

Efecto citopatogénico de la exotoxina diftérica en cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo.

*Emelina Teruel-López**, *Ricardo Cárdenas-Cedeño***, *Liliana Avila****, *Belkis Ramos***

* Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. ** Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. *** Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras claves: citopatogenicidad, *C. diphtheriae*, exotoxina.

Resumen. Se estudiaron 150 cepas de *Corynebacterium diphtheriae* obtenidas de pacientes con clínica de difteria y de portadores sanos. De las mismas 136 (90,67%) pertenecían al biotipo mitis, 12 (8,00%) y 2 (1,33%) a los biotipos *gravis* e *intermedius* respectivamente. Se determinó la toxigenicidad por los métodos tradicionales *in vivo* empleando conejos machos blancos e *in vitro* por la metodología de inmunodifusión en placas conteniendo medio de K.L. virulencia. De las 136 cepas del biotipo mitis, 130 (95,58%) demostraron toxigenicidad positiva por ambos métodos; 11 (91,66%) del biotipo *gravis* y las 2 (100%) del biotipo *intermedius* igualmente dieron toxigenicidad por los dos métodos empleados. Se determinó también citotoxigenicidad en cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo, los resultados obtenidos con esta metodología dieron citotoxicidad positiva en 132 (97,05%) de las cepas agrupadas en el biotipo mitis, las 12 (100%) del biotipo *gravis* y las 2 (100%) del biotipo *intermedius*. Estos resultados indicaron que la citotoxicidad parece ser un método más sensible para la detección de la producción de exotoxina diftérica.

Recibido: 10-05-90. Aceptado: 07-04-92.

INTRODUCCION

Los primeros estudios realizados por Schubert y col. (31) en 1968,

para observar el efecto citopatogénico de la exotoxina diftérica, sobre cultivos celulares de riñón de mono y de conejos, demostraron a las 72 horas un resultado positivo a la ac-

ción de la toxina bacteriana. Esto sirvió para orientar las investigaciones de toxinas bacterianas empleando cultivos celulares, por lo que en 1973 Laird y col (19) continuaron con otra línea celular, HeLa, el estudio de la toxina diftérica empleando agar en el medio y observando la formación de placas en el cultivo. Luego en 1976 Moeherin y col. (29) utilizaron dos líneas celulares de origen humano y de otras especies de mamíferos a fin de comparar la sensibilidad y resistencia a la toxina (3). Los estudios demostraron que con el uso de agar sobre el cultivo celular se podían obtener resultados con mayor rapidez y sensibilidad que las pruebas tradicionales de toxicogenicidad in vivo, empleando cobayos o conejos y la de inmunodifusión en placas de K.L.-virulencia.

En nuestra región la identificación por laboratorio de la producción de exotoxina por el *Corynebacterium diphtheriae*, se realiza por inmunodifusión en placas de K.L.-virulencia, y en conejos, para observar in vivo el efecto de la exotoxina, obteniéndose resultados en un tiempo relativamente largo, 7 días (6-11, 15, 18).

El costo y mantenimiento de estas pruebas supera a aquellas que pueda originar la determinación de la toxina en cultivos celulares; por lo que se requiere un estudio de muestras obtenidas en la región con el propósito de establecer el uso de cultivos celulares como herramientas de diagnóstico de mayor rapidez y sensibilidad, así como de menor costo.

En el Zulia, región fronteriza, existe un elevado número de aislamientos de *C. diphtheriae* de muestras tomadas a pacientes que acuden

por emergencia a los diferentes hospitales de la ciudad que requieren un diagnóstico e identificación precisa entre especies toxigénicas y no toxigénicas (20-28). La identificación también es necesaria para determinar la prevalencia de portadores sanos que vayan a diseminar el germen en la población susceptible (9).

Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio en cepas aisladas de pacientes con clínica de faringoamigdalitis, con fiebre alta y riesgo de toxemia puesto que la difusión de la toxina con daño a corazón, glándulas suprarrenales, hígado, bazo o cerebro son de gran importancia, revistiendo estas secuelas mayor dramatismo por ser una enfermedad de gran prevalencia en niños. Así, con esta metodología, se podría identificar con mayor rapidez (4 días), si el *C. diphtheriae* aislado es poseedor o no de la exotoxina y reportarla al médico tratante para un mejor seguimiento del funcionamiento de los órganos del paciente, que pudiesen haber sido afectados (6-11, 33).

En base a lo expuesto, se supone que en otras células debería producirse un efecto similar. Como existen estudios realizados utilizando fibroblastos de embrión de pollo, y por ser éste de fácil obtención en nuestro medio, se debe investigar con este tipo de células, para ver su susceptibilidad a la exotoxina diftérica.

Puede ser también de gran utilidad el uso de fibroblastos de embrión de pollo en la determinación de citotoxicidad en otras especies bacterianas diferentes al *C. diphtheriae* (1, 4, 5, 12, 14, 16, 17, 33).

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Se tomaron muestras de exudado faríngeo a pacientes que acudieron a consulta con clínica compatible de difteria, durante los meses de Enero de 1987 hasta Diciembre 1987, para la investigación de *C. diphtheriae*.

Para el despistaje de los portadores sanos se obtuvieron las siguientes muestras:

1. Familiares y relacionados con el paciente.
2. Personas que acudieron a los Laboratorios de Bacteriología con el fin de obtener permiso, de acuerdo con su campo de trabajo (Educadores, Expendedores y Distribuidores de Alimentos y Personal que labora a todos los niveles en el campo de la salud).

Aislamiento e identificación de biotipos: La muestra de exudado nasofaríngeo fue inoculada inmediatamente en medio de Loeffler e incubada a 37 ° C durante seis a dieciocho horas. Transcurrido este tiempo del crecimiento en el medio, se practicaron extendidos para coloración de Gram y de Azul de Metileno de Loeffler. Si la morfología y afinidad tintorial era representativa del Género *Corynebacterium*, se procedía a la identificación de los biotipos de *C. diphtheriae* de acuerdo a la metodología descrita por Cárdenas y col. (7-10).

Toxigenicidad: Se determinó la toxigenicidad de las cepas in vitro e in vivo. Para detectar la producción

de toxinas in vitro se utilizó la metodología de inmunodifusión originalmente descrita por Eleck (15) con la modificación de Hermann y col. (18). El método empleado fue K.L.-virulencia con el enriquecimiento K.L. incorporado. Una tira de papel filtro conteniendo 500 U de antitoxinas diftéricas se sumergió en el seno del agar en el momento de su preparación. La placa, después de solidificado el agar, fue secada colocándola con la tapa abierta a 37°C, utilizándose inmediatamente. Para la inoculación de la placa se empleó un cultivo puro de 24 horas en caldo soya tripticasa (C.S.T.) y la siembra se realizó mediante trazado perpendicular a la tira con antitoxina. Un máximo de cuatro cepas fueron estudiadas con una misma placa. Se incluyó un control positivo (cepa toxigénica de *C. diphtheriae* A-102) obtenida del Instituto Pasteur de Paris y un control negativo (cepa no toxigénica).

Para la prueba in vivo, se emplearon conejos blancos, siguiéndose la metodología descrita por Hermann y col. (18) con ligeras variantes. Se preparó el conejo afeitándole el pelo de la espalda lo más corto posible. Se marcaron cuadrantes en la región afeitada, los cuales fueron utilizados para inocular las muestras respectivas. El material inoculado se tomó de una suspensión bacteriana pura y se inyectaron 0.1 ml por vía intradérmica en el dorso previamente rasurado del animal. Se dejó transcurrir cuatro a seis horas para inyectar 500 U. de antitoxinas diftéricas por vía endovenosa (vena marginal de la oreja); inmediatamente, en el cuadrante opuesto al utilizado anteriormente,

se inyectó intradérmicamente 0.2 ml. del cultivo ya empleado.

