



DOI: <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v7i2.1908>

Ciencias de la salud
Artículo de revisión

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

Culture sensitivity and specificity and diphtheria toxicity test

Sensibilidade e especificidade da cultura e teste de toxicidade diftérica

Allison Arlette Ramos-Villegas^I
ramos-allison0338@unesum.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-0414-6122>

Patricia Solange Salazar-Nieto^{III}
salazar-patricia6084@unesum.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-4008-9516>

Jesús Alberto Rivera-Tigua^{II}
rivera-jesus6180@unesum.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0002-9027-1773>

Dennys Henry Rodríguez-Parrales^{IV}
dennys.rodriguez@unesum.edu.ec
<https://orcid.org/0000-0003-0843-4658>

Correspondencia: dennys.rodriguez@unesum.edu.ec

***Recibido:** 20 de febrero del 2021 ***Aceptado:** 20 de marzo del 2021 * **Publicado:** 08 de abril del 2021

- I. Estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador.
- II. Estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador.
- III. Estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador.
- IV. Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria, Médico Cirujano, Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador.

Resumen

La difteria es una enfermedad contagiosa, se transmite de persona a persona por el contacto con gotitas de secreciones respiratorias de personas infectadas con el *C. Diphtheriae*, su principal vía de entrada a nuestro cuerpo es por la nariz y la boca, aunque también existen reportes en los cuales indican que pueden introducirse por lesiones en la piel. Entonces, para prevenir se debería realizar la administración de la vacuna combinada de la difteria, el tétanos y la tos ferina (DTP o DTPa) a la población infantil, y la vacuna combinada de la difteria y el tétanos (DT) a la población adulta.

Para diagnosticar la difteria generalmente se realiza en base a los signos y síntomas que produce la enfermedad. Es necesario para la confirmación de un caso de difteria el cultivo de *C. diphtheriae* y pruebas de toxigenicidad para evaluar la producción de toxina diftérica.

Por ello este artículo nos muestra información recopilada de varias fuentes que la difteria es prevenible bajo una vacuna tanto en los niños como en la población adulta. A continuación, se lo explicaremos.

Palabras claves: Difteria; Toxinas; Huésped; Bacilo Grampositivo; Obstrucción Respiratoria.

Abstract

Diphtheria is a contagious disease, it is transmitted from person to person by contact with droplets of respiratory secretions from people infected with *C. Diphtheriae* that its main route of entry into our body is through the nose and mouth, although there are also reports in which they indicate that they can be introduced by skin lesions. Therefore, to prevent, the combined vaccine for diphtheria, tetanus and pertussis (DTP or DTPa) should be administered to the child population, and the combined vaccine for diphtheria and tetanus (DT) to the adult population.

To diagnose diphtheria, it is usually done based on the signs and symptoms that the disease produces. To confirm a case of diphtheria, culture of *C. diphtheriae* and toxigenicity tests are used to evaluate the production of diphtheria toxin.

Therefore, this article shows us information gathered from various sources that diphtheria is preventable under a vaccine in both children and the adult population. We will explain it to you below.

Keywords: Diphtheria; Toxins; Host; Gram-positive Bacillus; Respiratory Obstruction.

Resumo

A difteria é uma doença contagiosa, é transmitida de pessoa a pessoa pelo contato com gotículas de secreções respiratórias de pessoas infectadas com *C. Diphtheriae*, sua principal via de entrada em nosso corpo é pelo nariz e boca, embora também haja relatos nos quais eles indicam que podem ser introduzidos por lesões cutâneas. Portanto, para prevenção, a vacina combinada para difteria, tétano e coqueluche (DTP ou DTPa) deve ser administrada em crianças, e a vacina combinada para difteria e tétano (DT), na população adulta.

Para diagnosticar a difteria, geralmente é feito com base nos sinais e sintomas que a doença produz. A cultura de *C. diphtheriae* e os testes de toxigenicidade são necessários para a confirmação de um caso de difteria para avaliar a produção da toxina diftérica.

Portanto, este artigo nos mostra informações coletadas de várias fontes de que a difteria é evitável com uma vacina em crianças e na população adulta. Explicaremos a você a seguir.

Palavras-chave: Difteria; Toxinas; Convidado; Bacilo Gram-positivo; Obstrução respiratória.

Introducción

Corynebacterium diphtheriae es un bacilo grampositivo y el único huésped es el ser humano, se caracteriza por la producción de pseudomembranas, que pueden causar obstrucción en el tracto respiratorio superior, por sí solas, las toxinas pueden dañar múltiples órganos, como el corazón, los nervios y los riñones (1).

En los países desarrollados se trata de una enfermedad muy rara. Se ha prevenido sistemáticamente durante décadas. En 1995, en la ex Unión Soviética, se notificaron 50.000 casos de difteria. El abandono de la enfermedad dio como resultado 1.500 casos. Entre la población inmunizada, los casos son aislados y se limitan a grupos familiares o comunitarios, pero en muchos países subdesarrollados, esto sigue siendo un problema de salud pública (2).

Todos los niños y niñas deberían estar inmunizados contra la difteria. Se deben recibir 6 dosis en edades de 2 meses, 4 meses, 6 meses, 18 meses, 5 años y 15 años. Eso sienta las bases para adquirir inmunidad vitalicia (3).

