

## **Corynebacterium diphtheriae. Características de cepas aisladas recientemente en Maracaibo - Venezuela.**

**Ricardo Cárdenas  
Gustavo Prieto  
Jeannette Vargas  
Ada Martínez**

La Difteria es una afección de distribución universal. En Suramérica, para 1959, tasas de morbilidad del 52.7 por 100.000 habitantes son reportadas desde Brasil, un país en vías de desarrollo.

En Venezuela las tasas reportadas para los años 1957-1964, van del 18 al 6 por 100.000 habitantes. Una mortalidad de 1.2 a 0.3 por 100.000 habitantes ha sido reportada para los años 1956-1965. El Estado Zulia, durante el decenio 1956-1965, ocupa el primer lugar en lo que a morbilidad se refiere, correspondiéndole tasas de mortalidad de 2.8 a 0.3 por 100.000 habitantes, siendo estas las más altas acusadas en el país<sup>1 2 3 4</sup>. La endemia, así mantenida, es seguida en ocasiones por brotes epidémicos.

---

Departamento de Microbiología y Patología Tropical. Cátedra de Microbiología. Facultad de Medicina. L.U.Z. Venezuela.

De ser estas características compatibles con un *Corynebacterium*, para obtener un cultivo puro, se realiza un nuevo repique a medio de Loeffler el cual es incubado a 37°C durante 6 a 18 horas. La pureza del cultivo es luego confirmada mediante extendidos coloreados con la técnica de Gram y gránulos metacromáticos. El cultivo puro es sembrado en caldo libre de carbohidratos para ser sometido a estudio bioquímico en medios de: Urea de Christensen, Nitratos, Cistina Tripticasa Agar con Glucosa, Maltosa y Sacarosa. Los medios se incuban a 37°C por 24 a 48 horas. Si en ellos las reacciones resultan compatibles con las descritas para *C. diphtheriae*, las siguientes características son estudiadas: actividad en medio de Cistina Tripticasa Agar con Almidón, Glucógeno, Dextrina, Xilosa, Manitol y Trehalosa, morfología de las colonias en medio de Tripticasa Agar Telurito, producción de halo en el Medio de Tinsdale Modificado, formación de película en Caldo, motilidad, producción de catalasa y de hemólisis en Agar Sangre Humana y Agar Sangre de Carnero<sup>7 8 9 10 11 12 13</sup>.

Finalmente se practica estudio de toxigenicidad in vitro e in vivo. Para detectar la producción de toxina, in vitro, se sigue el método de inmunodifusión, originalmente descrito por Elek, con la modificación de Hermann, Moore y Parsons. El medio utilizado es KL virulencia, con el enriquecimiento KL incorporado (Difco). Una solución de 500 U de antitoxina (Bering) por ml. es utilizado para impregnar una tira de papel de filtro (Whatman N° 1) estéril de 60 por 15 mm. la cual, después de eliminar el exceso de antitoxina, se sumerge en el seno del agar en el momento de su preparación. La placa, después de solidificado el agar, es secada colocándola a temperatura de incubadora durante una hora. La placa puede ser usada después de secada o dentro de cinco días si se le guarda en refrigeración. No obstante, en lo posible, la placa debe ser preparada el mismo día que va a ser utilizada. Para la siembra se emplea un cultivo puro de 24 horas en Caldo Cerebro Corazón. Hasta cuatro cepas pueden ser estudiadas en una misma placa. En la prueba se incluye un control positivo (cepa toxigénica de *C. diphtheriae* A-102 obtenida del Instituto Pasteur de París) y un control negativo, representado por una cepa no toxigénica de *C. diphtherinae* u otro miembro del género *Corynebacterium*<sup>7 8 14 15</sup>.

Para la prueba in vivo se utiliza, con ligeras variantes, la metodología descrita por G. J. Harmann. Se emplean conejos blancos, cuyo dorso es afeitado con máquina eléctrica y demarcado como se demuestra en la fotografía N° 4. De un cultivo de 24 horas en Caldo Cerebro Corazón, 0.2 ml. de la cepa en estudio y de los controles es inyectado, por vía intradérmica, en los cuadrantes demarcados en el conejo. Para la inyección se utilizan jeringas de 2 ml. graduadas en décimas de ml. con aguja N° 26. Las jeringas son guardadas inmediatamente bajo refrigeración con el resto del cultivo. Se permite transcurrir cuatro horas para proceder a inyectar 500 U de antitoxina diftérica por vía endovenosa (vena marginal de la oreja) o 1.000 U, si se emplea la vía intraperitoneal. Si se utiliza la vía endovenosa inmediatamente o, transcurridos 30 minutos si la vía utilizada es la intraperitoneal, se inyectan por vía intradérmica 0.2 ml. del cultivo inoculado anteriormente. Ha de tenerse precaución en utilizar el cuadrante opuesto al empleado en la primera inyección intradérmica. Cuatro cepas y los controles pueden ser estudiadas simultáneamente en un mismo animal<sup>7-9</sup>.