Citotoxicidad: Para la determinación del efecto citopatogénico de las cepas de *C. diphtheriae*, se utilizaron cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo de ocho a nueve días de edad, siguiendo la metodología de Schmidt (30). La concentración celular se ajustó a 1×10^6 células/ml y se distribuyó en frascos plásticos (Corning) de 25 cm². Al estar la monocapa celular confluyente en un 85 a 90%, se lavó con solución salina fosfatada (S.S.F.), y se añadió el agar disuelto en el medio de cultivo con o sin antitoxina diftérica, sobre la monocapa celular, inoculando hasta 4 cepas en una misma botella, utilizando asa de platino (19). Se incubó durante 16 a 24 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo se añadieron 5 ml de formalina y se procedió a colorear por un minuto con 1% cristal violeta en 20% de etanol para realizar el conteo de placas (2).

RESULTADOS

En la Tabla I se puede apreciar el número de cepas estudiadas y su clasificación en biotipos. De las 150 cepas, 136 (90,67%) pertenecen al biotipo mitis, 12 (8,00%) se ubican

dentro del biotipo gravis y 2 (1,33%) en el biotipo intermedius, siendo clasificado de acuerdo a sus características tanto de morfología celular, morfología colonial, hemólisis en agar sangre humana (A.S.H.), como estudios bioquímicos: fermentación de carbohidratos (glucosa, maltosa, sucrosa, almidón, glucógeno y dextrina); hidrólisis de la úrea, reducción de los nitratos; motilidad, producción de catalasa y formación de película de caldo soya tripticasa (C.S.T.).

En la Tabla II pueden observarse los resultados obtenidos con ambas pruebas. La toxigenicidad in vitro empleando el medio de K.L.-virulencia e in vivo utilizando conejos machos blancos, permitió demostrar la exotoxina en 130 cepas (95,58%) del biotipo mitis, en 11 cepas (91,66%) del biotipo gravis y en las 2 cepas (100%) del biotipo intermedius.

El efecto citopatogénico de la exotoxina diftérica de las cepas en estudio, produjo una destrucción parcial o total de la monocapa de fibroblastos de embrión de pollo en un área aproximada de 0.5 a 1 cm de diámetro en el sitio de la inoculación del *C. diphtheriae*; dichas placas eran únicas para cada cepa de *C. diphtheriae* investigada que presentara la exotoxina.

TABLA I
CLASIFICACION DE BIOTIPOS DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

BIOTIPO	No. DE CEPAS	%
Mitis	136	90,67
Gravis	12	8,00
Intermedius	2	1,33
TOTAL	150	100,00

TABLA II
COMPARACION DE LA TOXIGENICIDAD IN VIVO E IN VITRO Y
CITOTOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES DE FIBROBLASTOS DE
EMBRION DE POLLO DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Biotipo	No. de cepas	Toxigenicidad		Citotoxicidad
		In vivo	In vitro	
Mitis	136	130 (95,58%)	130 (95,58%)	132 (97,05%)
Gravis	12	11 (91,66%)	11 (91,66%)	12 (100,00%)
Intermedius	2	2 (100,0%)	2 (100,0%)	2 (100,00%)

DISCUSION

De las 136 cepas del biotipo mitis, 132 (97,05%) dieron positividad en los cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo, igualmente las 12 (100%) del biotipo gravis y las 2 (100%) pertenecientes al biotipo intermedius resultaron también positivas en la investigación de la citotoxicidad en los cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo.

En las botellas en las cuales se colocó antitoxina diftérica como control, no se observó ninguna manifestación del efecto citopatogénico en los sitios donde se inocularon las cepas de *C. diphtheriae*.

Las 4 (2,94%) cepas de *C. diphtheriae* pertenecientes al biotipo mitis, no productoras de exotoxina diftérica, dieron un resultado igual al obtenido en las botellas donde se utilizó antitoxina diftérica como control.

