

COLEGIO ODONTOLÓGICO
COLOMBIANO

No. A. ceso

Exp. rec. M. 077 1987

Compra Canje Donación

Editorial

Solicitado por

Fecha

Precio

~~M~~
~~077~~
~~1987~~

COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO

LA DIFTERIA

SANDRA YOLANDA RODRIGUEZ PANTOJA

Bogotá, Colombia, Noviembre 25 de 1987

COLEGIO ODONTOLOGICO COLOMBIANO
BOGOTA, COLOMBIA

LA DIFTERIA

SANDRA YOLANDA RODRIGUEZ PANTOJA

Monografía presentada en cumplimiento parcial de los requisitos exigidos para optar por el título de Odontólogo

Bogotá, noviembre 25 de 1987

APROBACION

Monografía titulada "LA DIFTERIA", en cumplimiento parcial de los requisitos para optar el título de Odontólogo, fue corregida por la Directora de Tesis el 25 de noviembre de 1987.

NOTA DE ACEPTACION. ASESORA.


Constanza Peña T.

PRESIDENTE DEL JURADO

JURADO

JURADO

LA DIFTERIA


SANDRA YOLANDA RODRIGUEZ PANTOJA
ALUMNA


CONSTANZA PEÑA
ASESORA

COLEGIO ODONTOLÓGICO COLOMBIANO

DIRECTIVAS

RECTOR : JORGE ARANGO TAMAYO

DECANO : MARISOL ARANGO DE LEON

VICE-DECANO : JAIRO FORERO MORALES

SECRETARIO ACADEMICO : LUIS FELIPE FALLA

COORDINADOR X SEMESTRE : ROBERTO ARCINIEGAS

DIRECTORA DE TESIS : CONSTANZA PEÑA

Bogotá, noviembre 25 de 1987

Expreso especial agradecimiento por la colaboración prestada durante todas las etapas de realización de este trabajo, a la doctora Constanza - Peña, quien con su gran capacidad científica e intelectual, constituyó invaluable aporte para perfeccionar mis conocimientos y complementar la investigación que fue base fundamental de esta monografía.

Bogotá, noviembre 25 de 1987

Doctora
MARISOL ARANGO DE LEON
Decana Facultad de Odontología
COLEGIO ODONTOLOGICO COLOMBIANO
Ciudad

Ref.: Monografía de Grado.

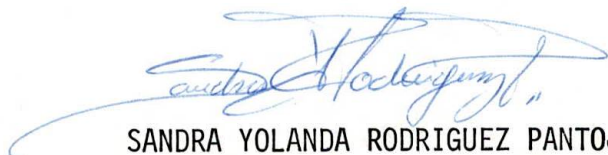
Apreciada doctora:

Para su consideración y del Departamento de Investigaciones, adjunto a la presente, el trabajo monográfico titulado "LA DIFTERIA", en cumplimiento de uno de los requisitos necesarios para optar el título de Odontólogo de la Facultad que usted tan dignamente dirige.

Cabe anotar, que la asesoría científica del mencionado trabajo, estuvo a cargo de la doctora Constanza Peña, Docente de la Facultad en el área de Microbiología.

Por su positiva apreciación y calificación que merezca mi esfuerzo, presento mis más sinceros reconocimientos.

Cordialmente,



SANDRA YOLANDA RODRIGUEZ PANTOJA

Bogotá, noviembre 27 de 1987


Doctora
Marisol Arango de León
Decano Facultad de Odontología
Colegio Odontológico Colombiano
Ciudad

Apreciada Doctora

Al haber asesorado y revisado la monografía LA DIFTERIA presentada por la estudiante Sandra Rodríguez, considero que ha sido un buen trabajo por parte del estudiante en mención, ya que fueron varios los días dedicados para realizar una buena revisión bibliográfica con el fin de recopilar todo el material tanto escrito como de diapositivas aquí presentado.

Agradeciendo su colaboración.

Atentamente,



Constanza Peña Torres

A mis padres, por su continua colaboración
y entendimiento, a mis hermanas por sus es
tímulos permanentes, quienes posibilitaron
el logro de esta meta.

A C.M.D.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Capítulo 1. DEFINICION	1
Capítulo 2. ETIOLOGIA - HISTORIA	2
Capítulo 3. GENERALIDADES DE LAS CORYNEBACTERIAS	3
3.1 ORGANISMOS TIPICOS	3
3.2 MORFOLOGIA E IDENTIFICACION	4
3.3. CULTIVO Y CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS	4
3.4 CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO	5
3.5 RESISTENCIA	5
3.6 VARIACION Y CONVERSION	8
3.6.1 Difteroides	8
3.6.2 Ecología	9
3.7 ESTRUCTURA ANTIGENICA	10
3.7.1 Antígeno K	10
3.7.2 Antígeno O	11
3.8 PATOGENIA	11
Capítulo 4. DETERMINANTES DE LA PATOGENICIDAD	14
4.1 INVASIVIDAD	14
4.2 EXOTOXINA	14
4.2.1 Patología de la antitoxina	15
4.3 LISOGENIZACION Y PRODUCCION DE LA TOXINA	16
4.4 REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN TOX	17
4.5 PROPIEDADES	20

	Pág.
4.6 MODO DE ACCION	20
4.7 INCORPORACION A CELULAS EUCARIOTICAS	23
4.8 SUSCEPTIBILIDAD DEL HUESPED	24
4.9 ANTITOXINA	24
4.10 TOXOIDE	25
Capítulo 5. PATOLOGIA	26
Capítulo 6. INFECCIONES CLINICAS	27
6.1 MANIFESTACIONES CLINICAS	27
6.2 ASPECTOS BUCALES	28
6.3 TIPOS DE DIFTERIA	29
6.3.1 Difteria nasal anterior y difteria cutánea	29
6.3.2 Difteria amigdalar	30
6.3.3 Difteria laríngea y faríngea	30
6.4 ENFERMEDAD RESPIRATORIA	30
6.5 ENFERMEDAD EXTRARESPIRATORIA	31
6.6 PATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD	31
Capítulo 7. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	33
7.1 TOMA DE MUESTRAS	33
7.2 FROTIS	33
7.3 CULTIVO	34
7.3.1 Prueba in vivo	34
7.3.2 Prueba in vitro	35
7.3.3 Prueba del cultivo en tejido	36
Capítulo 8. RESISTENCIA E INMUNIDAD	37
8.1 TITULACION DE LA ANTITOXINA EN EL SUERO	37
8.2 REACCION DE SHICK	37
8.2.1 Reacción positiva	38

	Pág.
8.2.2 Reacción negativa	38
8.2.3 Pseudoreacción	39
8.2.4 Reacción combinada	39
Capítulo 9. COMPLICACIONES	40
Capítulo 10. PORTADORES	41
Capítulo 11. TRATAMIENTO	44
11.1 ANTITOXINA	44
11.2 QUIMIOTERAPIA	45
Capítulo 12. PREVENCIÓN	46
12.1 INMUNIDAD	46
12.2 INMUNIZACIÓN ACTIVA	46
12.2.1 Toxoide líquido	46
12.2.2 Toxoide precipitado con alumbre	46
12.2.3 Mezclas de toxina-antitoxina	47
12.3 PROFILAXIS DE CONTACTO	47
12.4 CONTROL	47
Capítulo 13. EPIDEMIOLOGÍA	49

INDICE DE DIAPOSITIVAS

- No. 1 Vista microscópica del bacilo "corynebacterium diphtheriae".
- No. 2 Lesiones en paladar.
- No. 3 Lesiones en lengua.
- No. 4 Lesiones en región amigdalina.
- No. 5 Lesiones de la difteria cutánea en región de mano.
- No. 6 Lesiones de la difteria cutánea en región de pierna.
- No. 7 Lesiones de la difteria cutánea en región de pie.
- No. 8 Lesiones de la difteria cutánea en región cervical.
- No. 9 Lesiones de la difteria cutánea en región cervical.
- No. 10 Vista de pulmones de una persona que murió por causa de la difteria.

INDICE DE GRAFICAS

	Pág.	
Fig. 3-1	Corynebacterium diptheriae en cultivo de Loeffler.	6
Cuadro 3-1	Producción de ácido por parte de corinebacterium a partir de carbohidratos.	7
Fig. 4-1	Mapa de genomas vegetativos y profagos del fago beta y la disposición del tox en el genoma bacteriófago.	18
Fig. 4-2	Regulación a nivel molecular de la producción del gen tox.	21
Fig. 4-3	Representación de la toxina diftérica en asociación con la membrana celular.	22

OBJETIVOS

Con el presente trabajo se ha querido mostrar una información precisa y detallada desde el punto de vista microbiológico hacia el aspecto médico y odontológico, capítulos importantes en el campo de la infectología y quimioterapia; sin embargo, el tema no solo está encaminado a aquellas personas interesadas en ramas de la odontología específicas, sino también a la de las ciencias básicas.

Otro propósito es dar a conocer información básica para la formación de un trabajador de la salud, como es el odontólogo y la importancia en dar un diagnóstico temprano y certero en una patología que si bien no es muy frecuente, se nos puede presentar en el momento menos pensado, ya que sus medios de prevención a pesar de ser eficaces para la mayoría de la población, algunos miembros de ella pueden presentar la enfermedad a pesar de estar inmunizados, si esto ocurre y en un momento dado nosotros estamos en contacto con ellos, debemos estar preparados para hacer un diagnóstico diferencial, ya que esta patología en especial "La Difteria", presenta sus síntomas tempranos en nuestro campo de acción, La Boca.

Por último, debemos tener en cuenta la información didáctica para complementar nuestros conocimientos generales y específicos en la Odontología.

LA DIFTERIA

CAPITULO I

DEFINICION

La difteria es el prototipo de una enfermedad toxigénica, o sea una infección aguda causada por cepas de corynebacterium.

CAPITULO 2

ETIOLOGIA - HISTORIA

La Difteria es causada por el *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, esta enfermedad en particular, es el modelo para notar la manera de enfatizar la importancia de la investigación básica para obtener soluciones prácticas en problemas clínicos. La difteria se determinó como entidad clínica específica, por primera vez en 1826 luego de la publicación de la clásica monografía de Pierre Bretonneau, pero su etiología bacteriana no se estableció hasta 1888. Klebs ya había descrito más tempranamente los bacilos característicos en las pseudomembranas de pacientes diftéricos y Löffler había aislado el microorganismo en cultivos puros, pero la total comprensión de la Patogenia de la infección se obtuvo sólo con el descubrimiento efectuado por Roux y Yersin de una exotoxina soluble en los filtrados de los cultivos. De allí, el continuo estudio hasta el descubrimiento de una toxina y un toxoide, sustancias éstas que han sido utilizadas en la inmunización activa y pasiva contra la enfermedad.