## **RESULTADOS:**

En el medio de Trypticase Agar Telurito y utilizando concentraciones de telurito de 0.1 % todas las cepas, excepto una (98.4 %) muestran las características descritas para el tipo mitis de *C. diphtheriae*. La cepa que constituye la excepción presenta, para las 48-72 horas, características descritas para el tipo gravis. Las colonias, por lo general, después de 18 a 24 horas de incubación, son grises ennegreciéndose a medida que transcurre el tiempo de incubación, siendo la gran mayoría francamente negras para las 72 horas. Las micrococáceas que desarrollan colonias negras en este medio, lo hacen por lo general en las primeras 24 horas.

En el Medio de Tinsdale Modificado las cepas producen colonias convexas, grises o negras, rodeadas, en el 100 % de las cepas, de un halo marrón intenso, después de 24 a 48 horas de incubación. La punción del medio con el asa permite detectar, prematuramente, el oscurecimiento del medio por el *C. diphthe-*

riae, pudiendo ello hacerse evidente entre 12 a 18 horas. En la fotografía N° 1 puede apreciarse, en el medio de Tinsdale Modificado, las colonias de *Corynebacterium diptheriae*, rodeadas de un halo marrón intenso.

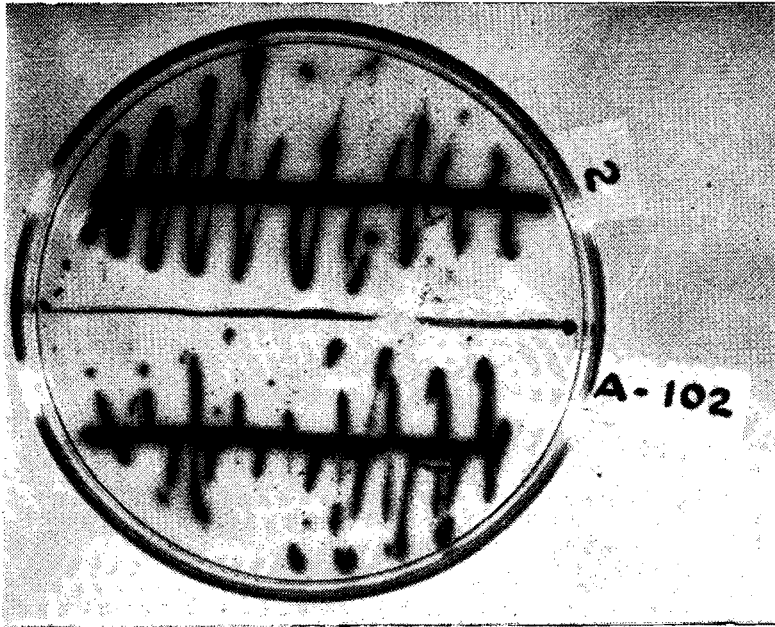


Foto No. 1

Microscópicamente, en especial con coloración de gránulos metacromáticos, no hubo diferenciación entre las cepas de tipo gravis y mitis de *C. diptheriae*.

En su comportamiento bioquímico, es altamente notorio que el 94% de las cepas pertenecen a la variedad de *C. diptheriae* que fermenta la Sacarosa.

Las cepas, exceptuando el tipo gravis, son hemolíticas, produciendo por lo general zonas de beta hemólisis muy estrechas pero francas en Agar Sangre Humana y zonas más extensas de alfa hemólisis en Agar Sangre de Carnero.

Los resultados descritos pueden apreciarse en conjunto en los cuadros N° 1 y N° 2. La caracterización de tipo es mostrada en el cuadro N° 3.

**CUADRO Nº 1**

**CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE. BIOQUIMICA**

Nº de cepas	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Almidón	Glucógeno	Dextrina	Urea	Nitratos				
66	+	100	+	94	-	1.5	-	1.5	-	0	+	100
A-102	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Los números expresan porcentajes de positividad.