A las cepas que resultaron no toxigénicas con los métodos in vivo e in vitro, y presentaron efecto citopatogénico, se les evaluó nuevamente el efecto citopatogénico con un resultado igual al anteriormente obtenido.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en lo referente a la identificación bacteriológica de las cepas de los diferentes biotipos de *C. diphtheriae* concuerdan con otros realizados en nuestro medio, manteniéndose el predominio del biotipo mitis en elevado porcentaje (90,67%), seguido por porcentajes mucho menores de los biotipos gravis (8,99%) e intermedius (1,33%) (7-10).

La detección de la toxigenicidad de las mismas por los métodos in vivo e in vitro, dieron una concordancia altamente satisfactoria, dado el hecho que aquellas que presentaban toxigenicidad positiva por los métodos internacionalmente usados de rutina para tal fin, presentan también citotoxicidad positiva en los cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo en una correlación del 100%.

De las 136 cepas pertenecientes al biotipo mitis, 6 que fallaron en mostrar toxigenicidad in vivo e in vitro, 2 de las mismas fueron exitosas en producir citotoxicidad; lo mismo se observó con una cepa del biotipo gravis de las 12 aisladas, la cual falló en producir toxigenicidad in vivo e in

vitro, pero demostró citotoxicidad en los cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo.

La evidencia anteriormente expresada lleva a pensar que la demostración de citotoxicidad es un método más sensible para la de detección de la producción de la exotoxina diftérica.

Interesante es el hecho que los resultados logrados con el empleo de cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo, fueron similares a los obtenidos por otros autores (19, 29, 31), con el uso de otras líneas celulares. Otro aporte positivo del mismo es el abrir un camino con el uso de cultivos celulares de fibroblastos de embrión de pollo en la detección de la citotoxicidad como herramienta de diagnóstico en otras especies bacterianas, por ejemplo para diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae y Vibrionaceae.

ABSTRACT

Cytopathogenic effect of diphtheriae exotoxin in chicken embryo fibroblast culture. Teruel-López, E. (Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela), Cárdenas R., Avila L., Ramos B. *Invest Clín* 33(1): 5 - 12, 1992.

One hundred fifty strains of *Corynebacterium diphtheriae* were studied from patients with symptoms of diphtheria and from healthy persons. 136 strains (90.67%) belonged to the mitis biotype, 12 (8.0%) and 2 (1.33%) to gravis and intermedius biotypes respectively. Toxicogenicity was determined by traditional

in vivo methods with rabbits and plaque immunodiffusion in KL-virulence medium. From the 136 mitis biotype strains studied, 130 (95.58%) showed positive toxicogenicity by both methods and 11 strains (91.66%) from gravis biotype and 2 (100%) of intermedius biotype gave same results. The cellular cytotoxicity of the diphtheriae toxin was tested on culture of chicken embryo fibroblast and were positive in 132 (97.05%) strains of mitis biotype, and in all strains of gravis and intermedius biotypes. These results suggest that the cytotoxicity test seems to be a more sensitive method for detecting diphtheriae toxin production.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ANNAPURNA E., SANYAL S.: Enterotoxicity of *Aeromonas hydrophyla*. *J Med Microbiol* 10:317-323, 1977.
- 2- BERGOLD G., MAZZALI R.: Plaque formation by Arboviruses. *J Gen Virol* 2:273-284, 1986.
- 3- BONAVENTREP., SAELINGER C., WOSCINSKI C., AMORINI M.: Interaction of cultured mammalian cells with (125I) diphtheria toxin. *Inf Immun* 11:675-684, 1975.
- 4- BURKE V., ROBINSON J., ATKINSON M., GRACEY M.: Biochemical characteristics of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* 15:48-53, 1982.
- 5- BURKE V., ROBINSON J., BEAMAN J., GRACEY M., LESMANA M., ROCKHILL R., ECHEVERRIA P., JANDA M.: Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* 18:1196-1203, 1983.