CAPITULO 3

GENERALIDADES DE LAS CORYNEBACTERIAS

La posición taxonómica de estos microorganismos no ha sido precisada aún; sin embargo, estas especies incluidas entre el grupo de bacterias corineformes han sido distribuidas en tres divisiones, así: parásitos de animales y humanos, corinebacterias patógenas para las plantas y corinebacterias no patógenas.

3. 1 ORGANISMOS TIPICOS

La familia de las corynebacteriaceae comprende los géneros corynebacterium, listeria y erysipelothrix. Estos son bacilos aerobios, gram-positivos, no esporulados, que poseen un alto grado de pleomorfismo, tanto en lo referente a sus características bioquímicas como en los cuadros clínicos que producen.

El grupo de los corynebacterium son bacilos aerobios, inmóviles, catalasa positivos, pleomórficos y con segmentos que se tiñen irregularmente, con el azul de metileno. Forman parte de la flora normal de la piel, intestino y mucosas.

El corynebacterium diphtheriae es la especie más típica de su género y es el único patógeno humano importante del grupo de las corinebacterias, siendo como anteriormente se mencionó, el agente causal de la difteria. El grupo de los corynebacterium diphtheriae también incluye cierto número de saprófitos inofensivos pobremente descritos, que con frecuencia se encuentran en la superficie de membranas mucosas, estos organismos son llamados difteroides, de los cuales se creía no producían patologías en el hombre; si bien hoy se considera que pueden provocar infecciones graves (C. Ulcernas, C. ovis, C. Bovis, C.

Vaginale).

Las corinebacterias taxonómicamente se relacionan con las microbacterias y nocardias, debido a similitudes en sus componentes de la pared celular y presentan reactividad cruzada con éstas.

Los glucopéptidos de los tres géneros contienen ácido meso- , - diamino pimélico. La arabinosa y la galactosa son los azúcares principales de su polisacárido de pared. Las corinebacterias contienen también considerables cantidades de ácidos micólicos en los lípidos asociados con la envoltura externa. Los ácidos micólicos que se encuentran en las corinebacterias son similares a los grandes ácidos beta-hidroxigrasos y - ramificados saturados de las microbacterias pero contienen menos átomos de carbono.

3.2 MORFOLOGIA E IDENTIFICACION

El *Corynebacterium diphtheriae* es un microorganismo con forma de bastón, delgado, gran positivo que no es ácido-resistente ni forma esporas. La longitud de las células de 1.5 a 5 μm y de diámetro miden de 0.5 a 1 μm presentan dilataciones irregulares características en uno de sus polos, lo cual les da una apariencia de mazo; irregularmente distribuidos dentro del bacilo (frecuentemente cerca de los polos), se encuentran gránulos, los cuales se tiñen intensamente con los colorantes de anilina (gránulos metacromáticos), dando al bacilo una apariencia de rosario.

3.3 CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS

Característicamente, en frotis teñidos aparecen como empalizadas o células individuales, formando ángulos agudos unas con otras en formaciones V o L. En los cultivos raramente se observan ramificaciones verdaderas; sin embargo, se les ha denominado de acuerdo a su apariencia, for

maciones en caracteres chinos, que son causadas por el "movimiento en saltos" que se producen cuando dos células se dividen.

Cuando crecen en medios nutricionalmente completos con su tasa máxima, los bacilos diftéricos muestran una forma uniforme. Sin embargo, cuando crecen en medios sub-óptimos, como el suero coagulado de Loeffler o medio con huevo coagulado de Pai, las células son pleomórficas.

El siguiente aspecto en dicho medio ayuda a la diferenciación del *Corynebacterium diphtheriae* en los tres principales grupos de colonias:

(1) Var *gravis*: colonias no hemolíticas, grandes, planas, de color gris a negro con superficie roma o irregular y estriada. (2) Var *mitis*: colonias hemolíticas pequeñas o intermedias, negras, brillantes o lustrosas y convexas. (3) Var *intermedius*: son colonias pequeñas no hemolíticas con características entre los dos extremos, como lisas o rugosas. En caldo, las cepas de la var *gravis* tienden a formar partículas, las cepas de la var *mitis* crecen en forma difusa y las de var *intermedius* dan lugar a un sedimento granuloso. (La figura 3-1 muestra el *Corynebacterium* en cultivo de Loeffler).

3.4 CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO

Las corynebacterias crecen en la mayoría de los medios de cultivo ordinarios. En medio de suero de Loeffler, las corynebacterias crecen mucho más rápidamente que otros microorganismos patógenos del sistema respiratorio y la morfología del germen es típica en los frotis. Producen ácido, pero no gas, a partir de algunos carbohidratos, así como se demuestra en el cuadro 3-1.

3.5 RESISTENCIA

Las corynebacterias tienden al pleomorfismo en sus formas microscópica

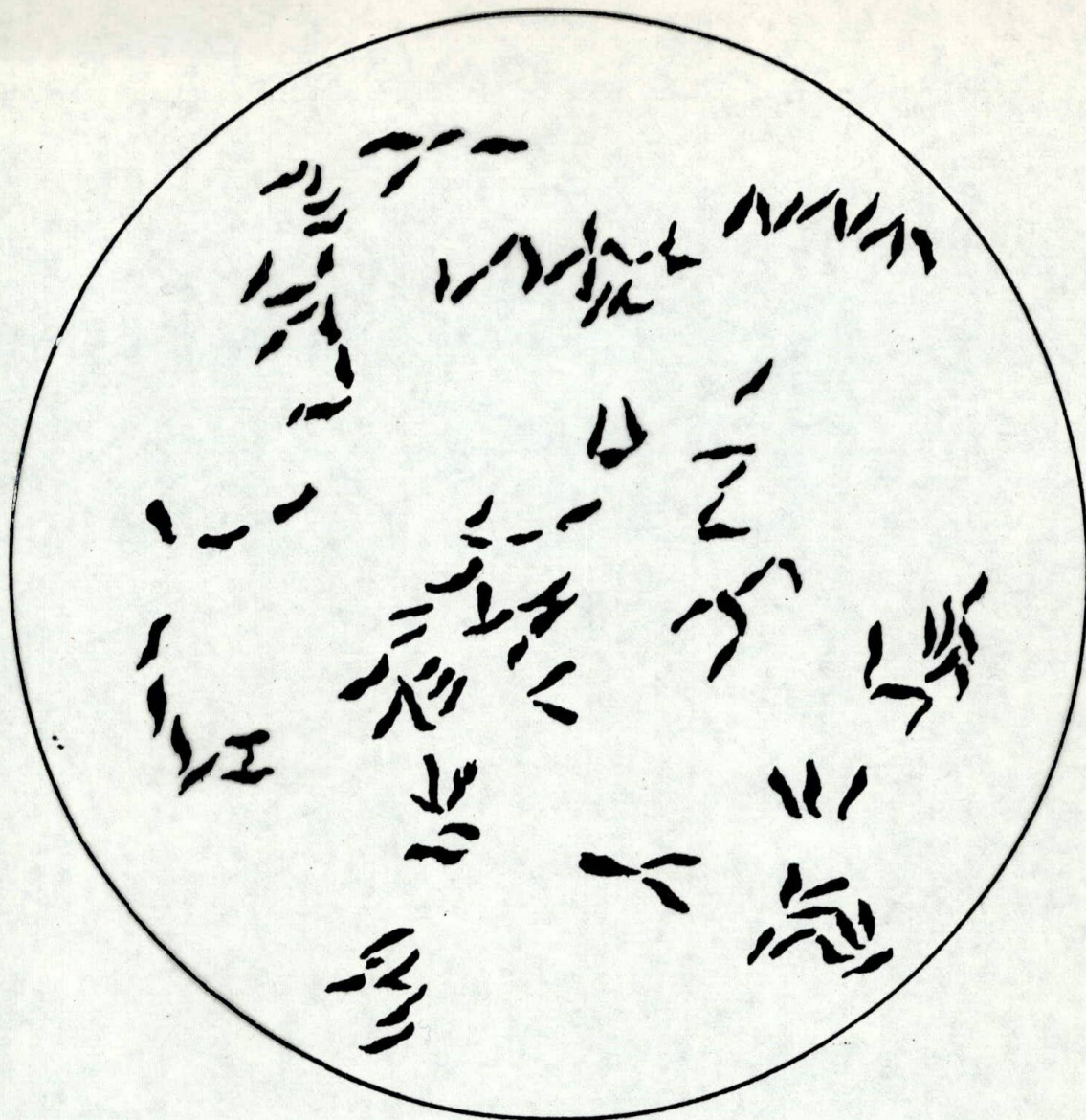


FIGURA 3-1

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE A PARTIR DE UN CULTIVO EN MEDIO DE LOEFFLER

CUADRO 3 -1

	Almidón	Glucosa	Sacarosa
<i>Corinebacterium diphtheriae, gravis</i>	+	+	-
<i>Corinebacterium diphtheriae, mitis</i>	-	+	-
<i>Corinebacterium pseudodiphtheriticum</i>	-	-	-

y colonial, habiéndose descrito la variación de formas lisas a rugosas. Las variantes de las cepas toxígenas a menudo son atoxígenas; cuando algunas cepas atoxígenas de bacilo diftérico son infectadas, con bacteriófagos obtenidos de ciertos bacilos diftéricos toxígenos, la progenie de las bacterias expuestas, es lisógena y toxígena y esta cualidad es subsiguientemente hereditaria. Cuando se hacen subcultivos seriales de bacilos diftéricos toxígenos en antisuero específico, tienden a volverse atoxígenos. De esta manera la adquisición del fago conduce a la toxigenicidad (conversión lisógena). La producción real de toxina ocurre tal vez sólo cuando el profago de *Corynebacterium diphtheriae* lisógeno es inducido y lisa la célula. Mientras que la toxigenicidad se encuentra bajo el control del gen del fago, la virulencia (invasividad) se encuentra bajo el control del gen bacteriano.

3.6 VARIACION Y CONVERSION

3.6.1 Difteroides.

Son también llamadas formas no toxicógenas, como su nombre lo indica, los difteroides son bacilos que semejan a los de la difteria. La diferencia fundamental es que no producen toxina. Forman parte de un grupo que aún no se ha clasificado taxonómicamente, las pruebas bioquímicas de los difteroides anaerobios no permiten clasificarlos en ninguna otra de las especies reconocidas, aunque las pruebas serológicas muestran una relación definitiva con el grupo de las corynebacterias.