A-102 Cepa control. *Corynebacterium diphtheriae* obtenida del Instituto Pasteur.

**CUADRO Nº 2**

**CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE. OTRAS CARACTERISTICAS**

Nº de Cepas	Morfología	TAT*	Halo	en MTM**	Peícula	en caldo	Hemólisis	en ASH	Motilidad	Catalasa			
66	Lisa	24h	gris	72h	negra								
	98.5					Marrón	Intenso	-	1.5	+ 98.4	-	0	+ 100
	Rugosa												
	1.5												
A-102	Lisa	gris	negra	Marrón	Intenso								

\* TAT = Tripticaasa Agar Telurito.

\*\* MTM = Medio de Tinsdale Modificado.

Los números expresan porcentajes de positividad.

CUADRO No. 3  
 CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE. BB CEPAS. CARACTERIZACION DE TIPOS

Tipo	No. de Cepas	Morfología	Colonias en TAT a las 48-72 h.	Halo en M/TM	Qu. coag. caso	Met. caso	Seca. caso	Alm. edn	Glucó. gano	Des. trino	Xinasa	Mant. tol	Treha. liso	Urea	Nitro. fos	Fenolis. an. cano	Mane. lisa en ASB	Mati. liso	Ceto. liso
C. DIPHTHERIAE TIPO GRAVIS	1	Largas, delgadas con muchas gránulos metacromáticos y uno o ambos extremos engrosados	Reposas, grises o negras, grandes, opacas, estriadas, irregulares	Halo marrón intenso	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
C. DIPHTHERIAE TIPO MITIS	85	Idéntico al anterior	Lisas, grises o negras, pequeñas, brillantes, convexas, enteras	Halo marrón intenso	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
C. DIPHTHERIAE TIPO MITIS	A-102	Idéntico al anterior	Lisas, grises o negras, pequeñas, brillantes, convexas, enteras	Halo marrón intenso	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+

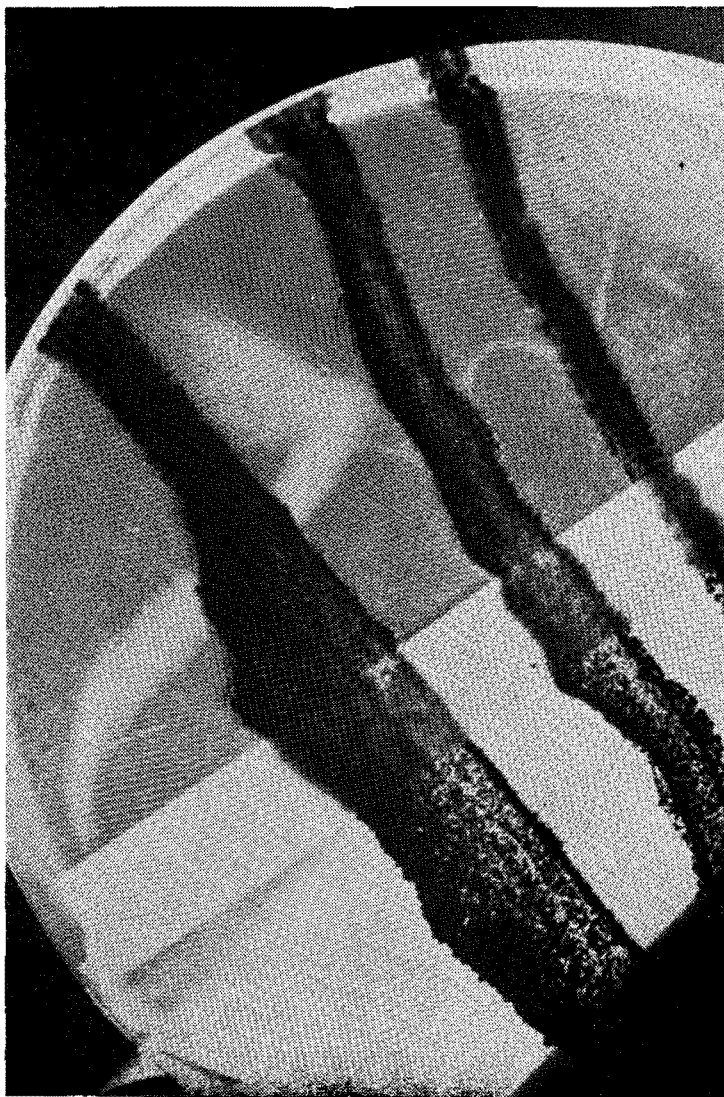
Por los métodos in vitro e in vivo es demostrada toxigenicidad en 65 (98.4%) de las cepas. Sólo en una cepa, precisamente la que exhibió características de la variedad gravis, los métodos in vitro e in vivo, fracasaron en detectar producción de toxina. Una correlación de 98.4% se evidencia entre ambos métodos. Sólo una cepa que demostró ser toxigénica por el método in vivo, el método in vitro fracasó en detectar su toxigenicidad. En el método in vitro una reacción de identidad entre las bandas de precipitación producidas por la reacción antitoxina-toxina puede hacerse evidente después de 48 horas, cuando cepas toxigénicas están adyacentes. Ello es ilustrado en las fotografías N° 3 y N° 4.

