

GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Corynebacterium diphtheriae*

DIRECCIÓN REDES EN SALUD PÚBLICA

SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA

GRUPO DE MICROBIOLOGÍA

2017



Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Esther Cristina Barros Liñan
Director Técnico (E)
Redes en Salud Pública

María Alexandra Durán Romero
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Carolina Duarte Valderrama
Coordinadora
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Sandra M Barrera Ayala.
Equipo Técnico
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección de Redes en Salud Pública

Elaborado por

Efraín Andrés Montilla Escudero
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS DE LA GUÍA	4
ALCANCE.....	4
DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMO	4
1. GENERALIDADES	5
1.1 Agente etiológico	5
1.2 Modo de transmisión	6
1.3 Prevención.....	6
2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	8
2.1 Bioseguridad:.....	8
2.2 Toma de muestras:.....	8
2.2.1 Exudado faríngeo o amigdalino	8
2.2.2 Exudado nasofaríngeo.....	9
2.2.3 Exudado de lesiones cutáneas	9
2.2.4 Muestras de tejido.....	9
2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:.....	14
2.4 Documentación requerida.....	15
2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico.....	15
2.5.1 Aislamiento de <i>C. diphtheriae</i> por cultivo.....	15
2.5.2 Coloración Azul de metileno o coloración Albert (Loeffler).....	16
2.5.3 Pruebas de biotipificación y toxigenicidad	16
2.5.4 Prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR):	17
3. CONTROL DE CALIDAD.	23
4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	23
5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO.....	23
5.1 Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).....	23
5.2 Funciones del Laboratorio de salud pública departamental o distrital (LSPD).	24
5.3 Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda.	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
Anexo A.....	27
Agar Sangre Cistina Telurito (ACT).....	27
Telurito de potasio al 0.3%	27

OBJETIVOS DE LA GUÍA

Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio de *Corynebacterium diphtheriae* como agente etiológico de difteria.

Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección de *Corynebacterium diphtheriae*.

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio de difteria.

Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo e indirecto.

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio de *Corynebacterium diphtheriae*, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

El presente documento es una guía para la vigilancia por laboratorio de *Corynebacterium diphtheriae* en Colombia dirigido al personal asistencia y profesional que capten casos sospechosos de difteria.

DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): es un polímero de monómeros de nucleótidos (deoxyadenilato, deoxyguanilato, deoxycitidilato y timidilato) donde se almacena la información genética y responsable de la transmisión hereditaria

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia del fragmento original.

Difteria: La difteria clásica es una enfermedad del tracto respiratorio superior caracterizada por dolor de garganta, fiebre de bajo grado y producción de una toxina por *C. diphtheriae* que causa la destrucción celular local de las membranas mucosas y la toxina absorbida puede causar manifestaciones en varios órganos que incluye el miocardio, los riñones y el sistema nervioso. La acumulación de material inflamatorio y la fibrina dan como resultado la característica "pseudomembrana" adherente que habitualmente implica la amígdala (s), la faringe y / o la nariz, no obstante, la enfermedad puede afectar casi cualquier membrana mucosa.

Difteria nasal: Esta forma se caracteriza por una secreción nasal mucopurulenta, en la que a veces se observan estrías de sangre, pudiendo formarse una membrana blanca en el tabique. La difteria nasal aislada es poco frecuente y por lo general leve; su diagnóstico puede pasarse por alto fácilmente(1).

Difteria faríngea y amigdalina: Esta es la forma “clásica” y puede ir acompañada de afección concomitante en otras localizaciones, respiratorias o no. Al principio, la faringe tiene un aspecto congestivo al examen, pero pronto se forman placas blancas pequeñas que crecen formando una membrana adherente blanco-grisácea, que puede cubrir toda la faringe, incluidas las amígdalas, la úvula y el paladar blando. Los intentos para desprender la membrana provocan sangrado. El edema y la inflamación de los tejidos blandos circundantes y el aumento de volumen doloroso de las adenopatías cervicales anteriores pueden dar lugar al denominado “cuello de toro”, indicativo de infección grave. Si no se administra el tratamiento específico, la membrana se reblandece unos ocho días después y progresivamente se desprende en pedazos o en un bloque único. Los síntomas generales comienzan a desaparecer con la caída de la membrana(1).

