

Difteria: Aspectos microbiológicos

*Luis Carlos Torres Castillo, **Nirvia Cuaical Ramos, ***Carolina Macero,
****Jeisybeth Luque, *****Joana Bacalhau.

Sociedades de Microbiología, Pediatría y Puericultura, Salud Pública y Red de Soc Científicas

En muchos casos avanzados el diagnóstico clínico de difteria puede fácilmente preceder al diagnóstico microbiológico. Sin embargo, la primera evidencia de que probablemente se trata de la enfermedad difteria viene dada por el laboratorio de microbiología, reportando la presencia del agente etiológico (*C. diphtheriae*) en hisopados de faringe u otras fuentes respiratorias o cutáneas. 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.

Etiología

- *Corynebacterium diphtheriae* (biotipos: gravis, mitis, intermedius y belfanti)
- *Corynebacterium ulcerans*
- *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

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.

Diagnóstico microbiológico orden de recolección de datos

Debe acompañar a cada muestra y de manera estricta deberá constar de la siguiente información:

- Datos del paciente: nombre, edad, sexo, número de historia, institución de salud de proveniencia, datos del médico tratante.
- Datos del laboratorio: tipo de muestra y fecha de recolección.
- Datos clínicos: síntomas, fecha de inicio de los síntomas, tratamientos (antibióticos y antitoxina).
- Información epidemiológica: caso, contacto, historia de inmunización, historia de viajes, lista de contactos.

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

- 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.

* Lic. en Bioanálisis. Esp. Bacteriología Clínica. Prof. Agregado Cátedra de Microbiología. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela.
** Lic. en Bioanálisis. MSc. en Microbiología. Bacterióloga del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".
*** Lic. en Bioanálisis. Bacterióloga Instituto Medico La Floresta.
**** Lic. en Bioanálisis. Bacterióloga Clínica Integra.
***** Lic. en Bioanálisis. Bacterióloga Clínica Avila.

DIFTERIA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

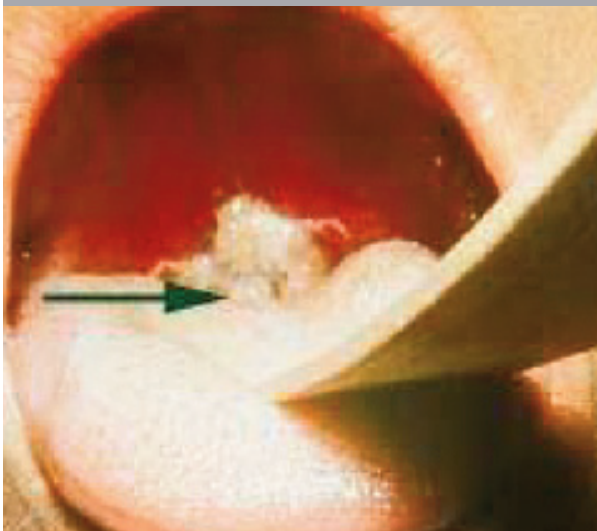
Toma de muestra

- 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 ó poliéster.

Hisopado faríngeo

- La faringe debe estar claramente visible y bien iluminada (**Figura 1**).
- 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.

Figura 1. Faringitis por *Corynebacterium diphtheriae*. Obsérvese la pseudomembrana adherente, blanca grisácea, asimétrica, con inflamación a su alrededor. Puede ocupar amígdalas, pilares y pared posterior de la faringe



Fuente: www.vet.uga.edu/erc/WEBFILES/sgrposrd E.J. Baron, L.R. Peterson, and S.M. Finegold, editors, Moseby-Year Book Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9th edition., 1994. Fuente: <http://phil.cdc.gov/phil/results.asp>

- 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, através 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.

Muestra cutánea

- Limpiar con solución salina estéril y remover el material adherido a la lesión (**Figura 2**).
- Presionar el hisopo de manera firme dentro de la misma.

Bajo cualquiera de estas modalidades de toma de muestra, el hisopo con la muestra se debe introducir en un tubo con medio de transporte Amies,

Figura 2. Lesión cutánea de difteria localizada en la pierna



aproximadamente a un tercio del fondo. Se debe mantener a temperatura ambiente durante el transporte.

Transporte de la muestra

- Enviar el hisopo en medio Amies con carbón activado; especialmente cuando los cultivos no se realizan en el mismo lugar en donde se efectuó la toma del material.
- Las muestras de membrana deben enviarse al laboratorio de bacteriología en un tubo estéril.
- De manera alternativa se puede utilizar el medio de transporte Stuart.
- El envío se realiza a temperatura ambiente, cualquiera sea el sistema de transporte utilizado.
- Procesamiento bacteriológico de la muestra.

