.



Esquema Núm. 1. Reacción de las cepas problema y testigo en el cobayo. 1. Cepa de *Corynebacterium testigo* toxigénica. 2. Cepa de *Corynebacterium problema* toxigénica. 3. Cepa testigo no toxigénica.

2.—METODO "in vitro" DE ELECK 6, 7, 9, 10.

Este método se basa en el de Ouchterlony que usa precipitación en placa.

Material Biológico:

1.—Cepa reciente de 24 horas de cultivo de *Corynebacterium* problema; y cepas testigo sembradas en medio de Löffler.

Material necesario:

1.—Medio de Frobisher envasados en tubos con 20 ml. de medio:

MEDIO DE FROBISHER

Proteosa peptono	2.00 g
Agar granulado	1.50 g
NaCl Q.P.	0.25 g
Agua destilada	100 ml

Se ajusta el pH a 7.8 se esteriliza en autoclave a 15 lb por 15 minutos y se almacena a temperatura ambiente.

2.—Suero de Caballo no hemolizado y esterilizado por filtración.

- 3.—Antitoxina diftérica diluída a 500 unidades por ml con solución salina estéril.
- 4.—Tiras de papel filtro con las dimensiones siguientes: 6 cm por 1.5 cm. Se esterilizan en el horno o en autoclave; y se embeben con la antitoxina que contiene 500 unidades por ml.
- 5.—Pinzas estériles.
- 6.—Cajas de Petri estériles de 10 cm de diámetro.

Técnica:

a) Se licúan los 20 ml de medio y se enfrían a 50° C; se les añaden los 5 ml de suero. Se vierten mezclados en una caja de Petri estéril.

b) Cuando comienza a solidificar se toma con las pinzas estériles una tira de papel, ombebida con antitoxina conteniendo 500 unidades por centímetro cúbico. Y se coloca en la parte media de la caja de Petri con el medio, de modo que parte de él cubra el papel.

c) Se enfrían para que solidifique el medio.

d) Se siembra la cepa problema y la testigo en líneas delgadas y perpendiculares a la tira de papel. Se comienza por el problema, en medio se siembra el testigo negativo (difteroide) y en el otro extremo la cepa toxigénica testigo.

e) Se investiga la formación de precipitado y se compara con las copas testigo.

La lectura se hace a las 24, 48 y 72 horas.

A las 24 horas las líneas pueden ser muy débiles por lo que se requiere una observación muy cuidadosa.

Las cepas tienen que ser de cultivo reciente y no deben de permanecer más de 24 horas en la estufa. Se resimbra diariamente, y cuando esto no pueda ser por alguna causa, es mejor guardar la cepa en el refrigerador.

Antes de proceder a realizar la reacción de Elek, se probaron antitoxinas de 5 diferentes marcas, encontrándose que las del Instituto de Higiene que contenían 10,000 unidades y la de los Laboratorios Zapata con 5,000 unidades dieron los mejores resultados.

Se usó la del Instituto de Higiene por tener el título más alto. Se tituló la antitoxina para conocer las unidades necesarias que, reaccionando dentro de la zona óptima produzcan el precipitado en menos tiempo. TABLA Núm. 1.

T A B L A N U M . 1

UNIDADES DE

	CEPA MASSS	DIFTEROIDE	CEPA NUM. 18
ANTITOXINA			
10 000 u	48 horas	—	48 horas
500 u	72 horas	—	72 horas
100 u	96 horas	—	96 horas
0 u	—	—	—

En vista de la dificultad de obtener suero normal de caballo se usó el preparado Hemestyl, dando el precipitado como en las Figs. Núm. 9 y 10.

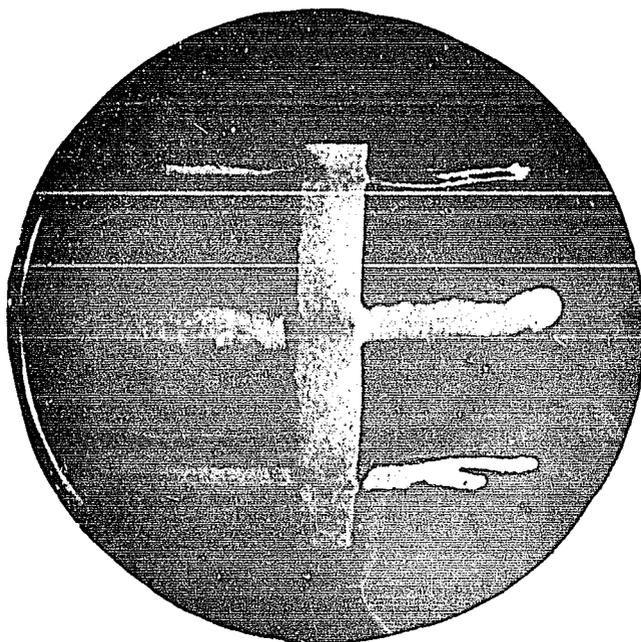


Fig. Núm. 9.—Se observa como la cepa problema yestigo de *Corynebacterium diphtheriae*, al producir toxina que reacciona con la Antitoxina de la tira de papel forma el precipitado.

