

BREVE NOTA SOBRE TIPOS DE CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE EN CARACAS (*)

Por el doctor *L. Briceño-Iragorry.*

Trabajo presentado a la Sociedad de Bacteriología, Parasitología y Medicina Tropical en la sesión del 7 de abril de 1941.

(Tomado del Bol. Lab. Clínica Razetti. Año II, N° 4. Caracas. Venezuela).

Esta pequeña nota trata solamente de contribuir al mejor conocimiento de nuestras cepas de *Corynebacterium diphtheriae* desde el punto de vista de sus propiedades culturales y relaciones con las formas clínicas de Difteria observadas en nuestro medio.

Es de todos conocido la relativa benignidad de esta dolencia entre nosotros y de una manera general en la región tropical, desconociéndose las formas graves acompañadas de cuadros de intoxicación profunda y de elevada mortalidad, tan comunes en las zonas templadas, tratándose de explicar estas peculiaridades por un factor climático inherente a estas latitudes, que obraría, ya atenuando el germe o modificando las condiciones del organismo, haciéndolo menos sensible a sus toxinas.

En un trabajo sobre la reacción de Schick en individuos de la región caraqueña, hicimos ya una pequeña contribución al conocimiento de la receptividad a la Difteria en nuestra población; hoy queremos de nuevo aportar algo que contribuya a mejor dilucidar el por qué de la benignidad de esta enfermedad infecto-contagiosa, tan apasionante por los problemas que levanta, en estas zonas tropicales.

No somos los primeros en hacer este estudio de índole bacterio-

(*) N. de la R.—Por parecernos del mayor interés y actualidad el estudio que sigue, adelantado por el doctor L. Briceño-Iragorry en el laboratorio de epidemiología de Caracas, lo reproducimos en nuestra revista en la certeza de que con ello contribuimos a ilustrar al cuerpo médico sobre un tema tan apasionante como el de la difteria en el trópico.

Las observaciones del distinguido autor venezolano, son también válidas para Colombia, donde a lo menos en Bogotá, la difteria es en general enfermedad benigna.

lógico entre nosotros, ya recientemente el doctor Antonio Ortiz dió a conocer sus resultados acerca de lo encontrado por él en 84 cepas de *C. diphtheriae* aisladas en el Laboratorio de Epidemiología, es por esto que seremos breves, dando a conocer someramente los resultados obtenidos, anotando algunos comentariorios y conclusiones.

Son bien conocidos, por lo grandemente divulgados, los trabajos de Anderson, Happold, Mc. Leod y Thonson sobre las variedades de ídoles culturales y biológicas del *C. diphtheriae* y sus relaciones con la gravedad o benignidad de la Difteria. Estos autores describieron sus tres tipos: *Mitis*, *Intermediario* y *Gravis*, con caracteres fijos para cada uno de ellos. Sin querer entrar en las discusiones que ha motivado esta clasificación bastante esquemática, desde los defensores hasta los denigrantes, señalaremos brevemente las bases en que está fundada dicha clasificación, como son su comportamiento en: 1º medio a base de telurito-sangre llamado de Anderson, 2º su crecimiento en caldo, 3º las modificaciones inferidas al caldo donde se desarrolla, 4º su acción sobre los glóbulos rojos y 5º sus propiedades fermentativas sobre el almidón. Hicimos todas estas investigaciones en las cepas estudiadas así como la determinación del poder fermentativo frente a los otros azúcares, dextrosa, dextrina y sacarosa, como también la determinación del poder de virulencia por inyección intra cutánea al acure.