Homogenización con bisturí estéril

- Fragmentar el trozo de membrana en una placa de Petri estéril, con bisturí nuevo o previamente esterilizado, hasta que su consistencia sea homogénea.
- Realizar frotis por aposición.
- Se puede utilizar un pequeño volumen de caldo nutritivo para suspender el material y mantenerlo húmedo.
- Tomar la muestra disgregada y sembrar con pipeta Pasteur estéril.

Medios de cultivo

Medios de cultivos para la siembra de hisopados y homogeneizados de membrana

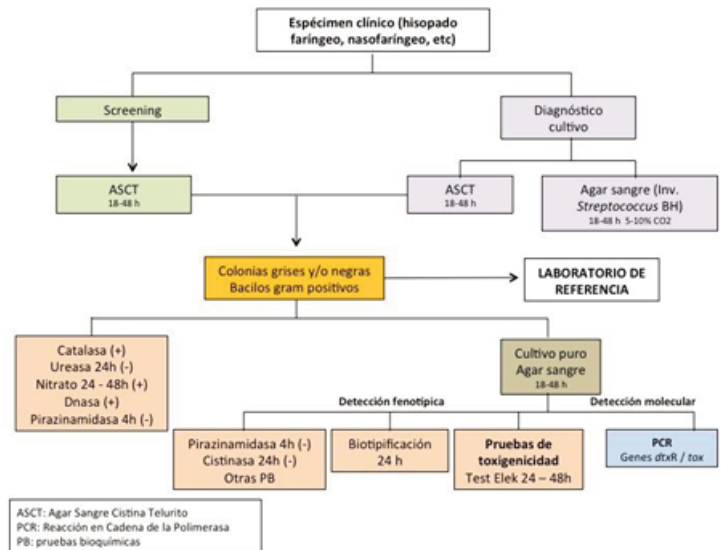
- Medio Agar Sangre Cistina Telurito (ASCT).
- Medio Löeffler. Se aconseja para la observación de la morfología bacteriana.
- Agar Sangre.
- Caldo Todd Hewitt con 3 % de sangre.
- El tiempo para el transporte no debe exceder las 24 horas.

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 pirazinamidasas 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.

Algoritmo para el diagnóstico de laboratorio mediante cultivo (elaboración propia)



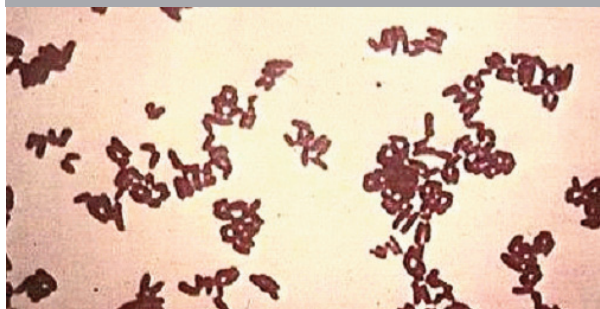
Características microscópicas

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 (Figura 3).

DIFTERIA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Figura 3. Coloración de Gram de *Corynebacterium diphtheriae*. Bacilo Gram positivo, pleomórfico, morfología en empalizada y letras chinas



Fuente: Adaptado de www.medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/corydiap

Características de cultivo

Aspecto de las Colonias

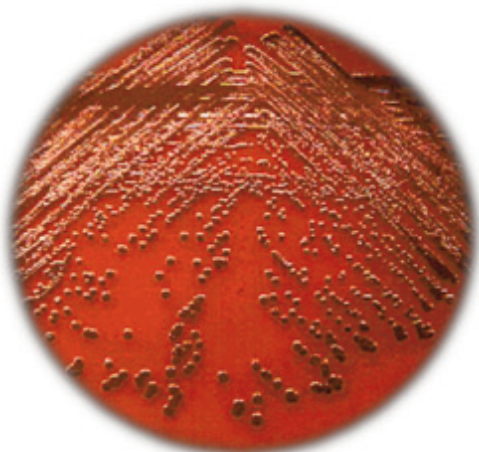
Medio Agar Sangre Cistina Telurito

-*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 (**Figura 4**).

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.