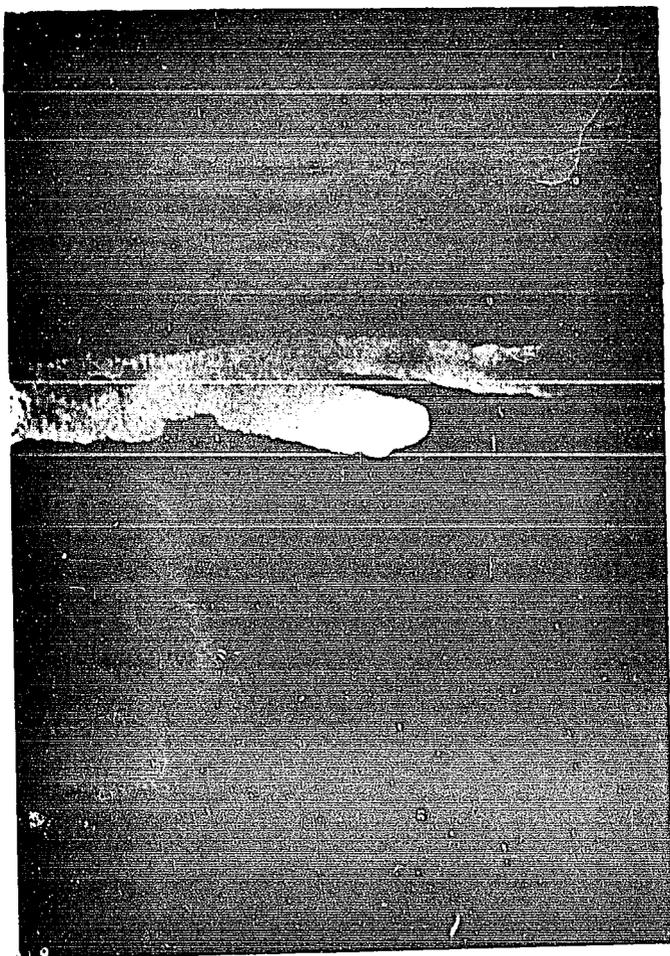


Fig Núm 10. Observación detallada de la forma que presenta el precipitado de la reacción entre la toxina y antitoxina diftérica, empleando el método original de Elek.

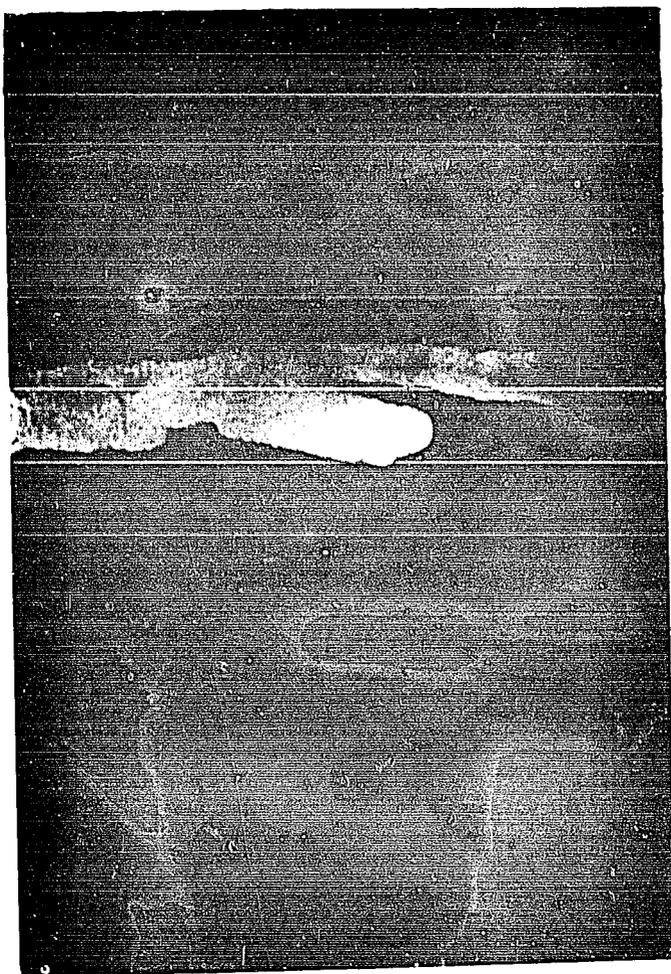


Fig Núm 10. Observacion detallada de la forma que presenta el precipitado de la reaccion entre la toxina y antitoxina diftérica, empleando el metodo original de Elek

Una modificación al método anterior y que resultó más práctico es la de sustituir el suero de caballo normal por suero de caballo conteniendo antitoxina. Se agregó al medio de Frobisher en lugar del 25% de suero normal de caballo, 25% de suero de caballo inmunizado con toxina diftérica, con 500 unidades de antitoxina, titulado por el método de Ramon.