La técnica usada para cada una de las anteriores experiencias fué como sigue:

El medio usado a base de telurito fué el de Anderson, haciendo la lectura entre las 24 y 72 horas; 2) el crecimiento en caldo lo hicimos para observar la formación o nódulo de velo, la presencia de depósito o el desarrollo granular, al mismo tiempo que se determinaban las modificaciones del pH de los cultivos en respectivos tubos de caldo; 3) la acción hemolítica, o test de hemólisis, así: a cultivos en caldo de 48 horas agregar 1 c. c. de una débil suspensión de glóbulos rojos de carnero, incubar dos horas a 37º y dejar una noche a la nevera antes de hacer la lectura; 4) la acción sobre el almidón, o test de hidrolisis, de la manera que sigue, agregar a placas de gelosa 10 gotas de una solución de almidón al 20% estéril y previo control de esterilidad, sembrar en dichas placas una gota de una dilución de gérmenes en suero fisiológico, pudiéndose revelar la hidrolisis al agregar, a las 24 horas de la siembra, varias gotas de una solución de Lugol, produciéndose un halo blanco alrededor de las colonias cuando la reacción es positiva; 5) el poder fermentativo frente a los azúcares lo hicimos valiéndonos del suero de Hiss tornasolado y 6) el test de virulencia inoculando por vía intradérmica al acure 0,2 de una suspensión de gérmenes contenido alrededor de 500 millones por c. c., de un cultivo de 24 horas en medio de Loef-

fler, haciendo siempre un control, inoculando las mismas cepas a otro acure que había recibido la víspera 700 U. de Antitoxina diftérica, la lectura se hace a las 24, 48 y 72, marcando con una, dos o tres cruces (+, ++, +++) la intensidad de la reacción.

Los tres tipos tienen las características siguientes:

I Tipo Gravis:

- a) colonias grises o gris negruzcas, de aspecto mate y de superficie radiada y bordes dentados. Desarrollo entre 36 y 48 horas;
- b) película con depósito granular en caldo, sin enturbiamiento;
- c) reacción ácida inicial en el caldo tornándose alcalina entre el segundo y tercer día;
- d) no hemolítico;
- e) no hidroliza el almidón;
- f) asociado a casos benignos de Difteria.

II Tipo Mitis:

- a) colonias negras, lisas, brillantes y de superficie convexa, bordes netos. Desarrollo entre las 36 y 48 horas;
- b) uniforme turbidez en el caldo sin película;
- c) reacción ácida en el caldo que persiste 4 y 5 días tornándose luego alcalina;
- d) hemolítico;
- e) no hidroliza el almidón;
- f) asociado a casos benignos de Difteria.

III Tipo Intermediario:

- a) colonias planas de centro mamelonado y bordes ligeramente dentados;
- b) crecimiento granular en caldo, raramente película;
- c) no hemolítico;
- d) reacción ácida persistente en caldo;
- e) no hidroliza el almidón.

Dado lo esquemático de los caracteres arriba enumerados y encontrándose cepas que no corresponden íntegramente a los caracteres anotados, diversos autores han ensayado diferentes clasificaciones, entre las últimas y de mejor aceptación encuéntrase las de Helen A. Wright y May H. Christison, dichos autores proponen una clasificación numérica en que los tipos I, II y III corresponden al Mitis, Intermediario y Gravis, respectivamente, y los res-

tantes a los nuevos tipos por éllas creados, siendo subdivisiones del Gravis y del Mitis, los caracteres resaltantes de su clasificación están fundados en su comportamiento frente al almidón, test de virulencia y tipo de colonia, dichos tipos se pueden esquematizar en el cuadro siguiente:

Tipo	Forma de la colonia	Ferment alm.	Virulencia
I	Mitis	—	+
II	Intermediario	—	+
III	Gravis	+	+
IV	"	—	+
V	"	+	—
VI	"	—	—
VII	Mitis	+	+

Como ya lo hemos dicho, para Anderson, Happold y su escuela, existiría siempre una relación estrecha entre el tipo de germen encontrado y la gravedad de la Difteria, las estadísticas abundan en este sentido: Anderson, Happold y Mc. Leod encuentran en 425 casos por Gravis un 13,1% de letalidad, 8,7% en 24 casos por Intermediarios y 0% en 113 casos por Mitis; para Mair de Londres sobre un total de 877 encuentra para los casos seguidos de muerte el Gravis en un 52,6%, el Intermediario en un 44% y el Mitis en un 3,4%; Clauberg de Berlín encuentra como responsable de las epidemias de dicha ciudad al Gravis en un 77,9%, al Intermediario en un 12,3% y al Mitis en un 8,2%.