Hasta hace algún tiempo se consideraba que los difteroides no eran patógenos para el hombre. Sin embargo, hoy se sabe que es

tos microorganismos omnipresentes, que a menudo contaminan los cultivos, pueden también provocar enfermedades graves. La endocarditis es la infección más frecuente y grave originada por estos gérmenes (más de 40 casos comunicados), y si bien puede afectar válvulas naturales, lo más habitual es que aparezca sobre válvulas artificiales. En tal caso, la mortalidad alcanza, cifras del 50 al 70% de casos. Se han comunicado casos de meningitis, neumonía, osteomielitis y abscesos encefálicos y hepáticos provocados por corinebacterias no diftéricas (*C. equi* y *C. pyogenes*). *C. ovis* produce linfadenitis granulomatosa (pseudotuberculosis); *C. Vaginale* (antes denominado *Haemophilus vaginalis*) se ha propuesto como un posible agente causal de la vaginitis y *C. ulcerans* es capaz de provocar lesiones cutáneas similares a las producidas por el *C. diphtheriae*, también encontramos el *C. xerosis*, *C. Renale* y el *C. pseudodiphthericum*. Los difteroides anaerobios (*propionibacterium acnes*) regularmente residen en la piel, ellos pueden participar en la patogénesis del acné. Producen liposas que desdoblan y liberan a los ácidos grasos pueden producir inflamación y contribuir al acné.

3.6.2 Ecología.

Los difteroides se encuentran en la boca, garganta, conjuntiva, piel y en las regiones genitales de personas aparentemente sanas. En la boca y en la saliva se les encuentra en el 67%. En sus características biológicas son heterogéneos, pero la mayoría son sacarolíticas. También se les aísla de la pulpa dental infectada y de una gran proporción de canales radiculares infectados. En algunos casos, se han aislado difteroides de

los hemocultivos tomados a enfermos de endocarditis bacteriana subaguda. Aunque algunos resultados bacteriológicos pueden haberse originado por contaminaciones de la piel al momento de tomar la muestra, probablemente cierta proporción de los aislamientos sí corresponda a la causa de la endocarditis.

3.7 ESTRUCTURA ANTIGENICA.

Todas las toxinas diftéricas son inmunológicamente idénticas. Sin embargo, el *Corynebacterium diphtheriae* es una especie antigénicamente heterogénea. En las pruebas de aglutinación con suspensiones de células completas, se observa un gran número de tipos serológicos. Los tres tipos principales de colonias, *gravis*, *mitis* e *intermedius*, reflejan diferencias serológicas así como en la superficie celular y constituyen los principales biotipos del microorganismo; dentro de cada uno de estos tipos se encuentra un grupo más o menos separado de serotipos - aglutinantes. También se ha detectado diferencias adicionales en los componentes de la superficie celular por medio de pruebas más sensibles de tipificación con bacteriófagos y producción de bacteriocina. Sin embargo, generalmente no se emplean pruebas serológicas en la identificación. La toxina diftérica contiene por lo menos cuatro determinantes antigénicos.

3.7.1 Antígeno K.

Los antígenos responsables de la especificidad de tipo de las cepas del *Corynebacterium diphtheriae* son proteínas termolábiles, los antígenos K, localizados en las capas superficiales de la pared. Estos antígenos desempeñan un importante papel en la inmunidad antitóxica.

La aparición de tipos antigénicos diferentes de *Corynebacterium diphtheriae* probablemente explica la aparición de difteria, en individuos inmunizados que presentan un nivel detectable de antitoxina circulante. Los antígenos K en la superficie, junto con el factor glucolípido, son los principales determinantes de la invasión y virulencia de los bacilos diftéricos.

3.7.2 Antígeno O.

El antígeno O, termoestable, del *Corynebacterium diphtheriae* es un antígeno del grupo común a las corynebacterias parásitas del hombre y los animales. Es un polisacárido que contiene arabinogalactanos y es el antígeno responsable de la reactividad cruzada con micobacterias y nocardias. Las células de corynebacterias y sus componentes subcelulares son excelentes antígenos. Cuando se administran a animales con agentes inmunizantes, también actúan como adyuvantes.

3.8 PATOGENIA

En los pacientes con inmunosupresión, varias de las especies de corynebacteria pueden hacerse invasivas y producir bacteremia, la cual se acompaña de una elevada tasa de mortalidad, especialmente durante los períodos de granulocitopenia.

El principal microorganismo del grupo patógeno para el hombre es el *Corynebacterium diphtheriae*. En la naturaleza, el *Corynebacterium diphtheriae* se encuentra en el sistema respiratorio, en las heridas o en la piel de personas infectadas o de portadores, en superficies mucosas de los portadores normales. La exposición al bacilo diftérico especialmente en adultos, provoca una infección asintomática que

suele ser suficiente para establecer una inmunidad mediante la generación de antitoxinas circulantes.

A partir de ahí, los bacilos se diseminan por gotitas o por contacto directo a los individuos susceptibles. Los bacilos virulentos crecen en las mucosas y aparecen las manifestaciones graves de la enfermedad que se deben a una potente toxina elaborada por los bacilos.

La exotoxina es elaborada por todos los *Corynebacterium diphtheriae* toxígenos. La producción in vitro depende grandemente de la concentración de hierro; la producción de toxina es óptima con 0.14 ug. de hierro/ml. de medio, pero es virtualmente suprimida con 0.5 ug./ml. Otros factores que influyen en el rendimiento de toxina in vitro son la presión osmótica, la concentración de aminoácidos, el PH y la disponibilidad de fuentes de carbono y de nitrógeno adecuadas. Los factores que controlan la producción de toxina in vitro no están bien entendidos.

La toxina diftérica es un polipéptido termolábil con peso molecular de 62,000, y solo son capaces de producirlo las cepas de *Corynebacterium diphtheriae* infectadas por un bacteriófago lisogénico.

La toxina puede ser letal en la dosis de 0.1 ug/kg.

Al fragmentar sus enlaces disulfuro, la molécula puede fragmentarse en dos. Estos fragmentos poseen funciones diferentes. El fragmento B (peso molecular 38.000), carece de actividad independiente o intrínseca pero es el responsable del transporte de la toxina al interior de las células; el fragmento A, en cambio, es la porción tóxica y es capaz de inhibir la prolongación de las cadenas polipéptidicas

en presencia de dinucleotido de adenina nicotinamida (NAD), mediante la inactivación del factor de estiramiento o alargamiento EF-2 (anteriormente llamado Transferasa II). Este factor es requerido para que se produzca la translocación del RNA polipeptídico de transferencia desde el lugar donde acepta aminoácidos o sea el receptor hasta la zona del ribosoma eucariótico donde los dona. Entonces el fragmento A de toxina inactiva a EF-2 catalizando una reacción que libera nicotinamida libre más un complejo inactivo de EF-2 difosfato de ribosa adenosina; en pocas palabras la toxina impide que se unan a la cadena peptídica nuevos aminoácidos, hecho que impide la síntesis protéica.

Las cepas no toxigénicas del bacilo también pueden producir un polipéptido similar a la toxina diftérica, pero que resulta ser biológicamente inactiva. Tanto las cepas toxigénicas como las que no lo son, producen otras sustancias biológicamente activas, como la hialuronidasa, que contribuyen a la reacción inflamatoria local. Algunos microorganismos de diferente tipo como son las pseudomonas aeruginosas pueden producir una exotoxina con un mecanismo semejante de operación.

No es totalmente cierto que la síntesis protéica sea la responsable de los efectos necróticos y neurotóxicos de la toxina diftérica.



CAPITULO 4

DETERMINANTES DE LA PATOGENICIDAD

4.1 INVASIVIDAD

Dado que las cepas toxigénicas y no toxigénicas del *Corynebacterium diphtheriae*, son capaces de colonizar las mucosas, otros factores, además de la toxina, contribuyen a la invasividad y capacidad para establecerse y mantenerse a sí mismos en el huésped humano. No se ha definido bien la relación precisa de estos rasgos con la patogenia de la enfermedad. Además de los antígenos K de la superficie, los microorganismos también contienen un factor que se considera adyuvante necesario de virulencia. Este factor, un glucolípido tóxico, es un 6.6' diéster trealosa que contiene los ácidos micólicos característicos del *Corynebacterium diphtheriae*, ácido corinemicólico ($C_{32}H_{62}O_3$) y ácido corinemicólico ($C_{32}H_{64}O_3$).

La actividad farmacológica de este factor del *Corynebacterium diphtheriae* es similar a la del factor aislado de *Mycobacterium tuberculosis*. Los factores adicionales, que también se cree que desempeñan un papel en la invasividad del *Corynebacterium diphtheriae*, incluyen neuraminidasa y N-acetilneuraminato liasa. Por degradación de residuos de ácido N-acetilneuramínico clivados de su envoltura mucinosa, estas enzimas podrían proporcionar una fuente fácilmente accesible de energía para las bacterias que habitan las membranas mucosas.

4.2 EXOTOXINA

Muchas enfermedades que ocurren naturalmente, son demasiado complejas a nivel celular para analizar con éxito y definir claramente la lesión

bioquímica primaria, el efecto más impresionante del bacilo de la difteria es la infección del mismo nombre causada por la poderosa exotoxina que produce, siendo entonces el principal determinante bioquímico de la infección y es responsable de esencialmente, todos los efectos patológicos, ya que el bacilo *persé* no es invasivo, pero en su sitio de ubicación (las amígdalas), es donde produce la toxina. La exotoxina pasa al torrente circulatorio y causa intoxicación. Se sabe que las cepas toxígenas del *Corynebacterium diphtheriae* son lisogénicas y que algunas cepas de bacilos difteroides no toxígenas pueden transformarse en toxígenas por conversión al estado de lisogenia.

La toxina produce lesiones en el músculo cardíaco, riñones, hígado y nervios periféricos. El sitio exacto de acción de la toxina sobre el tejido nervioso se desconoce, pero el efecto final es la desmielinización con la parálisis subsecuente. En la infección aguda, la muerte casi siempre está causada por paro cardíaco. Para determinar el mecanismo de acción de la toxina, se han hecho esfuerzos considerables. Ahora se supone que inhibe el crecimiento de las cadenas peptídicas durante su síntesis en las células, lo cual finalmente, puede causar la muerte de la célula.