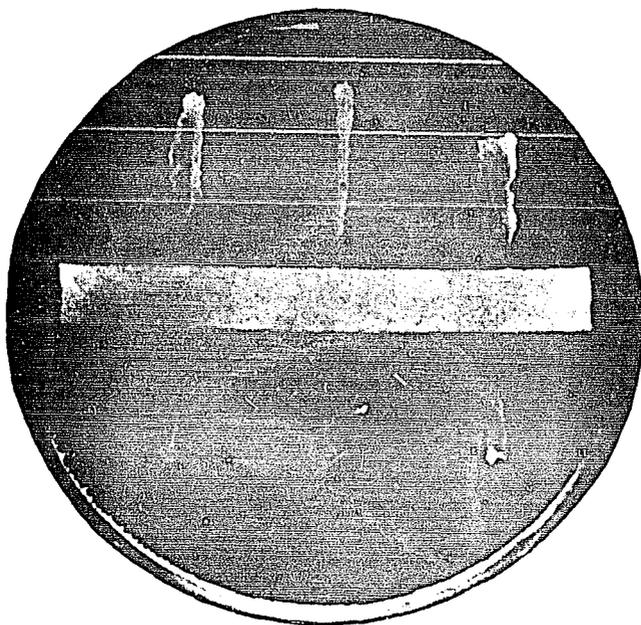


Fig. Núm. 11. En este caso se sembraron 2 cepas problemáticas y una testigo de *Corynebacterium diphtheriae*. Obteniéndose esta forma de precipitado, debido a que tanto la tira de papel filtro como el medio, contiene antitoxina.

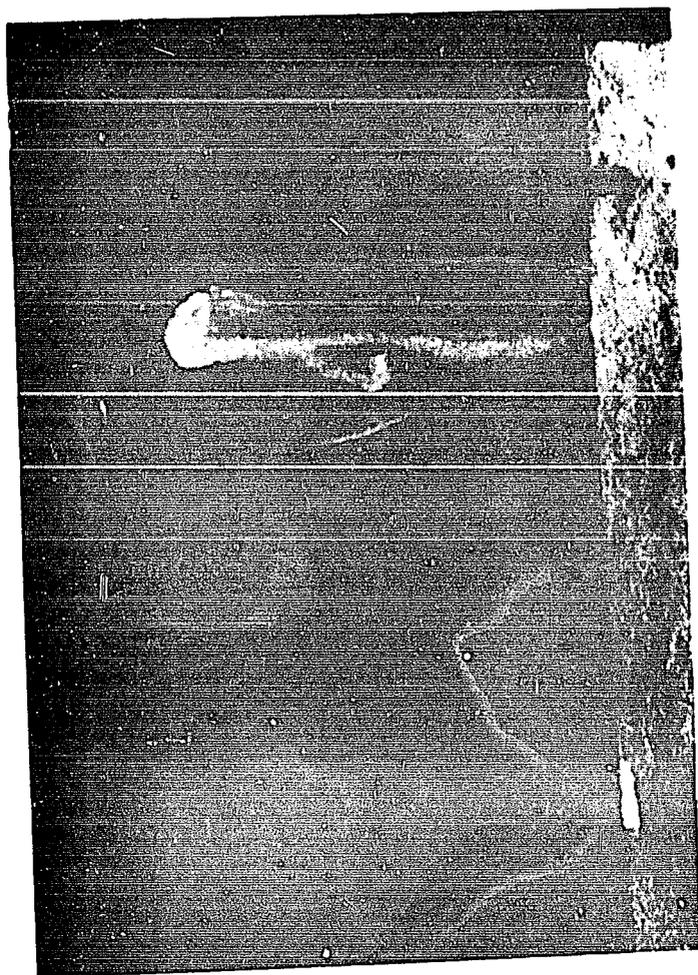


Fig. Núm. 12. Observación detallada de la forma que presenta el precipitado que se obtuvo como resultado de la reacción entre la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae* y la antitoxina contenida tanto en el medio como en la tina de papel.

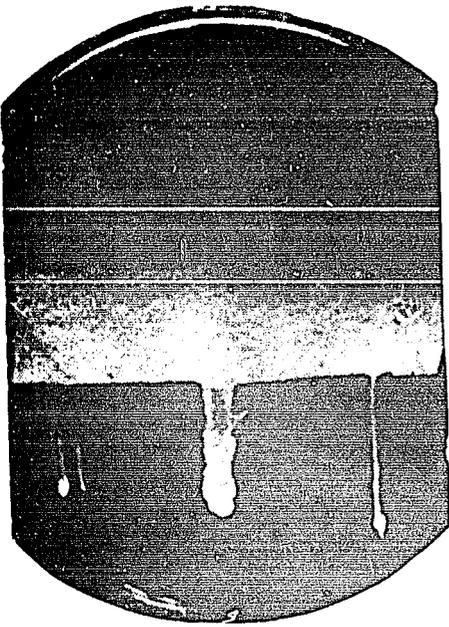


Fig. Núm. 13.



Fig. Núm. 14.

En estas fotos se observa un cambio en la forma del precipitado con respecto a las fotos 11 y 12 debido a que en este caso, se substituyó la antitoxina del papel filtro por solución salina. Reaccionando la toxina producida por el *Corynebacterium* únicamente con la antitoxina del medio.

Se observó que al adicionar telurito de potasio al medio, para evitar el desarrollo de contaminantes, disminuye considerablemente la opreciación del precipitado Foto Núm. 15.