Durante el período 2011-2015, India notificó el mayor número total de casos cada año, con un total de 18.350 notificados en los últimos 5 años, seguida de Indonesia y Madagascar con 3.203 y 1.633 casos respectivamente. Durante este período, el sudeste asiático fue la fuente del 55-99% de todos los

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

casos notificados cada año. En 2016 y 2017, se notificaron 7.097 y 8.819 casos en todo el mundo, y este número aumentó a 16.645 en 2018. Sin embargo, la carga real de la enfermedad puede ser mayor que la informada a nivel mundial porque no se informa, especialmente en África y Oriente Medio.

En 2017, se registraron 8.819 casos, que es el número más alto desde 2004. En los últimos cinco años (2013-2017), el promedio anual de casos notificados fue de 5.682, un 37% más que el promedio de los cinco años anteriores (2008-2012). La tendencia a la baja en la incidencia de difteria se ha invertido y la incidencia incluso ha aumentado en los últimos años (4).

El Ecuador no ha desarrollado la capacidad suficiente para hacer frente a estos problemas. Con frecuencia se producen brotes, epidemias y casos de enfermedades infecciosas con alto potencial epidémico. La interrupción de la transmisión de enfermedades es una actividad importante. Por lo tanto, la vigilancia de acciones de alerta temprana es descubrimiento de incidentes, las investigaciones epidemiológicas y la rapidez de respuesta brindan oportunidades. Desde 1995, la Oficina Nacional de Epidemiología (DINE) trabaja arduamente para mejorar el sistema de vigilancia de emergencias de salud. En el 2014, el MSP elaboró el "Manual de especificaciones y procedimientos para los componentes de acción de alerta del Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica" y el recientemente registrado de difteria, es una cepa de difteria no tóxica aislada en Cotopaxi-Zumbahua en 2014 (5).

La difteria es una enfermedad nueva, recurrente y desconocida en la zona; la vigilancia se inició en 2008 y se inició en la provincia de Los Ríos con 10 casos; en Manabí (1 caso), Guayas (4 casos), Santo Domingo Tsáchilas (3 casos) y Pichincha (7 casos), por lo que se incluyen en eventos de salud pública de interés nacional e internacional (6).

La difteria es una enfermedad bacteriana aguda que puede afectar la nasofaringe y causar obstrucción de las vías respiratorias y eventualmente la muerte. Además, su toxicidad general está relacionada con complicaciones de diversos órganos. El uso de antitoxinas diftéricas, el progreso del tratamiento y la inmunización del toxoide diftérico han reducido en gran medida la mortalidad y morbilidad de la difteria. Sin embargo, la vacunación sigue siendo esencial para prevenir enfermedades y evitar epidemias generalizadas, por ejemplo, en países donde se concentran personas susceptibles

La difteria comienza a ocurrir cuando las bacterias ingresan a la mucosa del tracto respiratorio a través de la nariz o la boca, y los síntomas de difteria comienzan, generalmente, de dos a cinco días después de contraer la infección y pueden comprender los siguientes: una membrana gruesa y de color gris

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

que recubre la garganta y las amígdalas, dolor de garganta y ronquera, aumento de tamaño de los ganglios linfáticos del cuello. la enfermedad comienza con anorexia, malestar general, fiebre, escalofríos y dolor de garganta. Después de 1 o 2 días, aparecerá una película blanco-grisácea muy pegajosa en la faringe y las amígdalas, y al intentar separarlas sangrarán fácilmente.

La vacuna contra la difteria es un toxoide bacteriano, es decir es una toxina cuya toxicidad ha sido inactivada. Esta vacuna generalmente se usa en combinación con otras vacunas como la vacuna DTwP / DTaP o la vacuna pentavalente. Para adolescentes y adultos, el toxoide diftérico se usa a menudo en combinación con toxoide tetánico en concentraciones más bajas (7).

La OMS recomienda una vacunación inicial de 3 dosis de la vacuna contra la difteria, en la que se debe administrar la vacuna, seguida de 3 dosis de refuerzo. La serie principal de medicamentos debe iniciarse antes de las 6 semanas de edad, y las dosis posteriores deben separarse dos veces, con al menos 4 semanas de diferencia. Es mejor tomar 3 dosis de refuerzo en el segundo año de vida (12-23 meses), entre las edades de 4-7 y 9-15 años de edad por lo cual debería haber al menos 4 años entre dos dosis de refuerzo.

La difteria cutánea afecta principalmente a la zona expuesta, se manifiesta como lesiones inflamatorias, acompañadas de vesículas, que evolucionan a úlceras crónicas no progresivas definidas, puede ir acompañada de la aparición de membranas viscerales blanquecinas, acompañadas de signos de toxicidad, y puede no ser diferente de otras enfermedades, las enfermedades cutáneas crónicas, como el eccema o la psoriasis, y la gravedad de la difteria dependen de la extensión de la enfermedad y de la propagación de toxinas, que pueden causar complicaciones como miocarditis, polineuropatía y afectación renal (8).

La forma más común es la difteria faríngea, que es fatal debido a la obstrucción de las vías respiratorias y puede extenderse a la laringe y la tráquea. El diagnóstico se basa en las manifestaciones clínicas y el aislamiento de *Clostridium diphtheriae* de membranas o secreciones proximales. El tratamiento se basa en la erradicación de *Clostridium diphtheriae* mediante la administración de antibióticos y neutralización de las toxinas circulantes. La prevención consiste en la correcta inyección de la vacuna contra la difteria (9).

El propósito de la presente investigación es dar a conocer a la Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria.

Desarrollo

La difteria es una enfermedad poco frecuente en los países desarrollados gracias a la vacunación. La vacuna de difteria es usada ampliamente en numerosos países una vez que terminó la Segunda Guerra Mundial, hicieron que la incidencia de la enfermedad cayera rápidamente. En países con menores recursos, la vacunación tardó unos años más en establecerse.