4.2.1 Patología de la exotoxina.

Después de varios días o semanas, de que se instala el bacilo en la garganta o en otros sitios de la parte alta del aparato respiratorio, se inicia la multiplicación bacteriana con la producción de pequeñas cantidades de exotoxina que causa necrosis de las células epiteliales cercanas. La multiplicación

bacteriana continúa con incremento en la producción de toxina y la necrosis se hace más profunda y se extiende lateralmente. En este caso, se estimula una intensa reacción inflamatoria con migración leucocitaria y diapédesis de eritrocitos, se forma una membrana con participación de las células epiteliales necrosadas, células sanguíneas y fibrina; la membrana cubre típicamente, el área amigdalina y en algunos casos se extiende hasta la faringe y la tráquea. Aunque todas esas lesiones no pueden clasificarse como demasiado graves o importantes, el daño más grave está provocado por la distribución generalizada de la toxina en el torrente circulatorio.

4.3 LISOGENIZACION Y PRODUCCION DE LA TOXINA

La toxina es producida sólo por cepas del *Corynebacterium diphtheriae* infectadas por un bacteriófago moderado que transporta el gen estructural para la producción de toxina. Sin embargo, las cepas no productoras de toxina pueden convertirse al estado lisógeno, productor de toxina, por infección con un bacteriófago tox^+ adecuado. Sin embargo, la conversión en toxigénica no es una propiedad obligatoria de los corinéfangos. Aunque la mayoría de los estudios sobre producción de toxina han sido llevados a cabo con el corinebacteriófago beta, el gen tox ha sido detectado en un cierto número de corinebacteriófagos que difieren tanto genética como serológicamente.

La producción de toxina por una cepa lisogénica no requiere la multiplicación lítica del fago. El gen tox puede expresarse cuando el fago beta está presente en *Corynebacterium diphtheriae* como un fago en re-

plicación vegetativa, como profago, o como un exogenote super infeccioso no replicante en las células lisogénicas. Cuando se examina en condiciones experimentales, la toxina no parece tener ninguna función viral especial. En condiciones naturales, sin embargo, como se encuentra en la nasofaringe humana, el gen tox proporciona valor de supervivencia tanto al fago como a su huésped lisogenizado, *Corynebacterium diphtheriae*.

El corinebacteriófago beta es un fago de tamaño intermedio que contiene ADN de doble cadena, de aproximadamente $2,3 \times 10^7$ daltons de longitud. Su ciclo de vida es similar al del colífago, creciendo productivamente en muchas células infectadas, pero lisogenizando un pequeño número de estas células. La disponibilidad de mutantes fagos, que codifican proteínas antigénicamente similares pero no tóxicas (proteínas crm), ha hecho posible elaborar un mapa de los genomas vegetativos y profagos del fago beta y establecer la posición del tox en el genoma del bacteriófago. El mapa de profago parece ser una permutación cíclica del mapa vegetativo, con el gen tox en un extremo del mapa del profago cerca del sitio de inserción en el cromosoma del huésped, y el gen de inmunidad en el otro extremo del mapa (fig. 4-1). El fago beta se inserta en el cromosoma bacteriano por un mecanismo similar al que ocurre en el fago de la *Escherichia coli*. La posición del gen tox integrado sugiere que puede haber evolucionado de un gen bacteriano.

4.4 REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN TOX

La regulación de la síntesis de toxina diftérica abarca factores genéticos y fisiológicos e involucra a la bacteria y el bacteriófago.

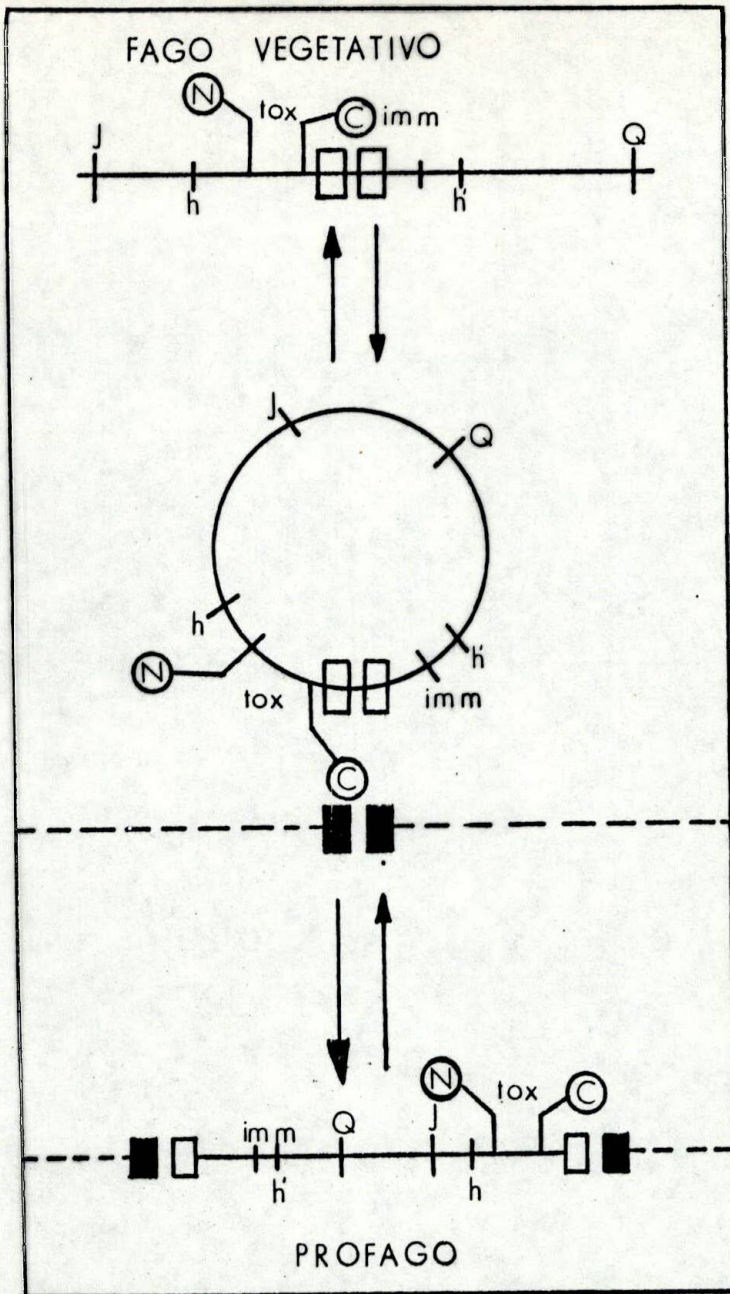


FIGURA 4-1

Orientación del gen *tox* en el bacteriófago beta y profago . En la figura se observa la interconversión del profago y estado vegetativo del fago . El gen *tox* ha sido agrandado y sus límites están definidos por N y C, ubicaciones de los dos codones para los amonócidos N-terminal y C-terminal. ADN del fago (—), "Cromosoma" bacteriano (---), rectángulos representan sitios de unión del fago y la bacteria.

Diferentes cepas de *Corynebacterium diphtheriae* varían enormemente en su capacidad de producción de toxina cuando son infectadas por corinféagos tox⁺ para otra *Corynebacterium diphtheriae*.

El corinféago gamma, un fago no conversor estrechamente relacionado con el fago beta, transporta el gen tox en una forma inactiva. En el fago gamma, hay un genoma completo de fago más una pequeña asa adyacente de ADN bacteriano. Es probable que este ADN extra represente un elemento de inserción o un transposón y que el gen tox del fago gamma sea inactivado por su inserción.

También la producción de toxina está notablemente influenciada por las condiciones ambientales y de los cultivos, especialmente el contenido de hierro del medio. La toxina diftérica sólo se produce en niveles máximos cuando el hierro es el sustrato que limita la tasa de crecimiento. El agregado de hierro a los cultivos sin hierro de *Corynebacterium diphtheriae* lisógena inhibe la producción de toxina casi inmediatamente. El exitoso empleo durante muchos años de la cepa número 8 Park-Williams para la producción comercial de toxina está ligado a su capacidad para crecer en medios que contienen muy bajos niveles de hierro. En tales condiciones, la toxina puede ser responsable de aproximadamente el 5% de la proteína bacteriana total.

A nivel molecular, hay evidencias de que la regulación de la producción de toxina diftérica ocurre en forma independiente de otras funciones del fago y está dirigida a nivel de la transcripción. De acuerdo con el modelo propuesto, el *Corynebacterium diphtheriae*, independientemente de su estado lisogénico, transporta un gen que codi

fica la síntesis del aporepresor tox. En presencia de hierro, se formaría un complejo hierro represor que se uniría específicamente con el locus operador tox del fago beta. En condiciones limitantes de hierro, el complejo hierro represor se disociaría y se des-reprimiría el gen tox (fig. 4-2).

Nada se sabe en relación a la identidad y función en el huésped bacteriano de la proteína represora.

4.5 PROPIEDADES

La toxina diftérica se forma en asociación con la membrana celular y es secretada rápidamente como una única cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 62.000 (fig. 4-3). Ya liberada la molécula de toxina no es tóxica hasta la exposición del sitio enzimático activo por tratamiento leve con tripsina. La molécula activada consiste en dos fragmentos funcionalmente distintos como ya mencionamos anteriormente, el fragmento A y B, unidos por un puente disulfuro. Ambos fragmentos son esenciales para la citotoxicidad. El fragmento B C-terminal (40.700 daltons), se une a receptores específicos en la membrana celular eucariótica y media la entrada del fragmento A N-terminal enzimáticamente activos (21.150 daltons) hacia el citoplasma, donde el fragmento A inhibe catalíticamente la síntesis de proteínas.