Difteria laríngea: Esta forma puede presentarse aislada (puede no haber lesión faríngea) o puede ser una extensión de la forma faríngea. Es más frecuente en los niños menores de 4 años y se presenta como una ronquera progresiva gradual, tos perruna y estridor. Puede evolucionar hacia la obstrucción faríngea y causar la muerte(1).

Difteria cutánea (piel): Esta es una infección cutánea leve causada por bacilos productores o no productores de toxina, mientras que todas las otras formas de difteria son causadas por los organismos que producen toxina. Es más frecuente en los trópicos y a menudo se ha relacionado con la pobreza y el hacinamiento. Las personas con difteria cutánea pueden ser una fuente de infección para los demás(1).

Definición clínica de difteria para Colombia: paciente que presenta una enfermedad aguda de las amígdalas, faringe, nariz, y se caracteriza por una o varias placas grisáceas adherentes confluentes e invasoras, con una zona inflamatoria circundante de color rojo mate, dolor de garganta, aumento de volumen del cuello, fiebre, cefalea y grado variable de compromiso del estado general. La enfermedad puede afectar otras localizaciones como mucosas y piel. -protocolo

Enfermedad similar a la difteria: Manifestaciones clínicas parecidas a la difteria causada por *Corynebacterium ulcerans* de asociación zoonótica. Las cepas toxigénicas de *C. ulcerans* producen toxina diftérica que se diferencia alrededor del 5% de la secuencia de aminoácidos de la toxina producida por *C. diphtheriae*. Actualmente se requiere estudios para conocer la efectividad del tratamiento con el toxoide para proteger contra la enfermedad causada por *C. ulcerans*.

1. GENERALIDADES

1.1 Agente etiológico

Corynebacterium diphtheriae es el agente etiológico principal de la difteria en humanos, además es una especie que puede producir la toxina diftérica como principal factor de virulencia. Sin embargo, las especies de *Corynebacterium ulcerans* y *Corynebacterium pseudotuberculosis* pueden producir la toxina diftérica sin ser el principal factor de virulencia en estas dos especies que causan enfermedad frecuentemente en animales. Generalmente son bacilos aerobios, Gram positivos, cuyo poder patogénico está asociado a la excreción de la exotoxina diftérica que proviene de la integración del gen de la toxina (tox) al cromosoma de las bacterias por los corinebacteriófagos: β tox +, γ tox +, ω tox +(2).

Corynebacterium diphtheriae se subdivide en cuatro biotipos: gravis, intermedius, mitis y belfanti de los cuales los tres primeros están asociados a la enfermedad por la capacidad de producir

la toxina y de acuerdo con la severidad de los síntomas, el nombre del biotipo se relaciona comúnmente con la intensidad de la enfermedad. Las cepas no toxigénicas de *C. diphtheriae* rara vez causan enfermedad y cuando lo hacen, ésta suele ser leve y sin complicaciones generalizadas. Las cepas no toxigénicas suelen causar faringitis, difteria cutánea y se han relacionado con pocos casos de endocarditis(2). Los seres humanos son el único huésped natural de *C. diphtheriae* y por lo tanto son los únicos reservorios significativos de infección (3). El periodo de incubación de la difteria es de 2-5 días con un rango de rango de 1-10 (4). Incluso en la era previa a la vacuna, la difteria era rara en los lactantes menores de 6 meses, quizá debido a la presencia de anticuerpos maternos. Después de los 6 meses, la mayoría de las personas adquiría la inmunidad contra la difteria sin haber contraído la enfermedad. Después de recibir tres dosis del toxoide, prácticamente todos los lactantes y los adultos alcanzan concentraciones de antitoxina diftérica consideradas protectoras. La vacunación proporciona una inmunidad duradera pero no permanente, según lo demuestran los títulos de antitoxina. Sin embargo, algunos adultos vacunados a temprana edad pueden conservar una memoria inmunitaria y estarían protegidos en caso de exposición a la toxina diftérica. El toxoide protege contra la enfermedad generalizada, pero no contra la colonización nasofaríngea (5).