Sin embargo, la difteria sigue siendo endémica en muchas partes del mundo, incluidos países de América Latina, Caribe, Europa del Este, Sudeste de Asia y África (10).

El diagnóstico de la difteria generalmente se realiza en base a los signos y síntomas que produce la enfermedad que permiten definir el caso como probable. Para confirmar un caso de difteria, las pruebas diagnósticas utilizadas incluyen el cultivo de *C. diphtheriae* y pruebas de toxigenicidad para evaluar la producción de toxina diftérica.

El aislamiento de la bacteria por cultivo es esencial para confirmar un caso de difteria ya sea en muestras del propio paciente ó de alguno de sus contactos. Las muestras clínicas para cultivo se toman de la nariz, nasofaringe, garganta o lesiones en la piel y se envían al laboratorio en donde se cultivan con un medio especial que contiene telurito de potasio.

Tras el aislamiento de *C. diphtheriae* se debe determinar la toxigenicidad mediante la prueba de Elek que indica si los microorganismos producen la toxina de la difteria. La producción de esta toxina permite confirmar un caso como la difteria.

El Laboratorio de Referencia de Difteria de los CDC de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Atlanta diseñó y evaluó un método para la detección rápida de toxina diftérica utilizando la prueba TaqMan® PCR, que incluye tecnología de PCR en tiempo real para la detección inmediata de la secuencia del gen de la toxina en muestras clínicas mediante detección cuantitativa. La investigación preliminar ha enfatizado sus ventajas, que incluyen: la sensibilidad de la detección de genes de toxinas por PCR convencional estándar es diez veces mayor que la de la detección de genes de toxinas, eliminando las operaciones de post-amplificación, alto rendimiento y productos de amplificación cuantitativa fáciles, la evaluación adicional puede hacer que el formato de PCR TaqMan® sea una herramienta valiosa, reemplazando el método estándar de detección de genes de toxinas por PCR directamente de materiales clínicos (11).

La sensibilidad y especificidad de las sondas de ADN, en comparación con los cultivos, para pruebas directas son 86-94,8% y 95-100%, respectivamente, los resultados se pueden obtener en

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

aproximadamente 2 horas y se requiere un equipo dedicado para ejecutar los resultados, la ventaja es que la lectura del resultado es objetiva.

En comparación con el cultivo, la sensibilidad y la especificidad de la PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real son del 93% y el 98%, respectivamente, la duración de esta tecnología es de aproximadamente 1,5 horas, requiere equipo especializado y actualmente no se implementa de forma rutinaria en los laboratorios de salud (12).

Aunque comercialmente no hay disponibles otras técnicas para confirmar los casos de difteria, se pueden realizar pruebas utilizando la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en muestras clínicas a confirmar la infección con una cepa potencialmente toxigénica. En este caso, la PCR permite la detección de genes implicados en la producción de la toxina de la difteria, aunque no demuestra la producción de toxina sino sólo la presencia del gen de la toxina de la difteria. Por esto, una prueba positiva por PCR en ausencia de un cultivo positivo no cumple dichos criterios por lo cual se clasifica como caso de difteria confirmado y se dará un resultado como probable. Sin embargo, la PCR es particularmente útil en el caso de que la bacteria *C. diphtheriae* presente en las muestras clínicas sea inviable y por tanto no cultivable, por ejemplo, si el paciente ha comenzado el tratamiento con antibióticos (10).

Medios de cultivo

- Medios de cultivos para la siembra de hisopados y homogeneizados de membrana
- Medio Agar Sangre Cistina Telurito (ASCT).
- Medio Löeffler. Se aconseja para la observación de la morfología bacteriana.
- Agar Sangre.
- Caldo Todd Hewitt con 3 % de sangre.
- El tiempo para el transporte no debe exceder las 24 horas (11).

Siembra de la muestra

- Las muestras clínicas deben ser sembradas sin demora.
- Si el hisopo faríngeo o nasofaríngeo se encuentra deshidratado, colocarlo en un caldo Todd Hewitt con 3% de sangre estéril. Incubar durante 18h y resembrar en un medio ASCT.

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

- Si el hisopo fue enviado en el medio de transporte de Amies y/o si se dispone del homogeneizado de membrana, realizar la siembra en los medios ASCT y agar sangre.
- Incubar los cultivos a 37°C en aerobiosis y microaerofilia (5-10% CO₂).
- Examinar las placas de ASCT y AS a las 18h, 24h, 48h y 72h, *C. diphtheriae* desarrolla colonias negras en el medio de cultivo ASCT.
- Sembrar caldo nitrato, medio úrea, DNasa, y realizar las pruebas de catalasa y la pirazinamidasa a partir de las colonias negras con morfología y microscopía compatibles con *C. diphtheriae* y sembrar de las mismas colonias agar sangre, para realizar la identificación bioquímica de las mismas (11).

Características microscópicas

Coloración de Gram Bacilos pleomórficos Gram positivos, dispuestos en forma de letras chinas y en empalizada, posibles formas cocobacilares, más predominantes en cultivos viejos. Los frotis directos de garganta muestran mucho menos pleomorfismo; los microorganismos son generalmente más cortos y se tiñen más uniformemente que los cultivados.

Características de cultivo

Aspecto de las Colonias

Medio Agar Sangre Cistina Telurito

Corynebacterium diphtheriae reduce el telurito del medio a telurito metálico, el cual precipita y produce el desarrollo de colonias negras, gris acero, de 1 a 3 mm de diámetro.