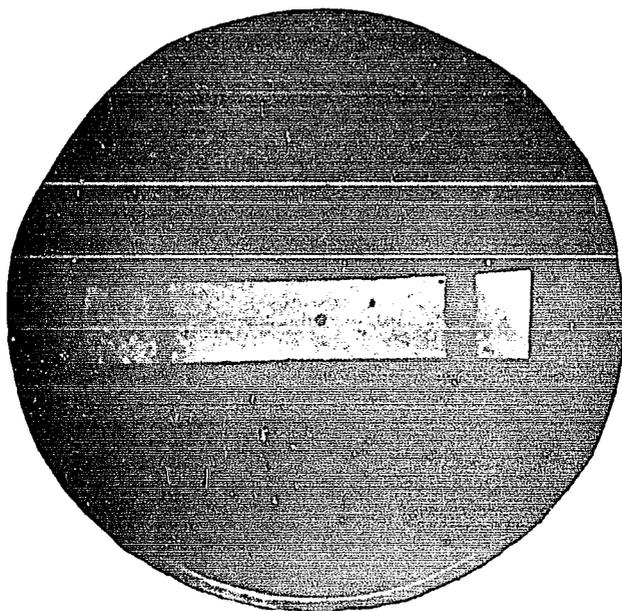


Fig. Núm 15. Disminución de la formación de precipitado al adicionar telurito de potasio, para evitar los contaminantes en el medio.

Además se debe tomar en cuenta el pH. Un pH de 7.6 a 7.8 da resultados óptimos; en cambio un pH menor a 7.5, hace que se obtengan resultados falsos como puede verse en la Fig. Núm. 17;

en que el pH del medio fué de 7.4 y donde no se puede apreciar un precipitado claro.

La modificación al método de Eleck se puede considerar de resultados más precisos; y además se logran obtener los precipitados en menos tiempo que con la técnica original.



Fig. Núm. 16. Debido al pH de 7.1 se observa con dificultad el precipitado en la placa.

En la TABLA Núm. 2 se ve como se obtienen resultados positivos tanto en las pruebas "in vivo" como "in vitro"; así como hay coincidencia en las cepas atóxicas y en los difteroides.

T A B L A N U M . 2

RESULTADOS DE PRUEBAS DE VIRULENCIA

NUM. DE CEPA	"in vivo"	"in vitro"
1	++	+
2	+	+
3	++++	+
4	++	+
5	++	+
6	—	—
7	++	—
8	+++	+
9	+	+
10	++	+
11	—	—
12	+++	+
13	—	—
14	+	—
15	+++	+
16	++++	+
17	—	—
18	+++	+
19	++	+
20	+++	+
21	—	—
22	++	+
23	+++	+
24	++	+
25	+++	+

di METODOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

1.—METODO DIRECTO 1. 8. 12.

Material necesario:

- 1.—Portaobjetos con pizarra sobre los que se dibujan dos círculos de 1 cm de diámetro aproximadamente, dejando entre los dos una distancia considerable.
- 2.—Cubreobjetos
- 3.—Suero FA *Corynebacterium diphtheriae*.
- 4.—Alcohol absoluto o de 96 (puro).
- 5.—Vaso de Coplin
- 6.—Regulador salino de fosfatos pH 7.2.
- 7.—Pinzas.
- 8.—Cajas de plástico para refrigerador, que sirven como cámara húmeda.

Técnica:

a) Del cultivo en Caldo Cerebro Corazón de *Corynebacterium diphtheriae* se suspende en solución salina estéril. Con la suspensión se hace el frotis de *Corynebacterium problema*, en el lado derecho del portaobjetos y cerca de la pizarra se hace el frotis de *Corynebacterium testigo*. En la pizarra se anota con lápiz de grafito el número de la muestra.

b) Los frotis se secan al aire.

c) Se fijan cubriéndolos con alcohol absoluto durante 2 m.

d) Se escurre el alcohol y se secan al aire.

e) En cada uno de los frotis hechos en los círculos del portaobjetos se pone una gota del suero FA *Corynebacterium diphtheriae*. Se usa un aplicador de madera para repartir el suero sobre la superficie de cada frotis.

f) Se introduce el frotis en una caja de Petri, la caja deberá tener un papel filtro húmedo cubriendo el fondo (para que sirva de cámara húmeda).

g) Cuando hay muchas muestras conviene usar como cámara húmeda una caja de plástico de refrigerador con fondo plano, el cual se cubre con papel filtro húmedo y en él se colocan los portaobjetos.

h) Se introducen las cajas de Petri o la de plástico a una estufa de 37° C y se mantienen en ella durante 30 minutos.

i) Se sacan los portaobjetos de sus respectivas cámaras húmedas y se les escurre el suero sobrante con ayuda de una piceta llena de regulador. Esta operación debe hacerse con cuidado para no arrastrar con el líquido los frotis

j) Se introducen en regulador salino pH 7.2 Usando para ello cajas de Colpin. Después de 5 minutos se cambia el regulador y

se dejan otros 5 minutos. Cuando han pasado 10 minutos en total, durante los cuales se han lavado los frotis con regulador para eliminar el suero fluorescente sobrante, se lavan los frotis con mucho cuidado con agua destilada para eliminar las sales.

k) Se secan por papel filtro muy suave (Wattmann Núm 42). Esta operación debe realizarse con suavidad.

l) En la parte central de cada círculo se pone una gotita de regulador glicerolado-salino y se cubre con un cubreobjetos.

m) Se observa en el microscopio de fluorescencia, utilizando el objetivo de inmersión. Para ésto se requiere un microscopio equipado, así como una fuente de luz ultra violeta, en forma de bulbos de mercurio de 200 watts. Existen filtros entre la luz naciente y la que eclorea, cortando la luz visible, pero dejando pasar la luz ultra violeta en el rango de 350 a 450 m μ . Entre el ocular y la tinción existen los filtros 50 y 47 que sirven para proteger los ojos de las radiaciones ultra violeta. Además el microscopio consta de un condensador de campo oscuro. Se utiliza el objetivo 3.5 X para examinar y enfocar. Cambiando al objetivo de inmersión 100X para la observación final.