Los resultados de las pruebas de toxigenicidad se muestran en el cuadro N° 4.

**CUADRO N° 4**  
**PRUEBAS DE TOXIGENICIDAD**

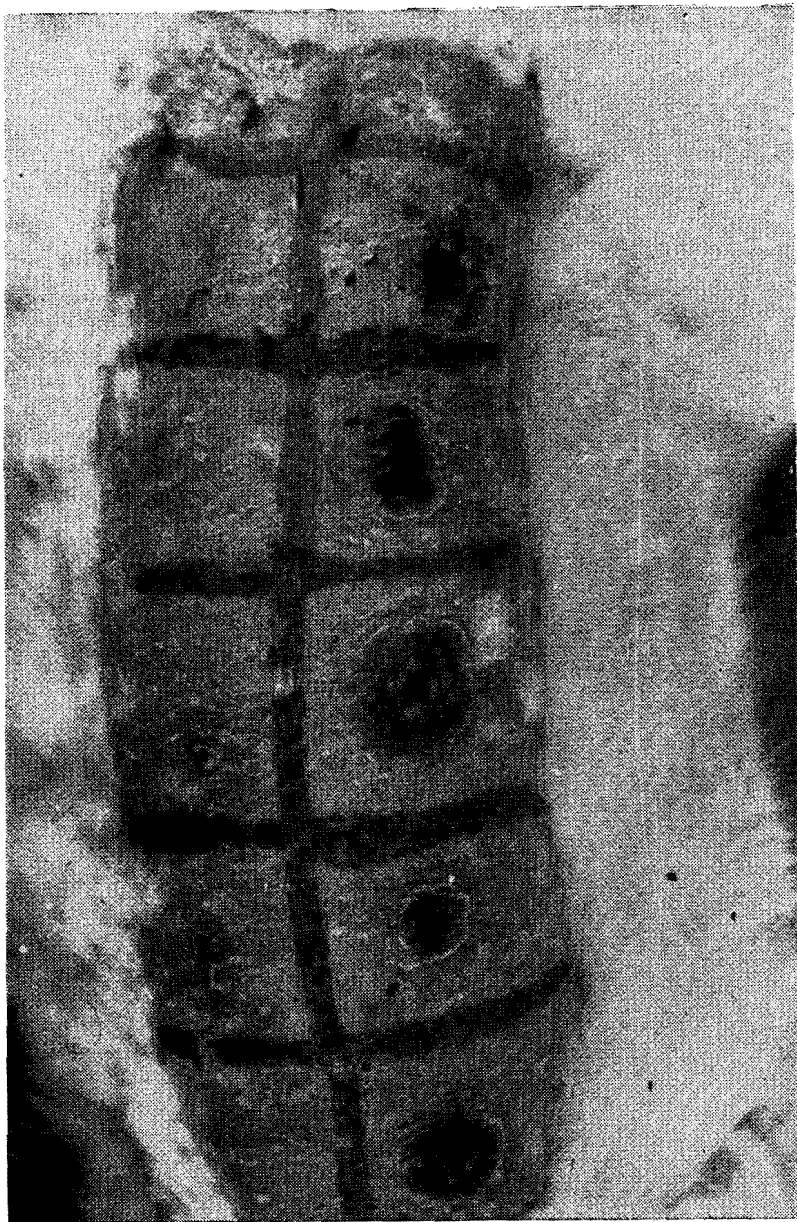
N° de Cepas	Tipo	In vitro	In vivo
65	Mitis	+ 98.4	+ 100
1	Gravis	- 0	- 0
A-102	Mitis	+	+

Los números expresan porcentajes de positividad.