4.6 MODO DE ACCION

Al llegar el citoplasma, el fragmento A altera la síntesis de proteínas catalizando la transferasa de la mitad adenosina difosforribosa

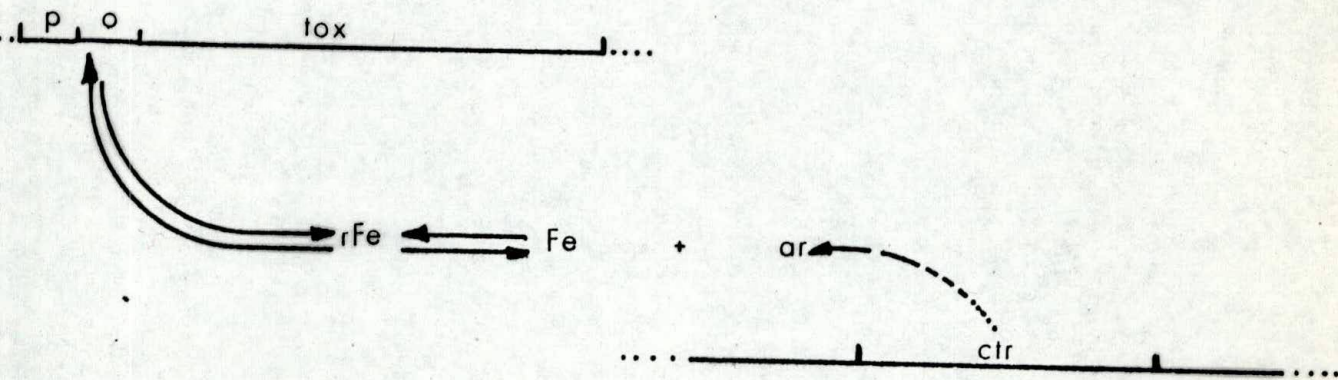


FIGURA 4-2

Modelo hipotético de la regulación corinebacteriana del gen *tox* del corinefago beta. El *C. diphtheriae* transporta la información estructural (*ctr*) para la síntesis de aporepresor tox diftérico (*ar*). En presencia de hierro, se forma un complejo hierro-represor que se uniría al locus operador *tox* del corinefago beta. En condiciones de falta de hierro, el equilibrio variaría hacia la derecha, y el gen *tox* sería desreprimido.

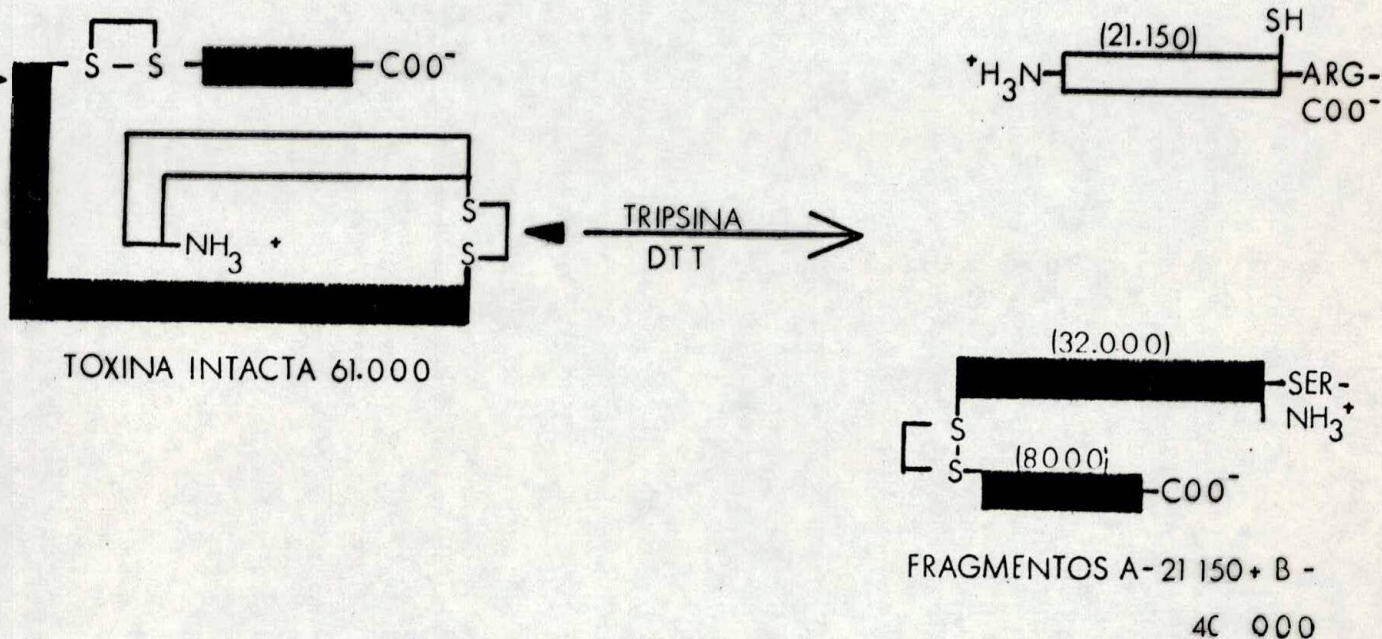


FIGURA 4-3

Diagrama de la toxina diftérica y sus fragmentos. La toxina es liberada hacia el medio de cultivo como una sola cadena polipeptídica. La molécula intacta contiene dos puentes disulfuro. El asa peptídica contenida dentro del primero puente de disulfuro es extraordinariamente sensible al clivaje proteolítico y queda abierta luego de una leve digestión con tripsina. La posterior reducción del desulfuro da como resultado la separación de la toxina mellada en dos fragmentos, A y B.

(ADRP) del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) hacia la peptidil-ARNT translocasa eucariótica, factor de elongación 2 (FE2). Este difosfato de adenosina (ADP) -ribosilación de FE2 es el blanco primario de la toxina diftérica.

Aunque la reacción es reversible, su equilibrio a un PH fisiológico se ubica bastante hacia la derecha. Sólo el FE2 soluble puede servir como sustrato y una vez fijado a los ribosomas no puede ser ADP-ribosilado.

El sitio específico del FE2 al cual se une covalentemente la ADPR, es un aminoácido único (diftamida) que es el resultado de una modificación postranslacional reciente de un residuo de histidina. No se ha hallado diftamida en ninguna otra proteína eucariótica. La toxina no tiene efecto sobre la elongación de la cadena polipeptídica, en sistemas procarióticos o mitocondrias en las cuales una proteína diferente, el factor de elongación G (FEG), reemplaza al FE2.

4.7 INCORPORACION A CELULAS EUCARIOTICAS

Para que la toxina diftérica pueda expresar su toxicidad, el fragmento A debe cruzar la bicapa lipídica de la célula para llegar al citosol. Esto es facilitado por el fragmento A hidrófilo enzimáticamente activo. El fragmento B reconoce e interactúa con receptores específicos de superficie que están presentes en la membrana plasmática. No se ha identificado el receptor de membrana específico ni el mecanismo preciso de entrada del fragmento A en la célula. Algunas teorías para explicar el proceso de transporte sugieren que el fragmento B forma un canal en la membrana plasmática a través del cual pasa el

fragmento A, o que la toxina es primero endocitosada y luego de alguna forma escapa hacia el citoplasma desde la vesícula intracelular. En algún punto, antes o durante la traslocación, se requiere la reducción disulfuro y el clivaje de una o más uniones peptídicas para separar los fragmentos A y B.

4.8 SUSCEPTIBILIDAD DEL HUESPED

La susceptibilidad de los animales a la toxina diftérica varía enormemente. Dosis de 160 ng/kg son letales para el hombre, conejos, cobayos y pájaros. Sin embargo, las ratas y ratones son altamente resistentes, a menos que la toxina se administre por vía intracerebral.

4.9 ANTITOXINA

Ambas mitades A y B de la toxina contienen cierto número de determinantes antigénicos. La antitoxina consiste en una mezcla de anticuerpos específicos para diferentes partes de la molécula de toxina. En la toxina nativa o toxoide, gran parte de los determinantes antigénicos en el fragmento A están profundamente enterrados y no están disponibles para estimular la producción de anticuerpos ni para participar en la precipitación de anticuerpos. Aunque los anticuerpos anti-A inhiben la actividad enzimática de la toxina, no protegen a los animales o células contra la acción letal de la toxina. Sin embargo, los anticuerpos contra el fragmento B neutralizan la toxina con gran eficacia, avalando la teoría de que la antoxina actúa compitiendo con la toxina por los receptores de superficie en células eucarióticas sensibles y que el fragmento B es necesario para la adherencia inicial.

Recientemente se ha logrado la inmunización antitóxica activa contra

la toxina diftérica, por medio de un oligopéptido sintético. El antígeno sintético es un tetradecapéptido que consiste en el asa de 14 aminoácidos subtendidos por el puente disulfuro más cercano al extremo "N" de la molécula. Este tetradecapéptido, cuando se une covalentemente con un portador, puede originar, en cobayos, anticuerpos que no sólo se unen específicamente con la toxina, sino que neutralizan sus efectos dermonecrótico y letal. Este representa el primer ejemplo de inmunización activa exitosa contra una toxina bacteriana-letal usando un antígeno sintético.

4.10 TOXOIDE

El agregado de bajas concentraciones de formaldehído a la toxina diftérica, destruye su toxicidad y la convierte en toxoide. La detoxificación por formaldehído altera tanto la actividad enzimática del fragmento A como las propiedades de unión del fragmento B. Las alteraciones pueden deberse ya sea a la modificación química de residuos esenciales en la toxina o a unión cruzada interna de lisina y tirosina por medio de puentes de metileno. El aumento de la estabilidad y la resistencia a la proteólisis del toxoide se atribuyen a los efectos de unión cruzada. El toxoide no puede ser clivado en fragmentos A y B. No posee actividad ADP-ribosilante y no se une a membranas celulares de células sensibles.

CAPITULO 5

PATOLOGIA

La toxina se absorbe en la mucosa y causa la destrucción del epitelio y una respuesta superficial inflamatoria. El epitelio necrótico queda incluído en la fibrina y los leucocitos y eritrocitos exudados de modo que se forma una "pseumembrana" grisácea generalmente sobre las amígdalas, la faringe o la laringe. Cualquier intento para remover las pseudomembranas expone y rompe los capilares provocando sangrado. Los ganglios linfáticos del cuello aumentan de tamaño y puede haber edema marcado de todo el cuello. Los bacilos diftéricos dentro de la membrana continúan produciendo activamente la -toxina; esta es absorbida y da lugar a lesiones tóxicas a distancia, particularmente degeneración granulomatosa, infiltración grasa y necrosis del miocardio, hígado, riñones y suprarrenales, en ocasiones complicadas con hemorragias de consideración. La toxina también produce lesión nerviosa, dando lugar con frecuencia a parálisis del velo del paladar, de los músculos oculares o de las extremidades.

La difteria de las heridas o de la piel ocurre primordialmente en los trópicos. Puede formarse una membrana sobre una herida infectada, la cual no cicatriza; sinembargo, la absorción de toxina es generalmente mala y los efectos generalizados son despreciables. La "virulencia" del bacilo diftérico se debe a la capacidad de producir una infección, de crecer rápidamente u de elaborar prontamente la toxina, la cual es absorbida con efectividad. El *Corynebacterium diphtheriae* no invade activamente los tejidos profundos y prácticamente nunca entra en la corriente sanguínea.