2.—METODO INDIRECTO.

Material necesario:

- 1.—Portaobjetos con pizarra sobre los cuales se dibujan dos círculos de 1 cm. de diámetro aproximadamente; dejando entre los dos círculos una distancia considerable.
- 2.—Cubreobjetos.
- 3.—Suero antitoxina diftérica diluida con solución salina que contenga 500 unidades por centímetro cúbico.
- 4.—Suero FA antiglobulina de caballo (conejo).
- 5.—Alcohol absoluto o de 96° (puro).
- 6.—Vaso Coplin.
- 7.—Regulador de fosfatos-salino pH 7.2.
- 8.—Pinzas.
- 9.—Cajas de plástico para refrigerador y que se utilizan como cámara húmeda.

Técnica:

a) El cultivo en Caldo Cerebro Corazón de *Corynebacterium diphtheriae* se suspende en solución salina estéril. Con la suspensión se hace el frotis de *Corynebacterium* problema, en el lado derecho del portaobjetos y cerca de la pizarra se hace el frotis de *Corynebacterium* testigo. En la pizarra se anota con lápiz de grafito el número de la muestra

b) Los frotis se secan al aire.

c) Se fijan cubriéndolos con alcohol absoluto, durante 2 minutos.

d) Se escurre el alcohol y se secan al aire los frotis se pone una gotita de suero de antitoxina diftérica con 500 unidades por centímetro cúbico. Se usa un aplicador de madera para repartir el suero sobre la superficie del frotis.

f) Se introduce el frotis en una caja de Petri, que sirve de cámara húmeda.

g) Se introducen las cajas Petri o la caja de plástico a una estufa de 37 C y se mantienen en ella durante 30 minutos.

h) Se sacan los portaobjetos de sus respectivas cámaras húmedas y se les escurre el suero sobrante con ayuda de una piceta llena de regulador PH 7.2. Esta operación debe hacerse con cuidado para no arrastrar con el líquido los frotis.

i) Se introducen los portaobjetos en regulador salino pH 7.2. Usando para ello los vasos Coplin. Después de 5 minutos se cambia el regulador y se dejan otros 5 minutos. Cuando han pasado 10 minutos en total durante los cuales se han lavado los frotis con regulador para eliminar el suero fluorescente sobrante.

j) Se secan con papel filtro muy suave (Wattmann Núm. 42).

k) En el frotis de *Corynebacterium problema* y testigo se pone una gotita de suero FA antiglobulina de caballo (conejo).

l) Se introduce nuevamente el portaobjetos en la cámara húmeda.

m) Se introducen las cajas a una estufa de 37° C durante 30 minutos.

n) Se sacan los portaobjetos de la cámara húmeda y se les escurre el suero sobrante con ayuda de una picota llena de regulador. Esta operación se hace con cuidado.

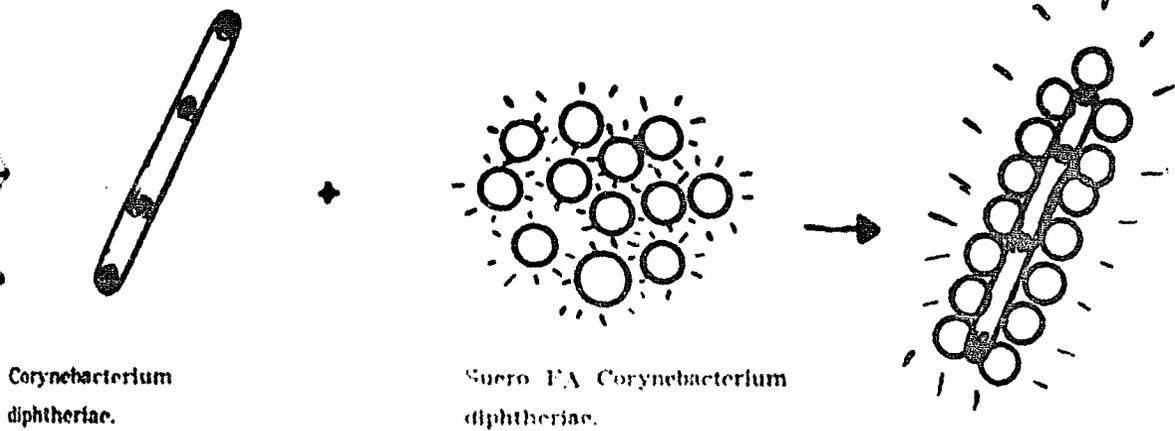
ñ) Se introducen en regulador salino pH 7.2. Usando para ello vasos Coplin. Después de 5 minutos se cambia el regulador y se dejan otros 5 minutos. Después de 10 minutos en total se lavan con agua.

o) Se secan con papel filtro muy suave.