Corynebacterium ulcerans es un microorganismo que no tiene biotipos o biovares. Está asociado principalmente a enfermedad en animales y se considera como agente etiológico potencial zoonótico debido al reporte de casos de enfermedad diftérica clásica en humanos. Los países donde se ha reportado casos han sido Estados Unidos Canadá, Argentina, Brasil, Reino Unido, Italia, España, Irlanda, Rumania, Francia, Alemania, España y Japón (2).

Corynebacterium pseudotuberculosis se subdivide en biovar ovis que causa enfermedad principalmente en ovejas y cabras, y el biovar equi en caballos. Aunque no se ha encontrado casos de difteria clásica en humanos son potencialmente reservorios de corinebacteriófagos (2).

1.2 Modo de transmisión

C. diphtheriae es comúnmente transmitida por contactos cercanos a través de gotitas de secreciones nasofaríngeas o lesiones cutáneas infectadas o rara vez por el contacto con artículos contaminados por secreciones de lesiones de personas infectadas. Se conoce que las cepas toxigénicas pueden colonizar directamente la cavidad nasofaríngea. Además, el gen *tox* puede propagarse indirectamente por la liberación de corinebacteriófagos toxigénicos y por conversión lisogénica de células autóctonas no tóxicas. El estado portador respiratorio asintomático es importante en la transmisión de la difteria, por tanto, la inmunización reduce la probabilidad de estado portador. El polvo y la ropa pueden contribuir a la diseminación porque el microorganismo puede sobrevivir hasta 6 meses en polvo y fómites (3). La transmisibilidad se encuentra entre 2-4 semanas en la fase aguda en pacientes no tratados y de 1-2 días en pacientes tratados. Los portadores crónicos pueden excretar la bacteria durante más de 6 meses (6).

1.3 Prevención

La prevención de la difteria se basa principalmente en la vacunación; en Colombia de acuerdo con el Plan Ampliado de Inmunizaciones-PAI (tabla 1) del Ministerio de Salud y Protección Social se deben vacunar los menores de cinco años y suele usarse un refuerzo en edad adulta, contactos de casos y en mujeres gestantes, también se sugiere la vacunación al personal que

se encuentre en contacto con pacientes sospechosos, sin embargo, es necesario que se consulte a la ARL. Los pacientes que no han sido vacunados, o cuyo esquema es incompleto, deben iniciarlo o completarlo de acuerdo con el calendario de vacunación vigente durante la fase de convalecencia, dado que la enfermedad no confiere inmunidad (1).

La vacuna antidiftérica, constituida por toxoide diftérico, se comercializa combinada con la vacuna anti-tos ferina y toxoide tetánico (DPT), o exclusivamente con el toxoide tetánico con dosis de vacuna antidiftérica tipo pediátrico (DT) o tipo adulto (Td). La DPT es la clásica combinación que se utiliza actualmente en Colombia en los refuerzos; existen diversos preparados aprobados para el uso en varios países, que combinan en una misma inyección la vacuna anti diftérica con otras vacunas como la pentavalente, la cual incluye DPT, Hib, HB, y es la que se utiliza en Colombia a los 2, 4 y 6 meses de edad que se muestra en la tabla 1 (1).