CAPITULO 6

INFECCION CLINICA

6.1 MANIFESTACIONES CLINICAS

Las manifestaciones clínicas del huésped dependen del estado inmunitario, de la localización de la infección y de la capacidad toxigénica del microorganismo. La primera manifestación local es una respuesta inflamatoria local intensa, seguida de la aparición de una espesa membrana de fibrina, detritus celulares, leucocitos y eritrocitos; a medida que se absorbe la toxina y pasa a la circulación se presenta la sintomatología generalizada así: la infección típica se localiza en la parte superior del tracto respiratorio, su inicio es aparentemente benigno con dolor de garganta y fiebre, llamada faringitis con fiebre, cereales y pueden presentarse vómitos. El aliento tiene un olor desagradable sin que sea éste un signo patognomónico. A este estado febril le sigue pronto un estado de postración y disnea provocado por la obstrucción causada por la membrana; esta obstrucción puede incluso llegar a provocar sofocación, sino es corregida, puede ser necesaria la intervención para hacer la traqueostomía para evitar la asfixia. Aparecen alteraciones en el ritmo cardíaco que indican la iniciación del daño en el corazón. Posteriormente, siguen daños en la visión, deglución y movimiento de los miembros superiores e inferiores.- En los casos graves hay inflamación marcada y edema de cuello. En los individuos previamente inmunizados con toxoide diftérico, suelen presentarse eritema y congestión de las vías nasales, paladar, faringe y amígdalas, sin que se llegue a formar la típica membrana grisácea de la difteria. Existe amplia correlación entre el tipo de *Corynebacterium diphtheriae* y la gravedad de la enfermedad. En general, las infecciones por la var gravis,

tienden a ser más intensas que las de var mitis, con un índice de mortalidad más elevado; así, la mortalidad de 5 a 10% en la totalidad de los casos no ha cambiado mucho en los últimos 50 años.

6.2 ASPECTOS BUCALES

Las infecciones diftéricas confinadas exclusivamente a la cavidad oral raras veces aparecen. Tales lesiones se han encontrado en las comisuras de la boca y en la piel de la cara, especialmente si hay lesión previa o alguna manifestación herpética local. Las lesiones también se han visto en la mucosa bucal y labial, en la lengua, el paladar blando; generalmente se presenta la "membrana diftérica" que ha comenzado en las amígdalas y puede terminar confluyendo en toda la superficie de la mucosa oral, otro sitio de común elección para las lesiones, es la zona de erupción de la primera dentición y en alveolos desocupados luego de una exodoncia. Las infecciones bucales se presentan en general, después de una lesión traumática o, secundariamente a una difteria grave de las fauces. La difteria faríngea provoca inflamación del paladar blando que puede interpretarse erróneamente como un absceso amigdalino. En algunos casos, la inflamación del cuello y de la región submaxilar crece al grado de confundirla con una celulitis difusa, como la que se observa en la angina de ludwig o en un caso, una infección de origen dental.

Esta falsa membrana es un exudado grisáceo, espeso, fibrinoso, de aspecto gelatinosa, leucocitos y bacterias se encuentran en las zonas necróticas no ulceradas de la mucosa, cubre amígdalas, faringe y laringe, tiende a adherirse y a formar una superficie sangrante al ser desprendida. El paladar blando puede estar cubierto en su totalidad y quedar paralizado en la tercera a quinta semana de evolución de la en

fermedad, los pacientes tienen una voz nasal peculiar y puede producirse la regurgitación nasal de los líquidos al ser bebidos, la voz nasal se produce por la ausencia del cierre labial adecuado y la circulación orofaríngea está alterada. La mayoría de los estudios concernientes a la difteria demuestran que los casos de parálisis son más frecuentes en climas templados; estos fenómenos paralíticos tienden a limitarse a los pares craneanos. Como regla, la parálisis se inicia y queda limitada a la úvula y a los músculos del paladar. Resulta imposible para el paciente, silbar o inflar los carrillos. La parálisis faríngea se presenta después que la palatina. Es una complicación muy grave, ya que la deglución se dificulta y existe un gran riesgo de que se presente neumonía por aspiración. Los músculos de la lengua y los faciales rara vez están afectados. Se piensa que los fenómenos de la parálisis se deben a la acción de la toxina sobre las sinápsis neuromusculares, se supone que la toxina llega hasta las terminaciones nerviosas por vía sanguínea. Sin embargo, es posible que, en los casos de difteria de las fauces, el acceso sea directo.

6.3 TIPOS DE DIFTERIA

6.3.1 Difteria nasal anterior y difteria cutánea.

La difteria cutánea tiene su máxima frecuencia en las regiones tropicales. Las lesiones características son úlceras crónicas persistentes, localizadas en la cara y extremidades superiores, pero la presencia de una sobreinfección bacteriana modifica a veces las manifestaciones clínicas de esta modalidad de difteria. Los síntomas generales y las complicaciones cardíacas y neurológicas son poco frecuentes. La difteria nasal se caracteriza por la aparición de una secreción nasal serosanguinolenta.

ta en forma de erosiones y costras alrededor de las ventanas nasales y del labio superior. A veces se producen conjuntivitis diftérica y úlceras corneales; asimismo, se han comunicado casos de otitis media diftérica primaria.

6.3.2 Difteria amigdalар.

El comienzo de la difteria amigdalар suele ser repentino. Al principio, aparece un exudado fino, fácil de quitar, con aspecto de placas discontinuas, sobre una o ambas amígdalas, pero en cuestión de horas se forma una membrana espesa, muy adherente y de color verde grisáceo. En casi todos los casos, el paciente sufre de dolor de garganta y en un 7% de los casos de las series estudiadas, fue el síntoma principal. El 25% de los enfermos presentan tos, ronquera y disfagia.

6.3.3 Difteria faríngea o laríngea.

Las membranas pueden extenderse a las estructuras adyacentes pilares, úvula, paladar blando y pared faríngea. También puede desarrollarse linfadenopatía cervical y tumefacción de las partes blandas, lo que provoca la de un cuello con aspecto de cuello de toro.

La extensión de las lesiones diftéricas por la larínge se presenta en un 25% de casos. Las membranas suelen afectar la epiglottis y, con menor frecuencia, la glotis y estructuras supraglóticas. La ronquera es un síntoma habitual, la aparición de disnea, taquicardia, fiebre y leucocitosis, indican un mal pronóstico.

6.4 ENFERMEDAD RESPIRATORIA

Las manifestaciones clínicas varían dependiendo de la virulencia del

microorganismo, resistencia del huésped y localización anatómica de la lesión. En la difteria amigdalina, la presentación clínica más común, caracterizada en un comienzo brusco, por fiebre moderada, malestar y dolor leve de garganta. Los ganglios linfáticos cervicales aparecen edematizados y sensibles, especialmente cuando hay compromiso de la nasofaringe. La tumefacción puede ser notable constatándose el clásico aspecto en cuello de toro. La extensión desde la nasofaringe hacia la laringe y la tráquea da como resultado una forma muy severa de la enfermedad, en la cual la obstrucción mecánica de la vía aérea por la membrana y edema acompañante introduce el riesgo de asfixia. Se produce el deceso del individuo a menos que se restaure la vía aérea por traqueotomía o intubación.

6.5 ENFERMEDAD EXTRA RESPIRATORIA

Aunque la difteria es una enfermedad habitualmente de las vías respiratorias superiores, pueden ocurrir lesiones primarias o secundarias a otras áreas del cuerpo, la localización más común de la enfermedad extrarespiratoria es la piel, aquí las lesiones aparecen comúnmente en sitio de abrasiones menores como úlceras crónicas que se diseminan y no curan.

6.6 PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

LUego de la exposición del individuo susceptible a *Corynebacterium diphtheriae* hay un corto período de incubación, de 1 a 4 días, en el cual los microorganismos se establecen en las células epiteliales superficiales de las vías aéreas superiores, habitualmente la lesión inicial ocurre en las amígdalas y orofaringe. De allí puede diseminarse a laringe y tráquea. Los microorganismos crecen rápidamente en la le-

si3n local, produciendo una exotoxina causando la necrosis de las c3lulas en el 3rea, produciendo una reacci3n inflamatoria acompa1ada de aparici3n de exudado fibrinoso. A medida que la lesi3n exudativa hace coalescencia, se forma una seudomembrana adherente muy gruesa, que en un principio tiene un aspecto de parches. Es de color gris3ceo negro y contiene adem3s , fibrina, c3lulas epiteliales necr3ticas, linfocitos, polimorfonucleares, eritrocitos y *Corynebacterium diphtheriae*. La seudomembrana se adhiere fuertemente a los tejidos adyacentes, y si se remueve deja una superficie sangrante.

El *Corynebacterium* se limita al epitelio mucoso, rara vez invade tejidos profundos o lesiones en otras partes del cuerpo.

CAPITULO 7

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico definitivo de la difteria requiere el aislamiento en cultivo del microorganismo y la comprobación de que efectivamente produce - toxinas, no obstante ante la presencia de la enfermedad, suele ser necesario el tratamiento basándose exclusivamente en un diagnóstico clínico. Se deben tomar muestras de las lesiones sospechosas, para su observación directa y cultivo. Para la directa las extensiones se tiñen con colorantes de gram y con azul de metileno alcalino. En las extensiones teñidas con azul de metileno alcalino, los bacilos de la difteria aparecen como bastoncillo que muestran hinchazones (gránulos metacromáticos o cuerpos de Babes-Ernst) en uno o dos extremos, lo cual le da apariencia de cuentas de vidrio. Las células se distribuyen en empalizada o en ángulo de V, que recuerdan los caracteres de la escritura china. Esas características son propias del bacilo de la difteria. En las infecciones de las vías respiratorias que pueden estar causadas por microorganismos como estreptococos, bacilos fusiformes y espiroqueta o cándida, las extensiones teñidas son un gran auxilio para considerar esas etiologías.

La toma de muestras y la respuesta del laboratorio son sugeridas cuando existe duda en el diagnóstico definitivo.

7.1 TOMA DE MUESTRAS

Se deben obtener muestras de las fosas nasales con hisopo de algodón o de la garganta y lesión sospechosa, antes de la administración de medicamentos antimicrobianos.

7.2 FROTIS

Los frotis teñidos con azul de metileno alcalino, o la técnica de gram,

muestran bacilos de apariencia de rosario en disposición típica.

7.3 CULTIVO

Sembrar en una placa de agar sangre para detectar, y posiblemente descartar que el proceso no es producido por estreptococos, utilizar medio selectivo para aislar el *Corynebacterium diphtheriae* como el medio de Loeffler y una placa de agar sangre -telurito, incubándose los 3 a 37°C cuando el aplicador de algodón no vaya a ser sembrado rápidamente, debe conservarse humedecido con suero estéril de caballo, para mantener la viabilidad de los bacilos.