Figura 4. Agar Sangre Cistina Telurito. *Corynebacterium diphtheriae* reduce el telurito del medio a telurito metálico, el cual precipita y produce el desarrollo de colonias negras



Fuente: Adaptado de www.endeavor.med.nyu.edu/courses/microbiology/courseware/infect-disease/GPB3

Identificación bioquímica

Especies	CYS	PYZ	Nitrato	Urea	Glu	Mal	Sac	Alm
<i>C. diphtheriae</i>								
var. <i>Gravis</i>	+	-	+	-	+	+	-	+
var. <i>Mitis</i>	+	-	+	-	+	+	-	-
var. <i>Intermedius</i>	+	-	+	-	+	+	-	-
var. <i>Belfanti</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. ulcerans</i>	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>C. amycolatum</i>	-	+	V	V	+	V	V	-
<i>C. imitans</i>	-	+/-	-	-	+	+	+/-	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	V	+	+	-	-	-	-
<i>C. striatum</i>	-	+	+	-	+	-	V	-

CYS: cistinasa, PYZ: pirazinimidasa, Glu: glucosa, Mal: maltosa, Sac: sacarosa, Alm: almidón.

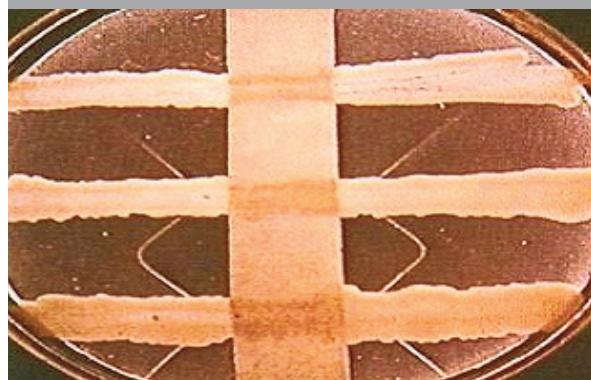
Prueba de toxigenicidad

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 (**Figura 5**).

Figura 5. Test de Inmunoprecipitación de Elek. *Corynebacterium diphtheriae*: reacción positiva, obsérvese las líneas de precipitación de identidad entre las toxina y antitoxina diftéricas.



Fuente: Adaptado de: www.medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/corydiap

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:**
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.

El abordaje diagnóstico mostrado previamente corresponde a la investigación mediante cultivo y posterior identificación mediante pruebas fenotípicas y moleculares. También se puede establecer un diagnóstico molecular mediante PCR directamente de las muestras previamente señaladas. De la misma manera debemos tomar en cuenta que solo se estaría detectando el gen de la toxina, más no se evidencia si la misma se expresa, asimismo se debe establecer la confirmación correspondiente en un laboratorio de referencia.

Figura 6. Evaluación de susceptibilidad antimicrobiana para *Corynebacterium diphtheriae*. M45 Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Clinical Laboratory Standards Institute. 3er Edition 2015.

Table 6. *Corynebacterium* spp. (Including *Corynebacterium diphtheriae*) and Related Coryneform Genera^a

Testing Conditions Medium: CAMHB-LHB (2.5% to 5% v/v). If testing daptomycin, the medium should contain 50 µg/mL calcium. Inoculum: Direct colony suspension, equivalent to a 0.5 McFarland standard Incubation: 35°C; ambient air, 24 to 48 hours (see Testing Notes)	Routine QC Recommendations <i>S. pneumoniae</i> ATCC [®] 49619 <i>E. coli</i> ATCC [®] 25922 for gentamicin See QC Table 23B.	Agents to Consider for Primary Testing Erythromycin Gentamicin Penicillin Vancomycin
---	--	---

^a ATCC[®] is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

General Comments

- (1) Growth characteristics on routine media: often fastidious; requires blood-supplemented media for adequate growth; ambient air; 20 to 24 hours.
- (2) For some organism/antimicrobial agent combinations, the absence or rare occurrence of resistant strains precludes defining any results categories other than "susceptible." For strains yielding results suggestive of a "nonsusceptible" category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed. Subsequently, the isolates should be saved and submitted to a referral laboratory for confirmation.

Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL) Interpretive Criteria			Comments
		S	I	R	
PENICILLINS					
	Penicillin	<0.12	0.25-2	>4	
CEPHEMS					
	Cefepime	<1	2	>4	
	Cefotaxime	<1	2	>4	
	Ceftriaxone	≤1	2	≥4	
CARBAPENEMS					
	Meropenem	< 0.25	0.5	>1	
GLYCOPEPTIDES					
	Vancomycin	<2	—	—	See comment (2).
LIPOPEPTIDES					
	Daptomycin	<1	—	—	See comment (2).
AMINOGLYCOSIDES					
	Gentamicin	≤4	8	≥16	
MACROLIDES					
	Erythromycin	≥0.5	1	≥2	
FLUOROQUINOLONES					
	Ciprofloxacin	<1	2	>4	
Antimicrobial Class	Antimicrobial Agent	MIC (µg/mL) Interpretive Criteria			Comments
S	I	R			
TETRACYCLINES					
	Doxycycline	<4	8	>16	
	Tetracycline	<4	8	>16	
LINCOSAMIDES					
	Clindamycin	<0.5	1-2	>4	
FOLATE PATHWAY INHIBITORS					
	Trimethoprim-sulfamethoxazole	<2/38	—	>4/76	
ANSAMYCINS					
	Rifampin	≤1	2	≥4	(3) Rx: Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.
STREPTOGRAMINS					
	Quinupristin-dalfopristin	≤1	2	≥4	
OXAZOLIDINONES					
	Linezolid	≤2	—	—	See comment (2).

Abbreviations: ATCC[®], American Type Culture Collection; CAMHB-LHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth supplemented with lysed horse blood; I, intermediate; MIC, minimal inhibitory concentration; QC, quality control; R, resistant; S, susceptible.

DIFTERIA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Footnote

- a. Coryneform genera include: *Arcanobacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Dermabacter*, *Leifsonia*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Rothia* (excluding *Rothia mucilaginosa*; see Table 19), *Trueperella*, and *Turicella*.

Supplemental Information

Resistance:

Resistance to β -lactams, macrolides, and aminoglycosides, as well as quinolones or folate pathway inhibitors, has been reported in *Corynebacterium afimentans*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium aurimucosum*, *Corynebacterium auris*, *Corynebacterium coyleae*, *C. diphtheriae*, *Corynebacterium glucuronolyticum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium propinquum*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium resistens*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium tuberculostearicum* (which includes nearly all CDC group G-2 isolates), *Corynebacterium urealyticum*, and *Corynebacterium ureicelerivorans*. Resistance to erythromycin and clindamycin is nearly always attributable to the presence of the *ermX* or, occasionally, *ermB* gene.³⁸ Resistance to quinolones has been observed due to mutations in *gyrA*. Ophthalmic infections caused by *Corynebacterium macginleyi* are more difficult to treat with fluoroquinolone eye drops if a *gyrA* mutation is present.³⁹ Based on several recent reviews, all *Corynebacterium* remain susceptible to vancomycin, linezolid,^{40,41} and tigecycline.⁴⁰ In addition, from among nearly 500 *Corynebacterium* strains, most were susceptible to daptomycin (99.6%) and quinupristin-dalfopristin (95.3%), with > 85% of isolates susceptible to rifampin, tetracycline, gentamicin, and meropenem (based on data collected by one member of the working group). A single daptomycin nonsusceptible *C. jeikeium* isolate has been reported.⁴²

There are limited antimicrobial susceptibility and resistance mechanism data for other coryneform genera. In contrast to *Corynebacterium* spp., reduced susceptibility to daptomycin appears to be relatively common in other coryneform genera (based on data collected by one member of the working group). *Arcanobacterium haemolyticum* and *Trueperella* (formerly *Arcanobacterium*) *bernardiae* may be resistant to tetracycline.⁴³⁻⁴⁵ *Arthrobacter* spp. have been reported to be resistant to aminoglycosides and quinolones.⁴⁶ *Brevibacterium* spp., particularly *Brevibacterium casei* and *Brevibacterium otitidis*, may demonstrate resistance to β -lactams and clindamycin.⁴⁷ *Dermabacter hominis* and *Turicella otitidis* may be macrolide and clindamycin resistant.⁴⁷ *Leifsonia aquatica* has been reported to have diminished vancomycin and penicillin susceptibility.⁴⁸ *Microbacterium resistens* and other *Microbacterium* spp. may be nonsusceptible to vancomycin.⁴⁹

Referencias

1. Efstratiou A., George R.C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. Commun Dis Public Health 1999; 2: 250-7.
2. Public Health Laboratory Service. PHLS clinical microbiology standard operating procedure for the identification of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. B.SOP 2, issue 1. London: PHLS, 1999.
3. "Manual for the Laboratory Diagnosis of Diphtheria". The Expanded Programme on Immunization in the European Region of WHO. Copenhagen, Denmark, 1994.
4. Balows, A.; Hausler Jr., W.J.; Herrmann, K.L.; Isenberg, H.D. & Shadomy, H.J., ed. - Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1991. 1384p.
5. Aislamiento y caracterización de *Corynebacterium diphtheriae*. Servicio Bacteriología Clínica. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".