La DT puede sustituir a la DPT a partir de los dos meses de edad, cuando el componente celular de *Bordetella pertussis* esté contraindicado formalmente. La Td se aplica en Colombia entre los 10 y 49 años en mujeres en edad fértil y en gestantes y grupos de riesgo. Eficacia e inmunogenicidad: 90-95 % de los vacunados con cuatro dosis de DPT adquiere niveles séricos protectores de anticuerpos. Esta inmunidad adquirida persiste inalterada durante cinco años y disminuye progresivamente hasta el décimo año (50 % a los 6 años) (1).

Tabla 1. Esquema nacional de vacunación de para difteria.

A los 2 meses	Pentavalente*	1 dosis	Difteria, tétanos, tos ferina, <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, hepatitis B	IM
A los 4 meses	Pentavalente	2 dosis	Difteria, tétanos, tos ferina, <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, hepatitis B	IM
A los 6 meses	Pentavalente	3 dosis	Difteria, tétanos, tos ferina, <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, hepatitis B	IM
Al año de la tercera dosis	DPT	1er refuerzo	Difteria, tétanos, tos ferina	IM
A los 5 años	DPT	2do esfuerzo	Difteria, tétanos, tos ferina	IM
Entre los 10-49 años	Td (adultos)	MEF 5 dosis** Gestantes 2 dosis	Difteria y tétanos	IM

Tomado de: Protocolo de Vigilancia de Difteria INS.2016 y <https://www.minsalud.gov.co/proteccionsocial/Paginas/EsquemasdeVaunaci%C3%B3n.aspx>

* DPT+Hib+HB

** La 1ra, al inicio del esquema; la 2da, al mes de la primera; la 3ra, a los 6 meses después de la 2da; la 4ta, al año de la 3ra, y la 5ta, al año de la 4ta. Fuente: PAI

Quimioprofilaxis: a todos los contactos próximos que hayan estado directamente expuestos a las secreciones respiratorias del paciente, se les debe realizar cultivo y PCR de muestra nasal y faríngea, e inmediatamente después se instaurará la profilaxis con antibiótico. Se recomienda administrar una sola dosis de penicilina benzatínica Intramuscular (600 000 unidades en menores de 6 años y 1 200 000 unidades para personas de 6 años y más), o eritromicina (40 mg/Kg/día para niños y 1 gramo/día para adultos) durante 7 a 10 días. Si se obtiene un cultivo positivo de un contacto, se debe realizar lo siguiente (1).

- Aislamiento de acuerdo con el protocolo de vigilancia INS de difteria del Sivigila.
- Repetir el cultivo y PCR al menos dos semanas después de completar el tratamiento. Las personas que continúen con cultivo positivo después del tratamiento deberán recibir tratamiento adicional de 10 días con eritromicina oral, y realizar otro cultivo de control finalizado el tratamiento (1).

Como sucede con muchas enfermedades respiratorias, la difteria se propaga cuando una persona susceptible inhala el bacilo que se encuentra en las gotas respiratorias o aerosoles expelidas por una persona infectada al toser o estornudar. Por esta razón siempre se recomienda tener buenos hábitos de higiene para prevenir la diseminación de las enfermedades respiratorias; los buenos hábitos de higiene incluyen:

- Cubrirse la boca y la nariz con un pañuelo desechable al toser o estornudar.
- Botar el pañuelo desechable usado en el cesto de la basura.
- Toser o estornudar en la parte superior del brazo o en el codo, no en las manos, si no se tiene un pañuelo desechable.
- Lavarse las manos con agua y jabón a menudo por lo menos durante 20 segundos.
- Usar un desinfectante de manos a base de alcohol si no se dispone de agua y jabón.

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1 Bioseguridad:

- Los procedimientos relacionados con la toma de muestras en pacientes sospechosos suelen inducir tos y estornudos, por tanto, los profesionales que realicen este procedimiento deben estar adecuadamente protegidos con máscara N95 y gafas. Como medida preventiva la vacunación y los refuerzos de la vacuna contra la difteria deben estar al día.
- Los aislamientos y el procesamiento primario de la muestra (hidratar, resuspender liofilizados, alicuotar y extraer ADN) deben realizarse en una cabina de bioseguridad tipo II.
- El personal de laboratorio debe usar los elementos de protección personal (EPP) como guantes de látex, nitrilo o vinilo; bata; tapabocas y gafas.
- Para el embalaje de muestras se debe etiquetar los aspirados o hisopados como sustancia biológica Categoría B UN 3373 de acuerdo con la instrucción de embalaje P650 de la IATA.