En 12-18 horas, el medio de Loeffler puede mostrar microorganismos con características morfológicas de bacilo diftérico, razón por la cual deben buscarse colonias de estreptococos-beta hemolíticos y cualquier colonia negra o grisácea. De 36-48 horas las colonias en telurito son suficientemente definidas como para la identificación del *Corynebacterium diphtheriae*.

Cualquier microorganismo parecido al bacilo de la difteria que se aísle, debe someterse a una prueba de virulencia antes de que el diagnóstico sea definitivo. Las pruebas de virulencia son en realidad, pruebas de toxigenicidad del microorganismo aislado y pueden llevarse a cabo, de tres maneras diferentes:

7.3.1 Prueba in vivo.

Se aconseja la inoculación en animales a los laboratorios que rara vez aíslan el bacilo diftérico. Pueden emplearse conejos o cobayos; un animal es suficiente tanto para prueba como para

prueba como para control. La prueba se lleva a cabo inyectando por vía intradérmica, en el animal afectado, 0,2 ml de un caldo de cultivo de una infusión de 48 horas. Inyectar intraperitonealmente en el cobayo (o en la vena del conejo, oreja), 500 unidades de antitoxina diftérica. Pasados 30 minutos se inyectan por vía intradérmica 0,2 ml de la muestra en el área control opuesta al sitio de la prueba. Las lecturas preliminares se efectúan a las 24 y 48 horas. Si está presente una cepa toxigénica, aparece un área necrótica en 48 a 72 horas en el sitio de la inyección de prueba. En el sitio de control, sólo se desarrolla un nódulo rosado, que no presenta ulceración posterior debido a la administración de la antitoxina.

Otro tipo de prueba consiste en la emulsificación de un cultivo y se inyectan 4 ml por vía subcutánea en cada uno de dos cobayos, uno de los cuales ha recibido 250 unidades de antitoxina contra la difteria por vía intraperitoneal, dos horas antes. El animal no protegido debe fallecer en 2-3 días, en tanto que el animal protegido debe sobrevivir.

7.3.2 Prueba in vitro.

La prueba de la difusión en gel para determinación de la patogenicidad es más rápida que el método in vivo, pero a menos que las placas sean preparadas cuidadosamente, pueden obtenerse resultados falsos negativos. En las pruebas, se colocan tiras de papel de filtro empapadas en antitoxinas en la superficie del medio, con agar suero, y la caja se inocula diseminando una lí_

nea de inóculo perpendicular a la tira. Las cajas deben leerse diariamente durante tres días. Si el microorganismo es toxigénico, a las 48 horas de incubación, aparece una línea de precipitación toxina-antitoxina, que se difundió de las cepas toxigénicas que se extienden en ángulo de 45° desde la intersección de la línea del inóculo con el frente de la antitoxina que difunda desde el papel filtro.

7.3.3 Prueba del cultivo en tejido.

La toxigenicidad de *Corynebacterium diphtheriae* puede mostrarse incorporando bacterias en una capa adicional de agar de extracto de células cultivadas de mono. La toxina producida se difunde dentro de las células y las exterminan.



CAPITULO 8

RESISTENCIA E INMUNIDAD

Ya que la difteria es fundamentalmente el resultado de la acción de la toxina formada por los organismos más que la invasión por ellos, la resistencia a la enfermedad depende principalmente de la cantidad de antitoxina neutralizante específica presente en la sangre y en los tejidos. Generalmente, es cierto que la difteria se presenta solamente en personas que carecen de anticuerpos que tienen menos de 0,01 unidades Lf/ml. Por lo tanto, el tratamiento de la difteria se basa principalmente en la rápida supresión de bacterias productoras de toxinas y la administración temprana de la antitoxina específica que va a actuar contra la toxina formada por los organismos en el sitio de entrada y su multiplicación. Puede haber inmunidad antitóxica pasiva o activa contra la difteria. La cantidad relativa de antitoxina que una persona posee en un momento determinado, se puede presentar en alguna de las dos formas siguientes:

8.1 TITULACION DE LA ANTITOXINA EN EL SUERO

(Este método es muy complicado para ser empleado sistemáticamente):

Se mezcla el suero con cantidades variables de toxina y las mezclas se inyectan a animales susceptibles ; cuanto mayor sea la cantidad de toxina neutralizada, mayor será la concentración de antitoxina presente en el suero.

8.2 REACCION DE SCHIK

Es una reacción cutánea basada en el hecho de que la toxina diftérica es muy irritante cuando se le inyecta intradérmicamente, a menos que sea neutralizada por la antitoxina circulante. (La dosis para la prueba de Schik-STD, del inglés Schik test dose, se definía anteriormente como la 1/50 MLD del inglés, minimal lethal dose, dosis letal mínima

para el cobayo. Debido a la dificultad para la estandarización de la actividad letal de la toxina para el cobayo, se pasó a emplear la prueba de potencia del eritema animal. La STD actualmente se define como la cantidad de toxina estándar que cuando se mezcla con 0.001 unidades de antitoxina diftérica U.S. Estados Unidos - estándar y se inyecta intradérmicamente en un cobayo, induce una reacción eritematosa de 10 mm de diámetro). Cuando se efectúa la prueba de Schick, siempre debe hacerse un control en el otro antebrazo para detectar pseudo-reacciones. Para el control, se emplea una cantidad similar de algún material que ha sido calentado a 60°C durante 30 minutos para destruir la actividad tóxica, ésta en el antebrazo que se ha de utilizar, ya que el otro antebrazo ha sido inoculado por vía intradérmica con la dosis Schick. La reacción debe leerse a las 24 y 48 horas y de nuevo a los 6 días.

8.2.1 Reacción positiva.

Esta indica susceptibilidad a la toxina diftérica, es decir, ausencia de cantidades adecuadas de antitoxina neutralizante, menos de 0.01 unidades Lf/ml de suero. La toxina produce una reacción eritematosa local que llega a su máxima intensidad de 4 a 7 días y se desvanece gradualmente, dejando un área pigmentada de color pardusco. El sitio testigo no muestra reacción alguna.

8.2.2 Reacción negativa.

Indica una cantidad adecuada de antitoxina presente en la sangre siendo ésta de 0.02 a 0.03 unidades Lf/ml de suero. Ninguno de los dos sitios inyectados muestra reacción, luego el individuo es inmune ante situaciones ordinarias de exposición.

8.2.3 Pseudo-reacción.

La reacción de Schick puede estar complicada por la hipersensibilidad del individuo a materiales diferentes de toxina, los cuales están presentes en el material inyectado. Una pseudo-reacción muestra, en ambos brazos, enrojecimiento e hinchazón que desaparece simultáneamente, al segundo o tercer día. Esto constituye una reacción negativa.

8.2.4 Reacción combinada.

Una reacción combinada se inicia con una pseudoreacción, con enrojecimiento e hinchazón en ambos sitios inyectados; sin embargo, la toxina continúa después con sus efectos, en tanto que la apariencia del sitio testigo se hace normal rápidamente. Esto denota hipersensibilidad y relativa susceptibilidad a la toxina.

Estas reacciones probablemente son el resultado de una inyección previa con corinebacterias o inmunización artificial con toxoide. En este caso el individuo no posee antitoxina o solo un bajo nivel de antitoxina en su sangre, o sea que es alérgico. La reacción en el brazo control cede hacia el quinto o sexto día, mientras que el brazo de prueba llega a su máximo en el quinto día y persiste por algunos días más.

CAPITULO 9

COMPLICACIONES

Las complicaciones más serias de la difteria son las que afectan al sistema cardiovascular y nervioso, durante o después suelen presentarse estas complicaciones siendo bastante frecuentes, las anomalías cardíacas aparecen luego de la segunda semana de enfermedad y se observan en aproximadamente el 20% de los pacientes y son responsables de más de la mitad de los decesos. La exotoxina causa degeneración grasa miocárdica, dando como resultado disfunción cardíaca y colapso circulatorio. La lesión miocárdica es reversible y si el paciente sobrevive la recuperación habitual es total. Las características más comunes de la enfermedad cardíaca aparecen alrededor de la primera semana, presentándose arritmias auriculares y ventriculares. El bloque auriculoventricular y el bloqueo de rama izquierda se asocian al 70 a 100% de mortalidad.

La insuficiencia respiratoria por obstrucción de las vías aéreas es una complicación posible en los casos graves de difteria laríngea y faríngea.

La afectación del sistema nervioso es una complicación tardía, que se manifiesta después de un mes o más desde el comienzo de la enfermedad. El 50% de los enfermos con complicaciones neurológicas, presentan parálisis de los pares craneales IX y X y que pueden provocar la aspiración y regurgitación nasal de líquidos. También es frecuente la parálisis de los nervios oculomotores y ciliares, pero la afección simultánea de numerosos pares craneales es excepcional. Un tercio de los pacientes con complicaciones neurológicas presentan neuritis periféricas y la incidencia de la afectación en las extremidades superiores e inferiores,

suele ser similar. En un gran número de pacientes se afectan simultáneamente pares craneales y periféricos. Por fortuna, casi todas las neuropatías remiten sin dejar secuelas en el curso de las dos semanas siguientes al comienzo de los síntomas neurológicos.

Las lesiones renales en particular, la nefritis intersticial, agudas, son secuelas graves posibles.

La bacteremia por *Corynebacterium diphtheriae* es excepcional, pero se han publicado casos de endocarditis producidos por este germen, la toxicidad y la capacidad invasiva de los bacilos son propiedades independientes de los mismos, de modo que la inmunización sólo elimina los efectos de la toxina, pero no evita la invasión del torrente sanguíneo por parte de los microorganismos.

CAPITULO 10

PORTADORES

Posiblemente el factor más importante para la perpetuación de algunas enfermedades infecciosas, y, especialmente de difteria, es la existencia de portadores del bacilo de la difteria. En el caso de los portadores del bacilo de la difteria, el bacilo permanece en las vías respiratorias superiores, cuando los signos y síntomas de la enfermedad ya han desaparecido; es posible que para portarlos se requiera alguna condición de anormalidad; en algunos casos los portadores albergan al bacilo sin haber presentado nunca datos de enfermedad activa. En condiciones ordinarias, de 1 a 2% de la población alberga bacilos virulentos diftéricos. Durante las epidemias, esa proporción se eleva hasta el 15% de la población. En algunos casos los portadores del *Corynebacterium diphtheriae*, el bacilo puede identificarse fácilmente, de la saliva obtenida escupiendo en un tubo, pero las pruebas del hisopo, de la nariz, garganta y amígdalas, son las más productivas. En la mayoría de los casos, los portadores llevan el bacilo en las amígdalas, en un pequeño número, los bacilos se encuentran solamente en la nariz. Debe confirmarse la presencia de los microorganismos sospechosos mediante pruebas de virulencia en animales, antes de hacer un juicio acerca de su significado.