**Foto N° 2: PRUEBA DE TOXIGENIDAD IN VITRO.** Se pueden apreciar las bandas de precipitación y la reacción de identidad que evidencian la producción de toxina, en dos de las cepas estudiadas. La cepa A-102 (control positivo) es mostrada al lado izquierdo de la foto.





**Foto N° 3: PRUEBA DE TOXIGENICIDAD IN VIVO.** En el lado derecho, se observan las lesiones causadas en la piel del conejo por cuatro de las cepas toxigénicas de *Corynebacterium diphtheriae*, estudiadas. En el lado izquierdo, no se observan lesiones en piel, debido a que previamente a la inoculación de las cepas en estudio se había protegido al animal con antitoxina diftérica. Los cuadrantes de los extremos corresponden a los controles positivos y negativos.

## DISCUSION

El hallazgo de un predominio casi absoluto del tipo mitis en la localidad, concuerda con los reportados en otros estudios en nuestro medio<sup>6 16 17</sup>.

Es nuestra experiencia, al igual que la reportada por otros, que la aparición de un halo marrón intenso alrededor de las colonias de *C. diphtheriae* en el Medio de Tinsdale Modificado, representa una gran ayuda para aislar, en una muestra, esta entidad bacteriana. Esto hace al medio de utilidad para detectar casos clínicos y sobre todo portadores de *C. diphtheriae*. No obstante, otros autores han reportado, especialmente trabajando a partir de subcultivos del medio de Loeffler, falsos positivos y negativos en este medio. La aparición de un halo marrón alrededor de las colonias, no es específico de *C. diphtheriae*. Moore y Parsons reportan falsos positivos con *C. ulcerans* y Porten un 19% ocasionado, principalmente, por otros miembros del género *Corynebacterium*. El mismo autor reporta 3% de falsos negativos.

Todas nuestras cepas reducen los nitratos a nitritos, incluyendo aquellas cepas no toxigénicas, esta característica ha sido reportada negativa en algunas cepas no toxigénicas, especialmente en la variedad *belfanti* del tipo *mitis*<sup>18 19 20 21 22</sup>.

Aun cuando la utilización de la Sacarosa es extremadamente rara en cepas de *C. diphtheriae* aisladas en E.E.U.U. y Europa<sup>7</sup>, ellas no son aisladas infrecuentemente en Brasil<sup>23</sup>. En el estudio bioquímico de nuestras cepas, es llamativo que el 94% de ellas pertenecen a la variedad que fermenta este carbohidrato. Es interesante conocer esto por cuanto algunos autores no hacen mención de la posibilidad que tienen algunas cepas de *C. diphtheriae* de utilizar la Sacarosa y más aún, este criterio unido a la no utilización de la urea, reducción de nitratos a nitritos y fermentación de la glucosa, es usado frecuentemente en los pasos iniciales para establecer diagnóstico diferencial de *C. diphtheriae* con otros miembros del género, algunos de los cuales son habitantes normales de orofaringe y nasofaringe<sup>18 24 25</sup>.

El alto porcentaje de correlación en este estudio, entre los métodos *in vitro* e *in vivo* para detectar toxigenicidad, corrobora

los hallazgos de otros y abre la posibilidad, por la simplicidad del primero, de relegar el uso del segundo para aquellas cepas a las cuales no se les pueda demostrar toxigenicidad por el método in vitro<sup>14 26 27</sup>.

La aparición de una reacción de identidad entre las bandas de precipitación en cepas toxigénicas es indicativo de que las toxinas producidas por las diferentes cepas de *C. diphtheriae* son inmunológicamente idénticas<sup>26</sup>.

### SUMARIO

Se estudian las características morfológicas, metabólicas y toxigénicas de 66 cepas de *Corynebacterium diphtheriae*. El 98.4% de las cepas pertenecen a la variedad mitis. El 94% corresponde a la variedad de *C. diphtheriae* que fermenta la Sacarosa. Las cepas son toxigénicas en un 98.4%. Una correlación entre los métodos in vitro e in vivo se demuestra en un 98.4% de ellas.