2.2 Toma de muestras:

Los hisopos adecuados para la toma de muestra en el diagnóstico de difteria son: rayón, nylon o dacrón (poliéster). Se recomienda la obtención de piezas de pseudomembrana (si esta está presente) y se deberá colocar en solución salina la pseudomembrana y no en formol para realizar el cultivo o la PCR; en el caso que se necesiten piezas de tejidos para patología se deberá dividir la muestra. A continuación, se encuentran los procedimientos y algoritmos para la toma de muestras en pacientes con sospecha de difteria:

2.2.1 Exudado faríngeo o amigdalino

- La faringe debe ser claramente visible y bien iluminada.
- Presionar la lengua con un bajalenguas o depresor lingual. Tenga en cuenta que cuando se realiza el frotis faríngeo no se debe tocar la lengua o la parte interna de las mejillas.
- Frotar con un hisopo de forma firme y sin manipular excesivamente las lesiones. Obtenga el exudado de la membrana, manchas blancas o áreas inflamadas; se debe aplicar una ligera presión con un movimiento de rotación al hisopo.
- Se recomienda tomar una muestra por debajo de la membrana levantando el borde y frotando por rotación con el hisopo para obtener el exudado (en esta zona se concentran los microorganismos) **ADVERTENCIA PUEDE HABER SANGRADO.**
 - Colocar un hisopo en medio de transporte Amies y enviarlo inmediatamente al laboratorio para cultivo.

8 de 27



- También se puede tomar un hisopo para PCR y transportar en tubo seco.
- Si se obtiene parte de la pseudomembrana se debe depositar en 1 mL de solución salina y enviarlo inmediatamente al laboratorio para cultivo y PCR.

2.2.2 Exudado nasofaríngeo

- Inmovilizar e incline la cabeza del paciente.
- Insertar un hisopo nasofaríngeo más allá de las narinas anteriores.
- Introducir suavemente el hisopo a lo largo del suelo de la cavidad nasal bajo el cornete medio hasta que se alcance la pared faríngea.
- Rotar el hisopo por cinco segundos.
- Colocar el hisopo en el medio de transporte Amies y enviarlo inmediatamente al laboratorio para su cultivo.
- También se puede tomar un hisopo para PCR y transportar en tubo seco.

2.2.3 Exudado de lesiones cutáneas

- Limpiar la lesión con solución salina estéril y remover el material con costra.
- Presionar el hisopo firmemente en la lesión y rotarlo.
- Transportar en medio de transporte Amies el hisopo al laboratorio para su cultivo.
- También se puede tomar un hisopo para PCR y transportar en tubo seco.

2.2.4 Muestras de tejido

- Muestras post mortem: se debe obtener muestra de pseudomembrana para microbiología recogida en 1 mL de solución salina. Para estudio histopatológico se debe recolectar muestras como si fuese muerte por IRA a partir de la secreción respiratoria hasta seis horas posteriores a la muerte, y/o cortes de tejido del tracto respiratorio de pulmón y bronquios (de ambos lados -derecho e izquierdo-) y tráquea en solución salina, refrigerados para análisis virológico y microbiológico, con contra-muestra adicional de los mismos tejidos en formol tamponado al 10 % para patología.