Medio Agar Sangre

- *C. diphtheriae* var. *intermedius*: más pequeñas, planas, cremosas, transparentes, no hemolíticas.
- *C. diphtheriae* var. *mitis* y *C. diphtheriae* var. *gravis*: más grandes, convexas, débil beta hemólisis.

La sensibilidad de estas pruebas depende de la cantidad de antígeno presente y su especificidad depende de la calidad de los antisueros disponibles para este efecto. Estas pruebas permiten una demostración rápida y son muy prácticas para el diagnóstico, pues los cultivos virales requieren de

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

una infraestructura adecuada y personal entrenado y sólo se pueden realizar en centros de docencia o de investigación. Además, los resultados del cultivo viral requieren por lo menos hasta 8 días (12). Conocida la sensibilidad de una bacteria a determinado antibiótico, la comprobamos repetidas veces después de subcultivos frente a tres concentraciones diferentes, para ver si el grado de sensibilidad determinado por el diámetro de inhibición en milímetros, es constante en iguales condiciones de temperatura y medio de cultivo. (13).

Las cepas de respuesta invariable, fueron seleccionadas para ser posteriormente estandarizadas con antibióticos enviados gentilmente por el FDA de Washington. De esta manera logramos aislar veintisiete cepas, sensibles a unos y resistentes a otros, con las cuales podemos determinar cuantitativamente la potencia, no solamente de los antibióticos aislados o extraídos previamente, sino también de aquellas formas combinadas, utilizando un germen que es sensible a uno y resistente al otro. Conformado así nuestro cepario con bacterias de sensibilidad conocida, estamos en condiciones de poder determinar la potencia antibiótica de cualquier producto que llegue para su control.

Para casos graves existen preparados muy purificados de uso IV, de acción más rápida, pero con un mayor riesgo de provocar una reacción anafiláctica, lo que obliga a la práctica previa de pruebas de sensibilidad al producto (13).

Pruebas de toxicidad para difteria

Difteria es una enfermedad infecciosa bacteriana producida por *Corynebacterium diphtheriae*, es altamente contagiosa, prevenible por vacunas, con importantes complicaciones agudas y alta mortalidad. (14).

Corynebacterium diphtheriae se divide en cuatro biovars: *gravis*, *intermedius*, *mitis* y *belfanti*. La diferenciación bioquímica depende del operador, siendo la caracterización genómica más confiable. Es una especie genéticamente diversa. Especies relacionadas incluyen *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis*, que causan infecciones zoonóticas en humanos.

La producción de toxina (toxigenicidad) ocurre sólo cuando el bacilo la adquiere desde un bacteriófago específico (β -corynefago) por un proceso lisogénico, llevando la información genética de la toxina (gen *tox*). Las cepas toxigénicas son las que causan la enfermedad grave. Las cepas no toxigénicas por definición no contienen el gen *tox*, pero pueden variar en su capacidad de adherirse a

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

la célula hospedera, en su viabilidad intracelular y en su capacidad de estimular citoquinas en el sistema inmune del hospedero, lo cual se traduce en una mayor gravedad de la infección. (15).

Corynebacterium diphtheriae son bacilos Gram positivos aerobios o anaerobios facultativos, inmóviles, no capsulados, no esporulados, generalmente catalasa positivos, que se colorean irregularmente y se disponen en forma de letras chinas. Existen varias especies que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. jeikeium*, *C. amycolatum*, *C. urealyticum*, *C. pseudotuberculosis*) y que pueden producir variadas infecciones en humanos y animales. *C. diphtheriae* es el patógeno más importante para el ser humano, mide de 2 a 6 micras, es pleomórfico, tiene gránulos metacromáticos y puede o no producir toxina, dependiendo de su infección por un bacteriófago y de la concentración de hierro en el medio. La toxina diftérica es un polipéptido de 63 000 kd que produce la muerte celular por inhibición de la síntesis proteica, siendo responsable de las manifestaciones locales y sistémicas de la enfermedad, aunque hay cepas no toxigénicas que producen lesiones similares pero más benignas.

Diagnostico

El rol del laboratorio es clave, proporcionando métodos sencillos, rápidos y confiables para asistir al clínico en logro de un diagnóstico correcto. El laboratorio también es importante en el descarte de casos sospechosos o contactos, evitando de esta manera tratamientos innecesarios o medidas de control sanitario como el aislamiento.

Todos pueden portar el gen de la toxina diftérica, que se introduce en las cepas de *C. diphtheriae* mediante un fago lisogénico. Todos los tipos producen la misma toxina con diferencias más cuantitativas que cualitativas. El *C. diphtheriae* resiste bien la desecación y las bajas temperaturas, mientras que resiste poco la luz solar directa.

Recolección de la muestra

La muestra debe tomarse antes de iniciar el tratamiento debido a la sensibilidad de *C. diphtheriae* a la penicilina y eritromicina.

Tipo de muestras

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

Para el diagnóstico etiológico de la enfermedad respiratoria se requieren muestras de hisopados faríngeo, nasofaríngeo y/o trozos de membrana.

Si se sospecha de difteria cutánea las muestras deben ser de piel, garganta y nasofaríngeo.

Aspectos microbiológicos

Toma de muestra

Los hisopos utilizados para la toma de muestra son los habituales: hisopos estériles con punta de algodón, dacron o alginato de calcio.

En los casos de investigación molecular (PCR) se deben utilizar hisopos de dacrón o poliéster.