### REFERENCIAS

- 1 — ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. "Las condiciones de Salud en las Américas". **RESUMEN DE LOS INFORMES CUADRIENALES**. 1957-1960.
- 2 — ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. "Las condiciones de Salud en las Américas". **RESUMEN DE LOS INFORMES CUADRIENALES**. 1961-1964.
- 3 — PUBLICACION CIENTIFICA. N° 64, Julio 1962.
- 4 — S.A.S. "Distribución geográfica en las áreas de notificación y resto del país". **ANUARIO DE EPIDEMIOLOGIA Y ESTADISTICA VITAL DEL MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL**. Tomo II.
- 5 — BRACHO D. "Epidemiología de la Difteria". **PUBLICACION DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SOCIAL. FACULTAD DE MEDICINA. L.U.Z.**
- 6 — CARDENAS C. R. y PRIETO G. "Estudio de las características bioquímicas y toxigénicas de 38 cepas de *Corynebacterium diphtheriae* aisladas en Maracaibo". **MEMORIAS I JORNADAS ZULIANAS PARA EL AVANCE DE LA CIENCIA**. p. 56, 1969.
- 7 — HARRIS A. H. and COLEMAN M. B. "Diagnostic Procedures and Reagents". **AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION INC.** 4th Edition, New York, 1963.

- 8 — PRIETO G. "Notas sobre la identificación de *C. diphtheriae*". **PUBLICACION CATEDRA DE MICROBIOLOGIA. FACULTAD DE MEDICINA. L.U.Z.**
- 9 — TINSDALE G.F.W. "New medium for isolation and identification of *C. diphtheriae* based on production of H<sub>2</sub>S". **J. PATH. BACT.** 59: 461-466, 1947.
- 10 — CRUCKSHANK R. "*Corynebacterium*". **MEDICAL MICROBIOLOGY.** Eleventh Edition, 178: 192, 1965.
- 11 — BILLINGS E. "An investigation of Tinsdale tellurite medium: its usefulness and mechanism of halo formation". **M. S. THESIS. UNIV. OF MICHIGAN.** 1956.
- 12 — MOORE M. S. and PARSONS E. I. "A study of a modified Tinsdale's medium for the primary isolation of *Corynebacterium diphtheriae*". **THE JOURNAL INFECTIOUS DISEASES.** 102: 88-93, 1958.
- 13 — PORTEN H. M. "Evaluation of a Medium for Primary Isolation of *Corynebacterium Diphtheriae*". **CANADIAN JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY.** 161: 167, August 1968.
- 14 — ELEK S. D. "The recognition of toxigenic bacterial strains in vitro". **BRIT. MED. J.** 1: 493, 1948.
- 15 — HERMANN G. J., MOORE M. and PARSONS E. I. "A Substitute for Serum in the *Diphtheriae* in vitro Toxigenicity Test". **AMER. J. CLIN. PATH.** 29: 181, 1958.
- 16 — OSUNA A. "Epidemiología de la Difteria". **CURSO DE MEDICOS HIGIENISTAS 1949-1950. PUBLICACION DE LA ESCUELA DE SALUD PUBLICA,** p. 3.
- 17 — BRICEÑO IRAGORRY L. "Receptividad de la Difteria en Caracas según 4010 reacciones de Schick". **GACETA MEDICA DE CARACAS.** 47: 244, 1934.
- 18 — MICROBIAL DISEASES LABORATORY. "Notes on Laboratory Identification of *C. Diphtheriae*". **DEPARTMENT OF PUBLIC HEALTH.** Berkeley, California, USA.
- 19 — BEZJAK V. "Differentiation of *C. diphtheriae* of the mitis type found in diphtheriae and ozaena". **ANTONIE VAN LEEUWENHOECK J. MICROBIOL SEROL.** 20: 269, 1954.
- 20 — DUBOS R. J. and HIRSCH J. G. "The *Diphtheriae* Bacilli and The Diphtheroid". **BACTERIAL AND MYCOTIC INFECTIONS OF MAN.** Fourth Edition p: 468, 1965.
- 21 — DAVIS, DULBECCO, EISLER, GUISEBERG, WOOD. "*Corynebacteria*". **MICROBIOLOGY.** p: 669, 1967.
- 22 — BLAIR J. E., LANNETTE E. H. and TRUANT J. P. "*Corynebacterium*". **MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.** p: 88, 1970.