Pero no todos los autores confirman las anteriores y muchas otras estadísticas, para Carter sobre 614 cepas aisladas en Glasgow, Escocia, concluye en la poca frecuencia del tipo Gravis, encontrando al Intermediario en un 65% como causante de las formas clínicas graves, siendo el Mitis según dicho autor igualmente el responsable de las formas benignas; que Murray estima al tipo Intermediario más benigno que el Mitis y que el tipo Gravis no siempre está ligado a casos clínicos severos y por último Hilgers y Thoemes aseveran la relación del tipo Gravis con casos benignos de Difteria.

No obstante esta disparidad de opiniones, la tesis de Anderson y sus colaboradores sigue como la más aceptada, pero a nuestro pensar las opiniones y resultados en contra, servirían para no dar una fe absoluta a dicha concepción, y siempre dar cabida a variaciones regionales.

A lo arriba apuntado podemos agregar, que la estabilidad de los tipos no está al abrigo de mutaciones, siendo factible que algu-

nas de sus características puedan transformarse en las de otro tipo, así tenemos que Menton en 1932 agregando suero anti-difláctico al medio notó transformación del Gravis en Mitis, pero no lo inverso; que elevado el pH a 7,8 se observan variaciones en el crecimiento, presentando el Mitis las características del Gravis y viceversa; que existen entre los tipos Mitis y Gravis formas hemolíticas y no hemolíticas y que el tiempo de reversión del pH en el caldo es susceptible de variaciones entre los tipos Mitis y Gravis, mostrándose el Intermediario como el más estable de los tres. Es necesario hacer constancia, que el poder toxígeno de las cepas no está siempre de acuerdo *in vitro*, con el tipo encontrado, pues no obstante las aseveraciones de Mair de que prácticamente todas las cepas de Mitis no son toxígenas, encuéntranse muchas de un alto poder toxígeno y aun más que las del Gravis; así, autores brasileros han encontrado sobre 31 cepas de Mitis 2 con un D L M igual a 1/1.000 en tanto que en 9 Gravis no encontraron ninguna con ese título. Por otra parte, las toxinas producidas por ambos aparecen idénticas frente a su neutralización por la antitoxina, no obstante que Povitsky, Eisner y Jackson (1933) encuentran que la antitoxina sería más eficaz en las infecciones a Mitis que a Gravis. A este respecto Topley y Wilson dicen, que la gravedad de la infección por el tipo Gravis sería función del poder de invasión a los tejidos.

De un total de 365 cepas aisladas en el Laboratorio de Epidemiología en el año 1940, estudiamos 93 provenientes tanto de enfermos como de portadores y contactos desde el punto de vista que tratamos, dicho material fué suministrado por la Unidad Sanitaria de Caracas.

Dichas cepas están repartidas así: 64 provenientes de enfermos y 29 de portadores o contactos. Hechas las investigaciones necesarias según el esquema de Anderson, Happold, Mc. Leod y Thomson, encontramos 89 pertenecientes al tipo *Mitis* y 4 al *Intermediario*, ninguna al Gravis; de estas cepas 62 Mitis y 2 Intermediarios fueron aislados de enfermos y los restantes 27 Mitis y 2 Intermediarios lo fueron de portadores o contactos. Esta distribución y su porcentaje se verá mejor en el cuadro adjunto:

Procedencia	Total	Gravis		Intermediario		Mitis	
		N.º	%	N.º	%	N.º	%
Enfermos	64	0		2	3,125	62	96,88
Portadores o Contactos	29	0		2	6,9	27	93,1
Total	93	0		4	4,3	89	95,7

De donde vemos que en un 95,7% el tipo aislado fué el Mitis y en un 4,3 el Intermediario, sobre el total de cepas estudiadas; que 96,88 es el porcentaje para los Mitis aislados de enfermos y 93,1 para los aislados de portadores; que 3,12 es el porcentaje para los Intermediarios aislados de enfermos y 6,9 para los aislados de portadores o contactos.