Hisopado faríngeo

- La faringe debe estar claramente visible y bien iluminada
- Deprimir la base de la lengua con baja lengua e hisopar la garganta, sin tocar saliva ni mucosas laterales.
- Frotar vigorosamente cualquier membrana, o área inflamada presionando ligeramente con el hisopo y ejerciendo movimiento de rotación.
- Si existe alguna membrana, levantar el borde e hisopar por debajo de la misma, para acceder a los microorganismos diftéricos localizados en la profundidad. Se recomienda enviar un trozo de membrana.
- Realizar extendidos en dos láminas portaobjetos, dejar secar al aire y fijar por calor.
- Remitir la muestra al laboratorio junto con las dos láminas portaobjetos y la orden de recolección de datos.

Hisopado nasofaríngeo

- Insertar el hisopo flexible de alambre de cromo o acero inoxidable en la nariz, a través del orificio nasal, más allá de la parte anterior de la narina.
- Introducir suavemente el hisopo en la nariz hasta encontrar resistencia, rotar el hisopo sobre la mucosa nasal.
- Realizar extendidos en dos láminas portaobjetos, dejar secar al aire y fijar por calor. Realizar la coloración de Gram y coloración de azul de metileno de Loeffler.

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

Muestra cutánea

- Limpiar con solución salina estéril y remover el material adherido a la lesión
- Presionar el hisopo de manera firme dentro de la misma.

Medios de cultivo

- Medios de cultivos para la siembra de hisopados y homogeneizados de membrana
- Medio Agar Sangre Cistina Telurito (ASCT).
- Medio Löeffler. Se aconseja para la observación de la morfología bacteriana.
- Agar Sangre.
- Caldo Todd Hewitt con 3 % de sangre.
- El tiempo para el transporte no debe exceder las 24 horas.

Siembra de la muestra

- Las muestras clínicas deben ser sembradas sin demora.
- Si el hisopo faríngeo o nasofaríngeo se encuentra deshidratado, colocarlo en un caldo Todd Hewitt con 3% de sangre estéril. Incubar durante 18h y resembrar en un medio ASCT.
- Si el hisopo fue enviado en el medio de transporte de Amies y/o si se dispone del homogeneizado de membrana, realizar la siembra en los medios ASCT y agar sangre.
- Incubar los cultivos a 37°C en aerobiosis y microaerofilia (5-10% CO₂).
- Examinar las placas de ASCT y AS a las 18h, 24h, 48h y 72h, *C. diphtheriae* desarrolla colonias negras en el medio de cultivo ASCT.
- Sembrar caldo nitrato, medio úrea, DNasa, y realizar las pruebas de catalasa y la pirazinamidas a partir de las colonias negras con morfología y microscopía compatibles con *C. diphtheriae* y sembrar de las mismas colonias agar sangre, para realizar la identificación bioquímica de las mismas.

Características microscópicas

Coloración de Gram Bacilos pleomórficos Gram positivos, dispuestos en forma de letras chinas y en empalizada, posibles formas cocobacilares, más predominantes en cultivos viejos. Los frotis directos

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

de garganta muestran mucho menos pleomorfismo; los microorganismos son generalmente más cortos y se tiñen más uniformemente que los cultivados.

Características de cultivo

Aspecto de las Colonias

Medio Agar Sangre Cistina Telurito

Corynebacterium diphtheriae reduce el telurito del medio a telurito metálico, el cual precipita y produce el desarrollo de colonias negras, gris acero, de 1 a 3 mm de diámetro.

Medio Agar Sangre

- *C. diphtheriae* var. *intermedius*: más pequeñas, planas, cremosas, transparentes, no hemolíticas.
- *C. diphtheriae* var. *mitis* y *C. diphtheriae* var. *gravis*: más grandes, convexas, débil beta hemólisis.

Prueba de toxigenicidad

Método de inmunoprecipitación de Elek

La confirmación de la patogenicidad de una cepa de *C. diphtheriae* requiere la demostración de su capacidad para producir toxina.

La prueba de inmunoprecipitación de Elek, es el método más utilizado.

Otros métodos de detección de toxina

Otros métodos que se utilizan para la detección de cepas toxigénicas son: western blotting, dot blotting y ELISA. Sin embargo, estos métodos aunque sensibles, son laboriosos y consumen mucho tiempo, por lo que no son recomendados para la rutina.

Prueba de detección de toxina in-vivo

La prueba consiste en inocular conejos o cobayos por vía subcutánea con una suspensión bacteriana.

Los animales son previamente protegidos con 200 unidades de antitoxina diftérica.

Prueba de detección de toxina in-vitro

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

Se observa el efecto de la toxina en línea de cultivo de células VERO.

Detección de la toxina diftérica mediante PCR

Método rápido, sencillo y fácil de interpretar. Este método no demuestra si la toxina diftérica se puede expresar de forma funcional. Es importante tener presente que alrededor de un 3% de los aislados de *C. diphtheriae* portan el gen de la toxina pero no la expresan. Se recomienda procesar de manera paralela el test de Elek (16).

Prevención

Hoy en día la forma más efectiva de control es la de mantener el más alto nivel de vacunación en la comunidad.

También se puede prevenir cuando la persona infectada se cubre la boca con un pañuelo desechable cuando va a toser y se lava las manos después de toser. Esta enfermedad es muy contagiosa por lo que es recomendable vacunarse.