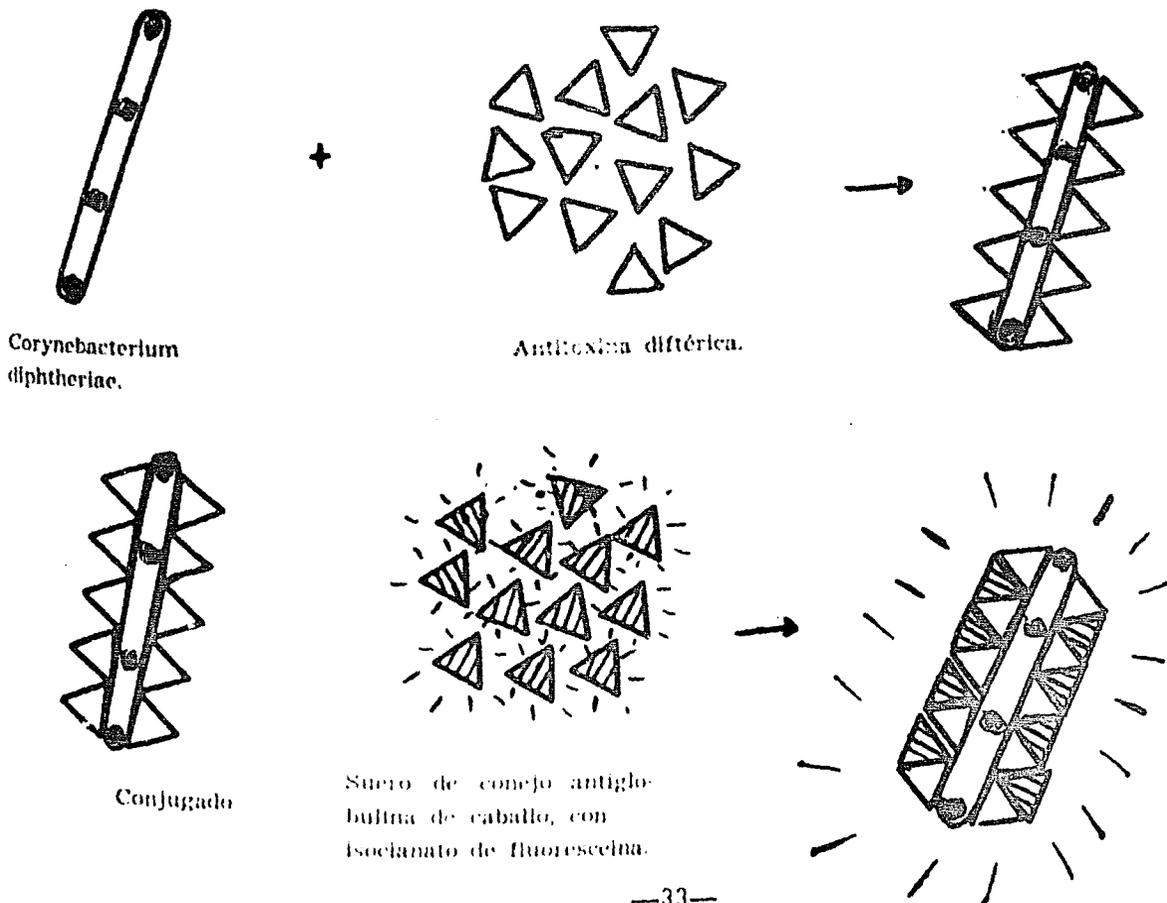
p) En la parte central de cada círculo se pone una gotita de regulador de glicerol salino y se cubre con un cubreobjetos.

q) Se observa al microscopio de fluorescencia como en el método directo.

Esquema del método de Inmunofluorescencia Directo:



Esquema del método de Inmunofluorescencia Indirecto.



No obstante que los métodos de Inmunofluorescencia prometían mejores resultados teóricamente, por su rapidez y especificidad de la técnica, en la práctica con el suero "Disco" antitoxina *Corynebacterium diphtheriae*; para el método Directo no se obtuvo la especificidad requerida.

En cuanto al método Indirecto se encontró que el suero de caballo presenta anticuerpos inespecíficos; por lo tanto este método no debe utilizarse con dicho suero.

CAPITULO III

DISCUSION

Teniendo en cuenta que una bacteria puede ser identificada por su morfología, propiedades tintoriales, propiedades bioquímicas, inmunológicas, poder patógeno, resistencia a determinados agentes, etc., se puede concluir que el *Corynebacterium diphtheriae* es una de las bacterias difíciles de identificar con rapidez. En efecto, los estudios de la morfología realizados en diferentes cepas tóxicas y atóxicas presentaron muchas variaciones en su morfología cultivadas en diferentes medios. Las fotografías presentadas de una misma cepa da una idea del marcado pleomorfismo.

En la fotografía Núm. 1 se encuentran formas con ramificaciones y masas cuando se cultiva en caldo enriquecido con suero de caballo al 10% y extracto de levadura al 10%. El cultivo en otros medios y después de varios pases puede llevar a la obtención de

formas cocoides. Muchas cepas tóxicas toman la forma cocoide cuando se les resiembró haciendo pensar a los laboratoristas que han perdido la copa original y que el cultivo se encuentra contaminado con alguna especie de la familia Micrococcaceae. La siembra en caldo con extracto de levadura y suero de caballo y sobre todo en el pase en animales les hace recobrar su forma características.