La prueba de los azúcares como dextrosa, sacarosa y dextrina, fué la dada como típica para el *C. diphtheriae*, es decir, fermentación de la dextrosa y dextrina sin acción sobre la sacarosa. Quiero hacer notar que aparte de las cepas que han servido al presente estudio, encontramos dos con todas las características de Mitis, virulentas, pero que fermentaban la sacarosa, en medio de Hiss; posteriormente encontramos en un trabajo aparecido en Chinese Medical Journal, 1940, una referencia al respecto, recomendando el uso de medio con sangre digerida para la investigación del poder fermentativo del *C. diphtheriae*, por haber encontrado cepas parecidas a la nuestra que se comportaban bien en el referido medio.

El test de virulencia en nuestras 93 cepas es como sigue: 12 avirulentas o sea un 12,03% sobre el total de cepas estudiadas, de estas 12 cepas 11 pertenecen al tipo Mitis y 1 al Intermediario; de las cepas Mitis avirulentas 4 fueron aisladas de enfermos y 7 de portadores o contactos y la cepa Intermediaria avirulenta fué aislada de un portador. En resumen, de nuestras 89 cepas de Mitis un 12,35% son avirulentas y un 25% de avirulentas entre las Intermediarias (el pequeño número de Intermediarios estudiados no nos permite dar fe a nuestro bajo porcentaje de avirulencia).

La intensidad de la reacción para el acure, del test de virulencia, en las distintas cepas las podemos distribuir en tres categorías, moderada (+), fuerte (++) y muy fuerte (+++). De las 78 cepas de Mitis virulentas, 39 dieron reacción muy fuerte, 27 reacción fuerte y 12 reacción moderada; de las tres cepas de Intermediario virulentas dos fueron de muy fuerte reacción y una reacción fuerte. Damos más abajo en un cuadro, el resumen del test de virulencia en las cepas Mitis:

Procedencia	N.º cepas	Avirulentos		VIRULENCIA					
		N.º	%	Moderada (+) N.º	%	Fuerte (++) N.º	%	Muy fuerte (+++) N.º	%
Enfermos	62	4	6,4	9	14,51	20	32,25	29	46,77
Portadores	27	7	25,9	3	11,11	7	25,92	10	37,03
Total	89	11	12,35	12	13,48	27	30,33	39	43,7

Del total de cepas Mitis procedentes de enfermos (62), sólo dos correspondieron a casos fatales de Difteria, o sea un 3,225%. Esta baja mortalidad no corresponde a la habida en global para Caracas y sus alrededores para 1940, pues de un total de 219 casos positivos se registró un 6% aproximado de letalidad, porcentaje más elevado de lo frecuentemente hallado en nuestro medio, nosotros en el informe del Servicio de Epidemiología correspondiente al año de 1937 encontramos sólo un 3,33%, cifra sostenida con pequeñas variaciones en los años siguientes.

Como conclusión diremos: encontramos el tipo *Mitis* como el más frecuente entre las 93 cepas estudiadas, provenientes tanto de enfermos como de portadores o contactos, en un porcentaje de 95,7% y sólo en un 4,3% el Intermediario; no logramos aislar el tipo *Gravis*. De estas cepas un 12% fueron avirulentas. Esta frecuencia del tipo *Mitis* contribuiría a explicar, siguiendo a Anderson y su escuela, la benignidad de nuestras formas clínicas de Difteria.

Enero de 1941.

(Trabajo del Laboratorio de Epidemiología del Instituto Nacional de Higiene).

Bibliografía

Topley and Wilson: The Principles of Bacteriology and Immunity.—1938.

Tipos de *C. diphtheriae* en São Paulo.—Memorias do Instituto Butantan.—1939. T. XIII.

Mair, W.—Journ. Path. a. Bact. 42 (3): 635.—1936.

Ortiz, Dr. Antonio: Tipos de *C. diphtheriae* en Caracas.—Rey. de Sanidad y Asistencia Social.—Vol. V. Nº 6.—1940.

Briceño-Iragorry, L.: Receptividad a la Difteria en Caracas según 4010 reacciones de Schick.—Gaceta Médica de Caracas.— N° 16.—1939.

Chinese Medical Journal.—Supplement III.—1940.