- 6- BURROWS W.: *Corynebacterium* (Bacilo diftérico). Tratado de Microbiología. 563-620, 1974.
- 7- CARDENAS R., PRIETO G.: Estudio de las características bioquímicas y toxigénicas de 38 cepas de *Corynebacterium diphtheriae*. Invest Clin 34:44-51, 1970.
- 8- CARDENAS R., PRIETO G., VARGAS J., MARTINEZ A.: *Corynebacterium diphtheriae*. Características de cepas aisladas recientemente en Maracaibo-Venezuela. Kasmera 4(2):185-198, 1972.
- 9- CARDENAS R.: El estado de portador sano en difteria. Estado bacteriológico y de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Ensayos de esquemas terapéuticos. Rev Fac Med (Maracaibo) 7(1-4):2974-2985, 1975.
- 10- CARDENAS R.: Biotipos de *Corynebacterium diphtheriae*. Características incluyendo resistencia a los agentes antimicrobianos. Rev Fac Med (Maracaibo) 17(1-4):183-199, 1985.
- 11- COYLE M., HOLLIS D., GROMAN N.: Corinebacterias y otros organismos corineformes. En Manual de Microbiología Clínica. p. 193-204. 4a Ed. Lennette, Ballows, Housler y Shadomy, eds. 1987.
- 12- CUMBERBATCH N.L.; GURWITH M., LANSTON C., SACK R., BRUNTAN J.: Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. Inf Immun 23:829-837, 1979.
- 13- DEAN A., CHING Y., WILLIAMS R., HARDEN L.: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. J Infect Dis 125:407-411, 1972.
- 14- DONTA S., HADDOW A.: Cytotoxic activity of *Aeromonas hydrophila*. Inf Immun 21:989-993, 1978.
- 15- ELEK S.: The recognition of toxigenic strains in vitro. Brit Med J 1:493:498, 1948.
- 16- FIGURA N.; MARRIL-VERDIANI S.; CECCHERINI C.; BARBERI A.: Prevalence species differentiation and toxigenicity of *Aeromonas* strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. J Clin Microbiol 23:595-599, 1986.
- 17- GABLIKS J.; SOLOTOROVSKY M.: Cell culture reactivity to diphtheriae, *Staphylococcus*, tetanus and *Escherichia coli* toxins. J Immunol 88:505-512, 1962.
- 18- HERMANN G.; MOORE M.; PARSONS E.: A substitute for serum in the diphtheriae in vitro toxigenicity test. Am J Clin Pathol 29:181-183, 1958.
- 19- LAIRD W.; GROMAN N.: Rapid, Direct Tissue Culture test for Toxigenicity of *Corynebacterium diphtheriae*. Appl Microbiol 25:709-712, 1973.
- 20- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:340-341, 1969.
- 21- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:370-371, 1970.
- 22- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:420-421, 1971.
- 23- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:418-419, 1972.
- 24- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:422-423, 1973.
- 25- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:462-463, 1974.
- 26- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:456-457, 1976.
- 27- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epide-

- miología y Estadística Vital. 2:484-485, 1977.
- 28- MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL. Anuario de Epidemiología y Estadística Vital. 2:535-536, 1978.
- 29- MOEHRING J.; MOEHRING T.: Comparison of Diphtheria intoxication in human and non-human cell lines and their resistant variants. *Inf Immun* 13:221-228, 1976.
- 30- SCHMIDT N.: Tissue culture techniques for diagnostic virology (Chapter 3). In *Diagnostic Procedures for viral and Rickettsial infections*. pag 47-49 Lennette E.H., Schmidt N.J., eds Amer Health Association, Inc. 1969.
- 31- SCHUBERT D.M.; BECKMAN S.C.; WIGGINS G.L.: Tissue culture method for toxigenicity testing of *Corynebacterium diphtheriae*. *Appl Microbiol* 16:1748-1752, 1968.
- 32- TURNBULL P.; LEE J.; MITIOTIS M.; VAN DER WALLE S.; KNOORNHOF H.; JEFFETRY L.; BRYANT T.: Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *J Clin Microbiol* 19:175-179, 1984.
- 33- YOUMAN S.G.; PATERSON P.; SOMMERS H.: *Diphtheriae. The Biologic and Clinical Basis of Infectious Diseases*. p. 233 Ed. Saunders Co. Philadelphia, 1973.