El hecho de recuperar los bacilos de las porciones superficiales que se muestran, no significa que ese sea el sitio real en que se instalen los parásitos. De hecho, las bacterias con frecuencia, se encuentran embebidas profundamente en los tejidos, de modo que para eliminarlas de los portadores se requiere administrar un antimicrobiano en dosis elevadas para asegurar las concentraciones tisulares adecuadas. Cuando ha sido administrada la quimioterapia, se requiere de una serie de muestras que serían seis, tomadas durante dos semanas posteriores a la administración de los antimicrobianos, esperando resulten to-

das negativas. Si con el tratamiento antimicrobiano no se consigue eliminar el estado de portador, se debe suponer que existe alguna anomalía en las vías respiratorias superiores que han de corregirse para obtener el resultado deseado. Entre las posibles anomalías que requieren atención, se encuentran las de las amígdalas o las de los dientes, como caries o, talvez, gingivitis.

No se conoce el mecanismo exacto por el que el cuerpo se libra, por sí mismo, del bacilo de la difteria. Ya en 1909 se observó antagonismo entre los bacilos de la difteria y los estafilococos de la garganta, ya que cuando las gargantas de los convalecientes de difteria se infectaban con estafilococos, los bacilos diftéricos desaparecían. Los estudios experimentales realizados sobre medios de cultivos artificiales, hechos con gran número de cepas de estafilococos, indicaron que sólo unas cepas de *S. Aureus* tenían capacidad de inhibir el bacilo de la difteria. Esas cepas inhibitoras pertenecían al tipo mencionado. Otro grupo tiene la capacidad inhibitoria descrita y no son tipificables por bacteriófagos. Más aún, la condición para causar el efecto del estafilococo, pone en duda que este efecto pueda operar con eficiencia en las criptas amigdalinas que es el sitio donde habitualmente se encuentran los bacilos de la difteria entre los portadores.

Otras observaciones iniciales sugieren que puede haber una producción local de inmunoglobulinas protectoras, activas contra la toxina y que la antitoxina diftérica se secreta en la saliva. En investigaciones recientes se ha comprobado que esos anticuerpos consisten, principalmente en fracciones de Ig A. Se les encuentra tanto en la saliva como en el fluido nasal. La saliva tiene un efecto inhibitorio sobre el *Corynebacterium diphtheriae*, el cual proviene de *Streptococcus viridans*, otras investigaciones al respecto indicaron que la acción antibacteriana proviene del peróxido de hidrógeno producido por el estreptococo.

CAPITULO 11

TRATAMIENTO

11.1 ANTITOXINA

La antitoxina diftérica en cantidades adecuadas es el único tratamiento específico y efectivo para la difteria, ya que es indispensables - neutralizar la toxina diftérica. La aplicación de la terapéutica requiere la administración de antitoxina tan pronto como sea posible, aún antes de esperar el resultado del Laboratorio en casos graves.

Algunos autores recomiendan que, antes de aplicar la dosis completa de antitoxina, se hagan pruebas para investigar si el individuo es hipersensible al suero de la antitoxina, así: se realiza una prueba conjuntival o cutánea con 0.1 ml de antitoxina diluída en solución salina, al 1.20 dado que hasta 10% de la población presenta reacciones - alérgicas al suero de caballo. Si es sensible se presenta enrojecimiento de la conjuntiva de 15 a 30 minutos, en la prueba cutánea aparece una roncha con pseudópodos rodeada de eritema. La aparición de una reacción positiva exige la desensibilización del enfermo mediante la administración de dosis crecientes de antisuero. La anafilaxia es rara, pero se recomienda tener epinefrina a mano. La antitoxina sólo es activa ante la toxina libre y no tiene efecto una vez penetrado en la célula.

La obtención de la antitoxina se produce en diversos animales (caballos, carneros, cabras y conejos), por administración repetida inyectada de toxoide purificado y concentrado. Una unidad internacional de antitoxina diftérica = 0.0628 mg. del estándar internacional (Copenhague).

El papel de la antitoxina consiste en impedir toda unión posterior de la toxina libre que circula en la sangre con las células no dañadas. Esto se produce por unión con los determinantes en la molécula de toxina a nivel del extremo C terminal (17 mil daltons), impidiendo de esta manera, la unión del fragmento B con la célula hística. La antitoxina diftérica debe administrarse una sola vez por vía intramuscular o endovenosa. La cantidad de antitoxina administrada depende de la severidad de la infección al igual que su vía de administración, pero en general, no hay un acuerdo entre los clínicos acerca de lo que constituye un tratamiento adecuado. Un esquema conservador indica 30.000 a 50.000 unidades por vía intramuscular en casos leves o moderados y 60.000 a 100.000 unidades por vía endovenosa en casos severos. (la antitoxina diftérica se estandariza en unidades, comparando su capacidad para neutralizar toxina con aquella de la unidad estándar oficial de antitoxina, mantenida en el Instituto del Suero de Copenhague). En términos de unidades protectoras, la unidad estándar de antitoxina, puede neutralizar 100 MLD de toxina.

11.2 QUIMIOTERAPIA

El *Corynebacterium diphtheriae* es susceptible a cierto número de antimicrobianos que deben usarse como adyuvantes de la antitoxina, no como sustituto. La penicilina G es la droga y la eritromicina es efectiva en pacientes alérgicos a la penicilina. Los antibióticos son útiles especialmente en la prevención de infecciones secundarias y el tratamiento de portadores crónicos. Sin quimioterapia, de 1 al 15% de los sujetos que se recuperan de difteria, se convierten en portadores, alojando al bacilo durante semanas o meses, luego de la infección nasal.

CAPITULO 12

PREVENCION

La única forma efectiva de prevención es la vacuna, para una correcta y oportuna inmunización, a los niños mayores de tres meses y menores de un año se les debe administrar el toxoide tetánico, junto con el toxoide diftérico y vacuna contra la tosferina (DPT). Se aplican tres dosis con intervalos de cuatro a seis semanas entre cada una de las dosis y una al año de la inmunización. Otra dosis de refuerzo se aplica a intervalos mayores, por ejemplo, a los tres o cuatro años y a los seis u ocho años. Durante la adolescencia conviene administrar una más.

12.1 INMUNIZACION ACTIVA

12.2.1 Toxoide líquido.

Un filtrado de cultivo en caldo de una cepa toxígena se trata con formaldehído a 0.3% y se incuba a 37°C hasta que desaparece la toxicidad. El toxoide se estandariza en términos de unidades de floculación (Lf dosis), frecuentemente como 30 Lf /ml. Se inyectan por vía subcutánea tres dosis de 0.5 - 1.0 ml

12.2.2 Toxoide precipitado con alumbre.

El toxoide preparado como más adelante indicamos, se precipita con alumbre de potasio a 1 o 2%. Este es un antígeno superior y permanece más tiempo en el tejido subcutáneo. Son necesarias solo dos inyecciones para la inmunización inicial, pero puede producir hipersensibilidad más frecuentemente que el toxoide líquido. El toxoide precipitado con alumbre, frecuentemente se combina con toxoide tetánico y con la vacuna de

la tosferina en una sola inyección.

Los niños deben recibir una serie inicial de inyecciones de toxoide durante las edades recomendadas, en adultos la ocurrencia de las reacciones de hipersensibilidad a los toxoides, es alta y sólo deberá usarse toxoide purificado.

12.2.3 Mezclas de toxina-antitoxina.

Estas han sido abandonadas debido al peligro de disociación de la mezcla neutra y de graves reacciones potenciales a la toxina libre.

12.3 PROFILAXIS DE CONTACTO

Todos los contactos familiares y personas con una relación íntima con un paciente con difteria respiratoria, deben ser controlados cuidadosamente de modo tal que pueda administrarse la antitoxina ante el primer signo de enfermedad. Además, los contactos deben recibir una inyección de toxoide y de los individuos no inmunizados o inadecuadamente inmunizados deben recibir un régimen quimioterápico profiláctico con penicilina o eritromicina.

Puede emplearse la inmunización pasiva con 500 a 10.000 unidades de antitoxina para la protección de individuos no inmunizados muy expuestos a microorganismos toxígenos. Dado que esta protección es de corta duración e introduce el riesgo de inducir a la sensibilización o de provocar una reacción anafiláctica en un individuo precisamente sensibilizado, su uso debe limitarse a situaciones de alto riesgo.

12.4 CONTROL

Para restringir el contacto con el bacilo diftérico, todos lo enfer-

mos son aislados y se hace todo lo posible por librar a los pacientes de los microorganismos, sin tratamiento; un gran porcentaje de enfermos continúa liberando bacilos traduciéndose en portadores convalescentes.

CAPITULO 13

EPIDEMIOLOGIA

Los seres humanos constituyen el único reservorio importante para el bacilo diftérico. La transmisión de persona a persona suele darse a través de contacto directo (gotitas de saliva), aerosoles o puede llegar a darse por contacto directo cuando hay lesión cutánea.

Toda situación que favorezca el hacinamiento, provoca un aumento en la transmisión, lo cual explica su mayor incidencia cuando el clima es frío, aunque en la zona cálida, la piel constituye un reservorio importante.

La inmunización con el toxoide diftérico y el mejoramiento de las condiciones higiénicas han contribuido de forma especial a la disminución del número de casos en países de desarrollo.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se determinó la importancia que merece un conocimiento básico para el odontólogo en el campo de la Microbiología, acerca de una enfermedad como la DIFTERIA.

Por pertenecer a un grupo selecto de la población y estar en contacto directo con el organismo humano tanto para ofrecer salud, como para brindar bienestar a la comunidad, debemos conocer, que a pesar de existir programas de inmunización contra la DIFTERIA (DPT) desde edad temprana, hay un buen número de personas que en algún momento dado pueden contraer la difteria.

Si nosotros detectamos a tiempo la enfermedad, podremos informar rápidamente al médico y así evitar la posible transmisión, sus secuelas y complicaciones que conllevarían el desconocimiento de esta patología, por lo que considero de importancia relevante la información aquí presentada.