Pero el método más efectivo de controlar los índices de esta enfermedad es la vacuna la cual está compuesta de toxoide, que es una forma debilitada de la toxina de la difteria, esto estimula al sistema inmune para hacer anticuerpos contra la toxina de la difteria y de este modo protege contra la enfermedad. (17)

Prevención primaria

- La inmunización universal con el toxoide es la medida más eficaz.
- En la infancia se realiza con la vacuna combinada con toxoide tetánico y vacuna pertusis.
- Esta inmunización en la infancia requiere de 5 dosis: – 2,4,6, 12-18 meses y 4-6 años de edad
- También existen vacunas combinadas con otros componentes: – VHB, polio inactivado y H. influenza tipo b.
- Niños de 7 o más años, que no han completado sus dosis deberían recibir un refuerzo con Tdap
- Adolescentes y adultos que nunca fueron vacunados deben recibir una serie primaria de 3 dosis con Td (0, 4 sem , 6-12 meses).
- Los viajeros a aéreas endémicas deben tener una serie primaria completa. Incluyendo un booster. (18)

Tratamiento

Los pacientes sintomáticos con difteria respiratoria deben ser internados en una unidad de cuidados intensivos para controlar la aparición de complicaciones respiratorias y cardíacas. Es necesario el aislamiento con precauciones respiratorias y de contacto, y debe mantenerse hasta que 2 cultivos, obtenidos 24 y 48 horas después de la finalización del tratamiento con antibióticos, arrojen resultados negativos.

Antitoxina diftérica

La antitoxina diftérica debe administrarse sin esperar la confirmación por cultivo, ya que sólo neutraliza a la toxina que no está unida a las células. El uso de antitoxina para la enfermedad cutánea, sin evidencias de enfermedad respiratoria, es cuestionable debido a que raramente se han informado secuelas tóxicas en la difteria cutánea; sin embargo, algunos expertos la recomiendan. En los Estados Unidos, la antitoxina debe obtenerse de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) a través del Centro de Operaciones de Emergencias de los CDC 770-488-7100 (véase también la información de los CDC respecto de la disponibilidad de antitoxina).

Advertencia: la antitoxina diftérica se obtiene de caballos; por lo tanto, siempre antes de administrarla debe realizarse una prueba para descartar la sensibilidad cutánea o conjuntival. La dosis de antitoxina, que va desde 20.000 hasta 100.000 unidades IM o IV, se determina por lo siguiente:

Sitio y gravedad de los síntomas

Duración de la enfermedad

Complicaciones

Si se produce una reacción alérgica, debe inyectarse inmediatamente 0,3 a 1 mL de adrenalina 1:1.000 (0,01 mL/kg) por vía subcutánea, IM, o IV lenta. La administración IV de antitoxina está contraindicada en pacientes que son muy alérgicos a ella.

Antibióticos

Los antibióticos son necesarios para erradicar el microorganismo y prevenir la diseminación; no sustituyen a la antitoxina.

Los pacientes pueden recibir cualquiera de los siguientes:

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

Eritromicina 10 mg/kg por vía oral o inyectable cada 6 horas (máximo 2 g/día) durante 14 días

Penicilina G procaína IM (300.000 unidades cada 12 horas para aquellos con un peso \leq 10 kg y 600.000 unidades cada 12 horas para las personas con peso $>$ 10 kg) durante 14 días

Cuando los pacientes son capaces de tolerar los medicamentos orales, el tratamiento debe cambiarse por penicilina 250 mg orales, 4 veces al día, o eritromicina 500 mg (10 mg/kg para los niños) por vía oral cada 6 horas, por un total de 14 días de tratamiento.

La vancomicina o la linezolida se pueden usar si se detecta resistencia a los antibióticos. La eliminación del microorganismo se documenta con 2 cultivos negativos consecutivos de muestras de la garganta o de la nasofaringe, realizados 1 a 2 días después y luego 2 semanas después de finalizado el tratamiento con antibiótico.

Otros tratamientos

Para la difteria cutánea, se recomiendan el lavado concienzudo de las lesiones con agua y jabón, y la administración de antibióticos sistémicos durante 10 días.

La vacunación es necesaria después de la recuperación de los pacientes con difteria, ya que la infección no garantiza que se adquiera inmunidad.

La recuperación de la difteria grave es lenta, y debe recomendarse a los pacientes que no retomen sus actividades habituales demasiado rápidamente. Incluso el esfuerzo físico normal puede afectar en forma negativa al paciente que se recupera de una miocarditis (19).

Pronóstico

La recuperación de la difteria es un proceso lento que requiere varias semanas de hospitalización, pero en la mayoría de los casos se puede lograr con éxito. Los casos más graves de infección que llega al corazón suelen provocar la muerte y el pronóstico es el siguiente:

- En la forma clínica del tracto respiratorio, la tasa de letalidad es inferior al 5% (anteriormente, el 30%).
- En el brote ruso de la década de 1990, la tasa de mortalidad fue del 2-3%.
- El desarrollo de neuropatía: la tasa de mortalidad es del 16%.

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

- Por lo general, la recuperación de la miocarditis puede completarse, pero es posible que aún exista la arritmia.
- El daño al sistema nervioso generalmente permite que el paciente se recupere por completo.
- El pronóstico para los niños pequeños y los ancianos es malo.
- Las personas que están vacunadas tienen un mejor pronóstico.
- El momento de la administración de la antitoxina es fundamental para el curso y el pronóstico de la enfermedad (20).