- 23 --- CHRISTOVAO D. "Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae* 1. Fermentação da Sacarose por bacilos diftericos virulentis isolados em Sao Paulo. **ARQ. FAC. HIG. SAUDE PUBL.** 11: 95, 1957.
- 24 --- BAILEY W. R. and SCOTT E. G. "Corynebacteria". **DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY.** Third Edition. 187: 192, 1970.
- 25 --- JAWETZ E., MELNICK J. L. and ADELBERG E. A. "Los Corynebacteria". **MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA.** Cuarta Edición. 1970.
- 26 --- KING E. O., FOBISHER M. and PARSONS E. I. "Further studies on the in vitro toxigenicity test". **A. J. P. H.** 40: 704, 1950.
- 27 --- MANIAR A. C. and FOX J. G. "Techniques of an In vitro Method for Determining Toxigenicity of *Corynebacterium Diphtheriae* Strains. **CANADIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH.** Vol. 59, N° 8, 297: 301, August 1968.

## UNIVERSIDAD DEL ZULIA

### CONSEJO UNIVERSITARIO

Dr. J. M. Delgado Ocando  
Rector-Presidente

Dr. Régulo Pachano Añez  
Vicerrector-Secretario

Dr. Bernardo Rodríguez d'Empaire  
Secretario

Dr. Humberto La Roche  
Decano de la Facultad de Derecho

Dr. Heber Villalobos  
Decano de la Facultad de Medicina

Dr. Rolando López  
Decano de la Facultad de Ingeniería

Dr. Heberto Jiménez Navas  
Decano de la Facultad de Odontología

Dr. Pascual Saggese Villalta  
Decano de la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales

Dr. José Ant. Borjas Sánchez  
Decano de la Facultad de Humanidades y Educación

Dr. Juan Gómez Mejías  
Decano-Encargado de la Facultad de Agronomía

Dr. Miguel Casas Armengol  
Decano de la Facultad de Arquitectura

Dr. Ramón Parra Atencio  
Decano de la Facultad de Ciencias Veterinarias

Dr. Adolfo Pons  
Representante del Ministerio de Educación

Lic. Victor Chirinos  
Representante de los Egresados

Br. León Grunhaus  
Representante Estudiantil

Br. José Caldera Olivares  
Representante Estudiantil

Br. Héctor González  
Representante Estudiantil

## Universidad del Zulia

### Directores

Lic. César David Rincón.  
Director de Cultura

Dr. Armando Fuenmayor Villasmil  
Director de la Escuela de Derecho

Dr. Luis Soto Pirela  
Director de la Escuela de Medicina

Odontólogo Carlos Chávez Valera  
Director de la Escuela de Odontología

Econ. Gastón Parra Luzardo  
Director de la Escuela de Economía

Lic. Antonio Matheus  
Director de la Escuela de Administración Comercial y Contaduría Pública

Ing<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Romer González González  
Director de la Escuela de Ingeniería Agronómica

Ing<sup>o</sup> José Ferrer  
Director de la Escuela de Ingeniería de Petróleo

Ing<sup>o</sup> Rolando López  
Director-Encargado de la Escuela de Ingeniería Mecánica

Ing<sup>o</sup> Armando Hernández  
Director de la Escuela de Ingeniería Civil

Ing<sup>o</sup> Marcelino Lunar  
Director de la Escuela de Ingeniería Geodésica

Ing<sup>o</sup> José Ferrer  
Director-Encargado de la Escuela de Ingeniería Química

Lic. Marta Colomina de Rivera  
Directora de la Escuela de Periodismo

Lic. Gilberto Aguirre  
Director de la Escuela de Educación

Lic. Victor Fuenmayor  
Director de la Escuela de Letras

Lic. Luis Beltrán Morán  
Director de la Escuela de Filosofía

Dra. Alvia G. de Urdaneta  
Directora de la Escuela de Bioanálisis

Dr. Antonio Romero Páez  
Director de la Escuela de Enfermería

Dr. Francisco Solano Nava  
Director de la Escuela de Nutrición y Dietética

Dr. Carlos González Fuenmayor  
Director Docente y de Secretaría

Dr. Jesús Santiago Rodríguez García  
Director de Protección Social y Estudiantil

Dr. Luis Viloria  
Director de Administración

Ing<sup>o</sup> Químico Robinson Arrieta  
Director-Encargado de Deportes

Dr. Afranio Connell Molero  
Director de la Escuela de Ciencias Veterinarias

Dr. Tulio E. Luzardo Padrón  
Consultor Jurídico

Dr. José González González  
Adjunto al Consultor Jurídico