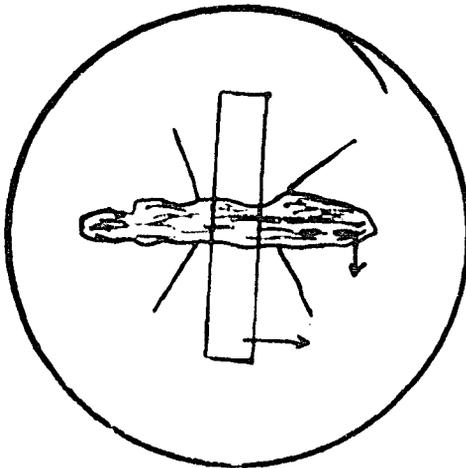
La coloración de los gránulos metacromáticos con azul de metileno de Löffler, con Albert o Lubinsky pueden ser útiles en la identificación.^{5,11}

En cuanto a observación de colonias en medio de telurito se encuentra extraordinaria variación y no resulta un método objetivo para distinguir *Corynebacterium diphtheriae*. La inconstancia de las pruebas bioquímicas de fermentación han sido desechadas por todos los bacteriólogos que interrogamos.

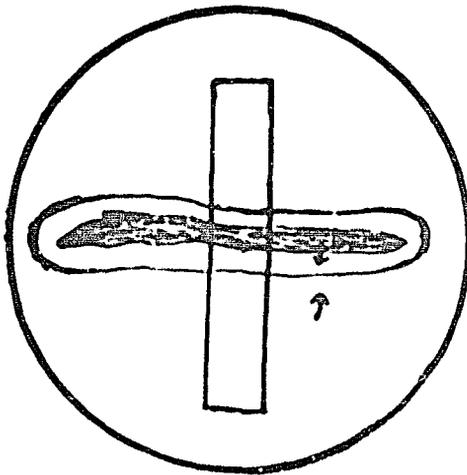
Es un hecho que los bacilos diftéricos son importantes desde un punto de vista clínico por la producción de toxina sin esta característica de virulencia, esta bacteria pierde su importancia en la Patología. Por esta razón la investigación de *Corynebacterium* debe orientarse hacia la producción de toxina fundamentalmente.

Nadie pone en duda la exactitud del método para investigar virulencia del *Corynebacterium diphtheriae* en cobayo, pero muchos laboratorios no lo utilizan rutinariamente por resultar demasiado complicado y tardado.

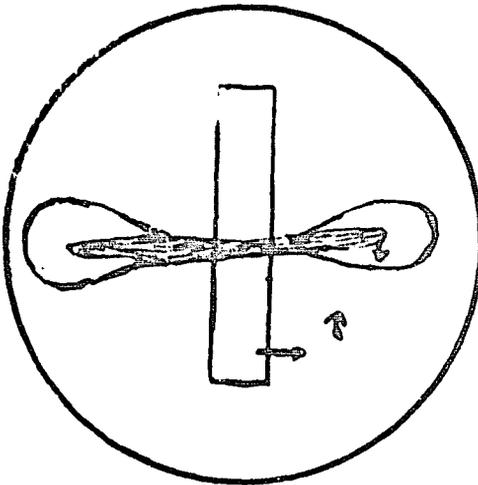
La prueba de Elek tiene varias ventajas y gana en sencillez y rapidez con la modificación propuesta, que consiste en que la antitoxina diftérica se encuentra en el medio, para ello basta usar suero de caballo inmunizado que contenga alrededor de 500 unidades de antitoxina. La forma de precipitado puede verse en las fotos anteriores. Una explicación de la formación de precipitado se da en los esquemas:



Esta es la forma normal como se presenta el precipitado, el cual se va formando en las zonas en que va reaccionando la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae* con la antitoxina contenida en la tira de papel.



Cuando se sustituye la antitoxina diftérica de la tira de papel filtro por solución salina y se le adiciona al medio, suero de caballo inmunizado, se obtiene esta forma de precipitado ya que en el medio se encuentra antitoxina que reacciona con la toxina producida por *Corynebacterium diphtheriae*.



En esta ocasión la placa contiene antitoxina tanto en la tira de papel filtro, como en el medio, y al existir un exceso de antitoxina en la zona en que se forma un ángulo recto entre el cultivo de *Corynebacterium* y la tira de papel, no será suficiente la toxina producida para reaccionar con ella, existiendo un fenómeno de zona. Formándose el precipitado en la zona en que sólo reaccione la toxina con la antitoxina del medio.

Es importante considerar que esta reacción es una prueba inmunológica de precipitación, la cual requiere para realizarse con éxito que se encuentre en la zona óptima de concentración de antígeno y anticuerpo, que el pH sea constante para que no se modifique la producción de toxina. En la figura No. 17, se puede ver que la reacción no se realizó cuando los pH eran de 7.2 a 7.4.

Así mismo la presencia de telurito de potasio, para tener el cultivo selectivo causó inhibición en la producción de toxina dando por resultado una reacción muy lenta y débil y en un segundo paso negativa. Es por lo tanto aconsejable que las personas que usen esta reacción controlen y standardizen todos los factores que puedan interferirla.