Resultados

Según Ángela Álvarez afirma que: Alemania, Francia y Letonia son los países europeos con mayor incidencia de difteria en los últimos años. Entre 1980 y 2007, la combinación de toxoide diftérico, tétanos y fragmentos descelularizados de células B aumentó la cobertura mundial en más del 70% y el número de casos de difteria disminuyó en un 90%. Durante este período, los casos mundiales de difteria aumentaron de 97,774 casos Reducido a 4.273 casos. Entre 1990 y 1998, se produjeron brotes a gran escala en algunos países de la Federación de Rusia, con más de 157.000 casos y 5.000 defunciones. La mayoría de los países industrializados siguieron teniendo casos esporádicos y brotes limitados.

En países con baja cobertura del PAI y tasas de vacunación inferiores al 60-70%, especialmente en África subsahariana y Asia, la difteria sigue siendo un problema importante de salud infantil, como Pakistán, India o Madagascar y otros países con tres dosis Alrededor del 60% de vacunas, por lo que registran el mayor número de casos de difteria en el mundo. Entre los países con altas tasas de vacunación, los países con una tasa de cobertura de más del 90% con tres dosis de vacunación, como Estados Unidos o Canadá, tienen una tasa de incidencia de menos de 0,1 por 105 residentes, la tasa de vacunación está por encima del 90% dentro del rango (21)

Según los Autores J Caldera¹, M Carballo¹ y J Martínez¹ mencionan que: En España, la difteria se ha convertido en una enfermedad de notificación obligatoria desde 1904, y la vacuna se ha incluido en el primer calendario de vacunación español implantado en 1975. Desde entonces, la única modificación que se ha realizado en cuanto al calendario de vacunación es en 2016, con el fin de para alinearlo con las recomendaciones europeas, implantación de 2 dosis de vacuna más dosis de refuerzo de la vacuna. Después de las 3 dosis iniciales de la serie de vacunas de toxoide diftérico, casi todos

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

los lactantes tienen una concentración de anticuerpos protectores del 95%, pero es necesaria una dosis de refuerzo. Administrado para mantener la inmunidad protectora, porque el período de protección después de la vacunación inicial es de aproximadamente 10 años (22).

Tabla 1: Muestra la prevalencia de la difteria en algunos países de América latina (23)

Difteria			
	Año	Casos sospechosos	Casos confirmados
Brasil	2017	42	5
Haití	2014	410	75
Venezuela	2016	1.602	976

Análisis: En la tabla 1 se puede observar como existe una prevalencia de casos de difteria con mayor índice en la ciudad de Venezuela.

Tabla 2: Factores de riesgo identificados de casos de difteria y cepas de *Corynebacterium diphtheriae* no toxigénicas portadoras de toxinas, Reino Unido, 2009-2017 (n = 43)

Grupo de riesgo	NTTB	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> toxigénico	<i>Corynebacterium ulcerans</i> toxigénico
Contacto con animales	0	0	15
Contacto de caso	0	1	0
Condición de la piel subyacente	5	0	0
Viaje	0	14	0
Ninguno conocido	5	3	0

Análisis: En la tabla 2 se evidencia que el grupo de riesgo es de viaje para los casos con *Corynebacterium diphtheriae* toxigenico y para *Corynebacterium ulcerans* toxigenico el grupo de riesgo es aquellos que tienen contacto con animales.

Tabla 3: Porcentaje de individuos con respuesta de antígenos pertussis, un mes después de la vacunación según status serológico pre-vacuna. (25)

Anticuerpo	Estado pre-vacuna	Adultos		Niños	
		Sujetos (n)	Respondedores a vacuna (%)	Sujetos (n)	Respondedores a vacuna (%)
Anti-PT	S+	30	96,7	38	97,4
	S-	30	100	18	100
Anti-FHA	S+	59	100	52	100
	S-	1	100	2	100
Anti-PRN	S+	51	100	47	97,9
	S-	9	100	9	100

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

Análisis: El porcentaje de individuos con anti-PT es de 30 individuos, y con anti-FHA es de 59 individuos, y con anti-PRN es de 51.

Tabla 4: Estimaciones de precisión y exactitud del ensayo MIA para DT y TT: Intraensayo (con el mismo lote de microesferas y analista-1) y variación entre ensayos (día diferente, analista diferente y lote de microesferas diferente). La precisión representa la concordancia con el valor asignado en formatos tanto entre ensayos como intraensayos. (26)

Difteria	Precisión			Presición	
	Potencia asignada en (UI/ml)	Variación intraensayo (% CV medio)	Variación intraensayo (% CV medio)	% De precisión interensayo (% de acuerdo con el valor asignado)	% De precisión interensayo (% de acuerdo con el valor asignado)
2 ^a	13	6	15	100	85
2B	3	13	20	130	70
2C	1	0	0	100	100
2D	44	15	5	80	105

Discusión de los resultados

Es una enfermedad infecciosa causada por *Bifidobacterium* (*Corynebacterium diphteriae*), Se caracteriza por inflamación de la membrana, principalmente en el tracto respiratorio superior, generalmente la faringe, que produce una Exotoxina, que es la causa de la necrosis de la mucosa, la toxicidad del miocardio y del nervio periférico.

Los brotes recientes en África, Asia, Europa y América del Sur toman como ejemplo a los adultos. En los países donde aún prevalece, afecta principalmente a niños en edad preescolar y escolar, mientras que,

en la mayoría de los países industrializados, la difteria ya no prevalece. Aun así, es importante mantener una alta cobertura de vacunación para niños y adultos

La vacuna del toxoide diftérico es una de las vacunas más seguras disponibles en la actualidad. Hasta el momento, no hay informes de reacciones alérgicas graves atribuibles a los toxoides. Sin embargo, son frecuentes las reacciones locales en el lugar de la inyección, que se manifiestan como dolor, hinchazón y eritema, que tienden a agravarse al aumentar las dosis y en combinación con el toxoide tetánico o tos ferina y reacciones horizontales. Incluyendo fiebre, malestar, dolor de cabeza y somnolencia.