Figura 1. Requisitos generales y toma de decisiones para recolección de muestras de exudado faríngeo

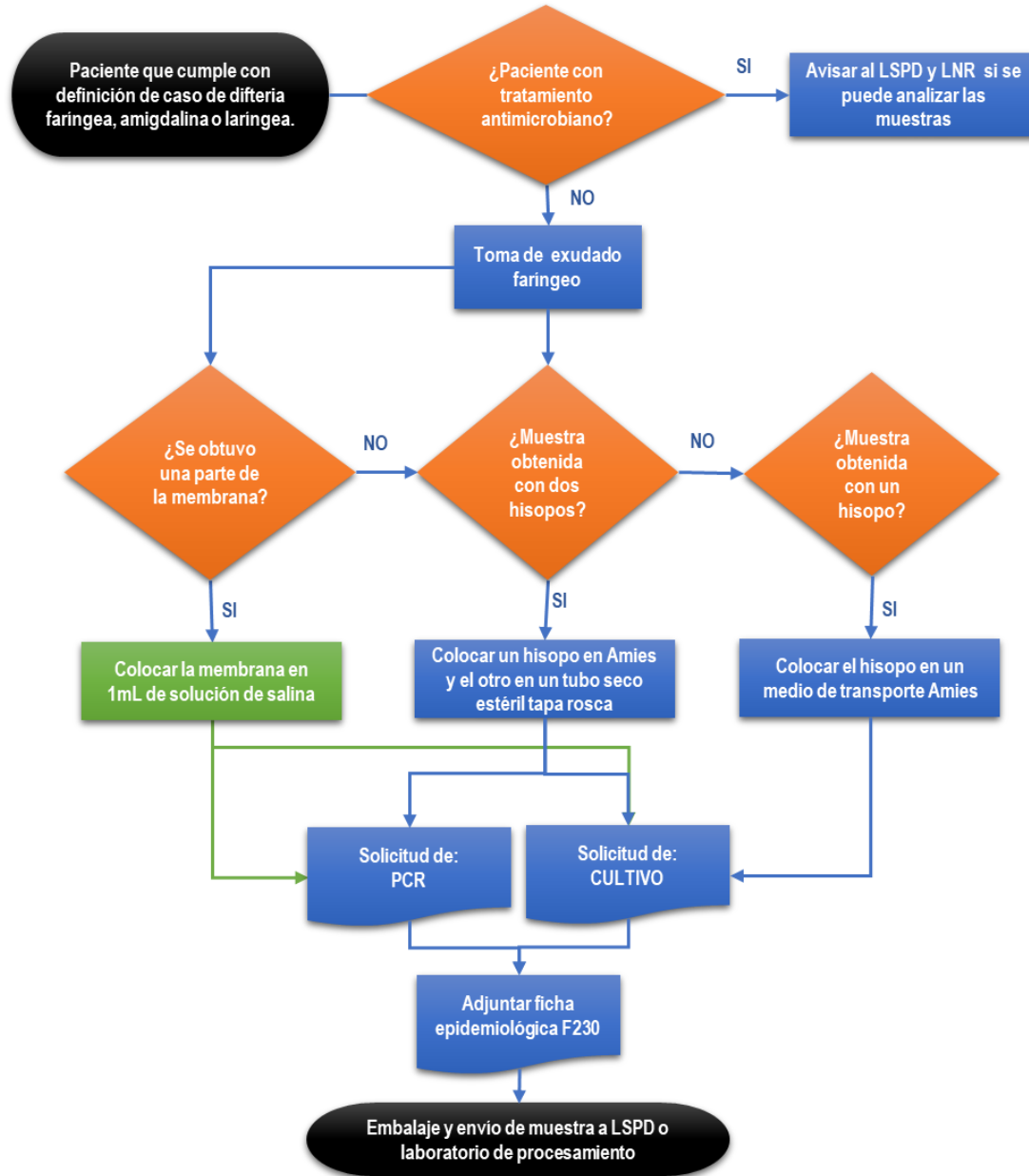


Figura 2. Requisitos generales y toma de decisiones para recolección de muestras de exudado nasofaríngeo para contacto asintomático