En cuanto a la Inmunofluorescencia utilizando los sueros "Difco", pudo observarse la falta de especificidad del suero para la identificación directa, debido a los antígenos comunes de *Corynebacterium diphtheriae*. Tal vez con estudios posteriores y absorción inmunológica correcta se podrá disponer de sueros específicos para la determinación rápida y específica de *Corynebacterium diphtheriae*.

En cuanto a la prueba indirecta para investigar cepas toxigénicas no se tuvo el éxito esperado debido a la presencia en el

suero de caballo de algunos anticuerpos que dan reacción específica. Es posible que con sueros obtenidos en otros animales puedan servir con éxito para el reconocimiento por Inmunofluorescencia de cepas toxigénicas de *Corynebacterium diphtheriae* en los laboratorios Bacteriológicos.

CAPITULO IV.

CONCLUSIONES :

1.—Lamentablemente la mayoría de los Laboratorios identifican *Corynebacterium* morfológicamente.

2.—El pleomorfismo de *Corynebacterium* hace pensar que es dudosa la identificación morfológicamente.

3.—Es muy difícil identificar con seguridad diferentes cepas de *Corynebacterium* en cultivo de telurito.

4.—Las pruebas Bioquímicas son poco usadas por ser demasiado tardadas.

5.—El método directo de inmunofluorescencia es inespecífico con el suero "Difco".

6.—El método indirecte usando suero de caballo conjugado con leocianato de fluoresceína resultó también inútil por el comportamiento del suero de caballo que presentó actividad inmunológica inespecífica.

7.—Las pruebas de virulencia en cobayo son exactas y específicas pero poco prácticas en el laboratorio de rutina.

8.—Las pruebas de Elek en placa y con la modificación son exactas y sensibles cuando las cepas son toxigénicas.

9.—Se propone el uso de la antitoxina mezclada en el medio para tener resultados más rápidos y claros.

10.—Se espera que con investigaciones más profundas sobre este tema se llegue a contar con técnicas altamente específicas y sensibles; sencillas y de resultados rápidos para lograr la identificación de *Corynebacterium diphtheriae* en los laboratorios clínicos de rutina.

CAPITULO V.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.—Allen C.J. and Leighton E.C. Identification of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* with fluorescent antitoxin; demonstration of its nonspecificity. Proc. Coc. Explt. Biol. Med. 112: 194—199; 1963.
- 2.—Burdon K.L. Text Book of Microbiology 3 ed. New York Macmillan C6. Pág. 406—471; 1947.
- 3.—Burrows W. Text Book o Microbiology 80ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia and London. Pág. 33-34; 728-730; 1963.
- 4.—Bryan A.H. and Bryan C.G. Bacteriology Principles and Practice 5 ed. Barnes and Noble Inc. New York Pág. 214; 1953.
- 5.—Davis J.C. and Stuart M. The Cytology of a Strain of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bacteriology 69: 372-386; 1954.
- 6.—Frobisher M. King E. O. and Parson E.I. Test in vitro for virulence of *Corynebacterium diphtheriae* Am. J. Clin. Path 21: 282-284; 1951.
- 7.—King E.O. y otros. Further Studies on the in vitro test for virulence of *Corynebacterium diphtheriae* A. I. Pub. Health 40: 704; 1950.

CAPITULO V.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.—Allen C.J. and Leighton E.C. Identification of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* with fluorescent antitoxin; demonstration of its nonspecificity. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 112: 194—199; 1963.
- 2.—Burdon K.L. *Text Book of Microbiology* 3 ed. New York Macmillan Co. Pág. 406—471; 1947.
- 3.—Burrows W. *Text Book of Microbiology* 80ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia and London. Pág. 33-34; 728-730; 1963.
- 4.—Bryan A.H. and Bryan C.G. *Bacteriology Principles and Practice* 5 ed. Barnes and Noble Inc. New York Pág. 214; 1953.
- 5.—Davis J.C. and Stuart M. The Cytology of a Strain of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriology* 69: 372-386; 1954.
- 6.—Frobisher M. King E. O. and Parson E.I. Test in vitro for virulence of *Corynebacterium diphtheriae* *Am. J. Clin. Path* 21: 282-284; 1951.
- 7.—King E.O. y otros. Further Studies on the in vitro test for virulence of *Corynebacterium diphtheriae* *A. I. Pub. Health* 40: 704; 1950.

- 8.—Moody M.D. and Jones W.L. Identification of *Corynebacterium diphtheriae* fluorescent antibacterial reagents. *J. Bacteriol* 86: 285-293; 1963.
- 9.—Ouchterlony O. An in vitro test of the toxin producing capacity of *Corynebacterium diphtheriae* *The Lancet* 1: 346-348; 1949.
- 10.—Parson E.I. Frobisher M. Moore and Aiken. Rapid virulence test in diagnosis of diphtheriae. *Proc. Soc. Biol and Med.* 88: 368-370; 1955.
- 11.—Topley and W. Principles of Bacteriology and Immunity. Wilson and Miller Baltimore. The William and Wilken Co. Baltimore 5 ed. II: 1668-1705; 1964.
- 12.—Whitaker J.A. Nelson J.D. and Fink C.W. The fluorescent antitoxin test for the immediate diagnosis of diphtheriae *Pediatrics* 27: 214-218; 1961.