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

La vacuna contra la difteria es una vacuna segura y eficaz, desde que se introdujo en el primer plan de vacunación en 1975, no se han realizado cambios para alinearlos con las recomendaciones europeas a excepción de los cambios realizados en 2016.

Referencias

1. AMSE. Difteria. Epidemiología y situación mundial. [Online].; 2020 [cited 2021 Enero 5. Available from: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/79-difteria-epidemiologia-y-situacion-mundial>.
2. MSP. ENFERMEDADES INMUNOPREVENIBLES. [Online].; 2019 [cited 2020 Enero 5. Available from: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/11/INMUNO-SE-43.pdf>.
3. Ministerio de Salud Pública (MSP). DIFTERIA. .
4. Aeped. DIFTERIA. [Online].; 2018 [cited 2020 Enero 25. Available from: https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/difteria_tetanos_tosferina.pdf.
5. OMS. control de la difteria. [Online].; 2017 [cited 2020 Enero 5. Available from: https://www.paho.org/spanish/ad/fch/im/GuiaPractica_Pentavalente.pdf.
6. AEP. DIFTERIA. [Online].; 2018 [cited 2020 Enero 5. Available from: <https://vacunasaep.org/profesionales/enfermedades/difteria>.
7. SES. Protocolo de vigilancia epidemiológica de Difteria. [Online].; 2016 [cited 2020 Enero 5. Available from: https://www.areasaludbadajoz.com/SALUD_PUBLICA/EPIDEMIOLOG%C3%8DA/protocolo_difteria_2016_extremadura-2.pdf.
8. SVEA. PROTOCOLO DE VIGILANCIA Y ALERTA DE DIFTERIA. [Online].; 2012 [cited 2020 Enero 5. Available from: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud_5af95879cc545_pr_difteria12.pdf.
9. Scielo. Difteria. Una Amenaza Actual. [Online].; 2016 [cited 2020 Enero 5. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222016000200001.
10. Álvarez. DE. Empírico - Diagnóstico Molecular Difteria. [Online].; 2015 [cited 2021 01 08. Available from: <https://www.empireo.es/como-se-diagnostica-la-difteria/>.
11. Luis Carlos Torres Castillo NCRCM. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA MEDICINA INTERNA EN VENEZUELA. 2016; 32 (4)(300).

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

12. Crespo Ortiz MdP. El diagnóstico viral por el laboratorio. 2015; 31(2).
13. S. JM. Control microbiológico de antibióticos. Curvas standard, determinación de potencia y preparación de discos para pruebas de sensibilidad. 2014; 12(1).
14. J Caldera MC. Difteria: Experiencia en el servicio de enfermedades infecciosas del Hospital Universitario de Caracas. Revista Bolivariana Venez Infectologia. 2019 Junio; XXX(1).
15. Cecilia Tapia CSTV. Corynebacterium diphtheriae no toxigénico. Scielo. 2018 abril; XXXV(2).
16. Luis Carlos Torres Castillo NCRCMLJB. Difteria: Aspectos microbiológicos. Medicina Interna Caracas. 2016; XXXIII(4).
17. Diego CA. Difteria. Scielo. 2010; I.
18. Universidad Peruana Cayetano Heredia. [Online].; Dr. Herminio R. Hernández D [cited 2021 03 08. Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/sarampion/2018/presentacion/3.DifteriaHerminio.pdf>.
19. Larry M. Bush , T. Perez. DIFTERIA. MANUAL MSD. 2019 Julio .
20. Herminio D, D H. DIFTERIA. [Online].; 2018 [cited 2021 Marzo 6. Available from: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/sarampion/2018/presentacion/3.DifteriaHerminio.pdf>.
21. Álvarez Á. VACUNAS DE LA VARICELA Y LA DIFTERIA. [Online].; 2018 [cited 2020 Marzo 06. Available from: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANGELA%20ESTHER%20ALVAREZ%20LOPEZ.pdf>.
22. Caldera J, Carballo M, Martínez J. Difteria: Experiencia en el servicio de enfermedades. [Online].; 2017 [cited 2020 Marzo 6. Available from: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/07/1007550/06-caldera-j-29-34.pdf>.
23. Ministerio de Salud Publica. [Online]. [cited 2021 03 08. Available from: <https://www.salud.gob.ec/difteria/>.
24. NCBI. [Online]. [cited 2021 03 08. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7096772/>.

Sensibilidad y especificidad del cultivo y prueba de toxicidad en la difteria

25. Katia Abarca V FVRMPS. Inmunogenicidad y reactogenicidad de difteria. Revista medica de Chile. 2012 Mayo; CXXXX(5).
26. Gairola LedaaepdsKKPMGSTPKAKGAGHRYSUSS. Desarrollo y validación de inmunoensayo de pentaplex con perlas magnéticas para la cuantificación simultánea de anticuerpos IgG en suero murino frente a antígenos acelulares de tos ferina, difteria y tétanos utilizados en vacunas combinadas. Elsevier. 2019 Abril; CLVIII.
27. Clarin Cultura. Qué es el método inductivo: significado, pasos y ejemplos. 2020 Octubre - 24.
28. Metodologías de investigación y comunicación académica. El método biográfico. Universitat de València - Estudi General (UVEG). 2017.
29. UNAM. El método estadístico. Universidad Nacional Autónoma de México. 2019.

©2020 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)
(<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).