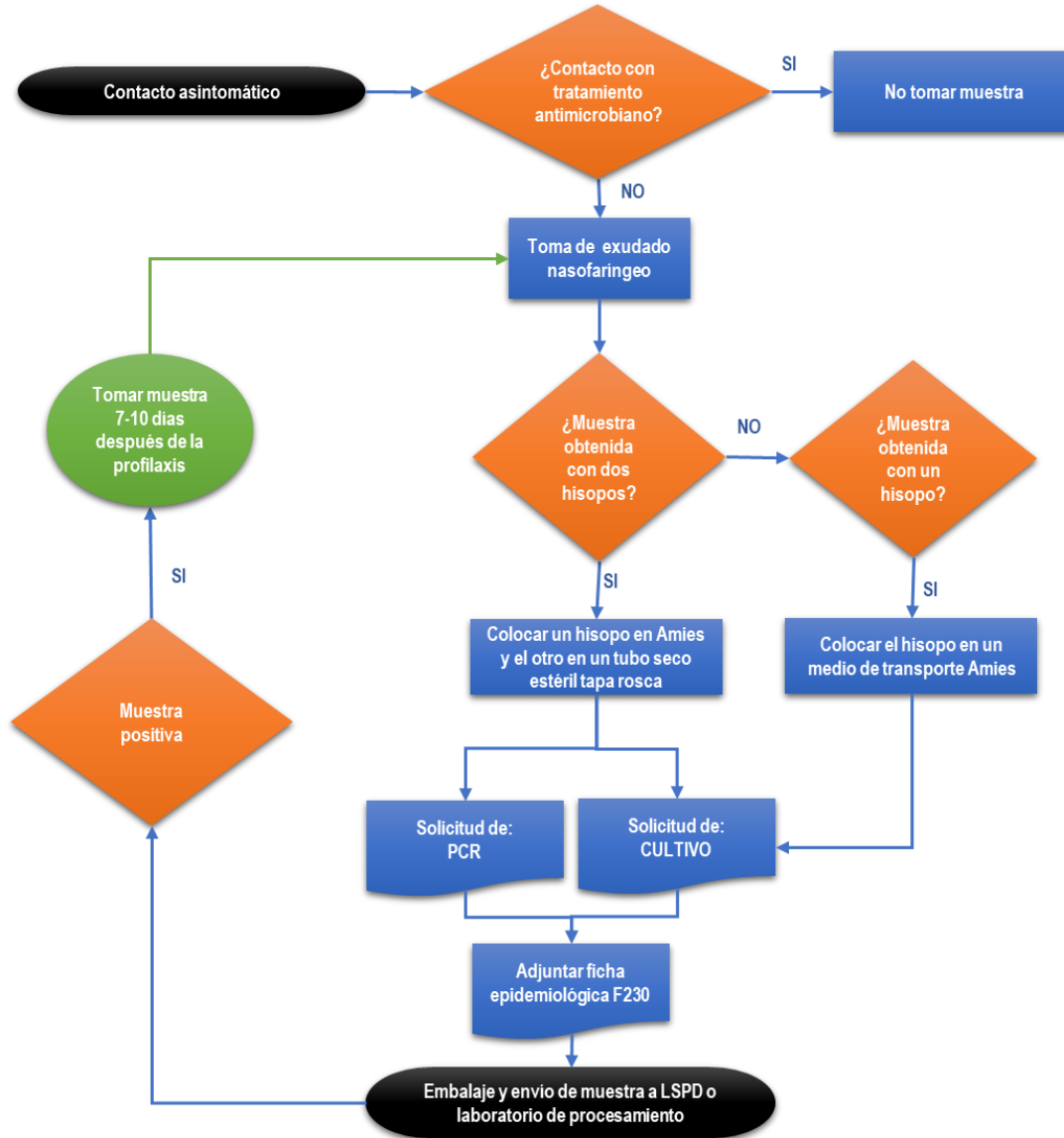


Figura 3. Requisitos generales y toma de decisiones para recolección de muestras de exudado nasofaríngeo para paciente con difteria nasal

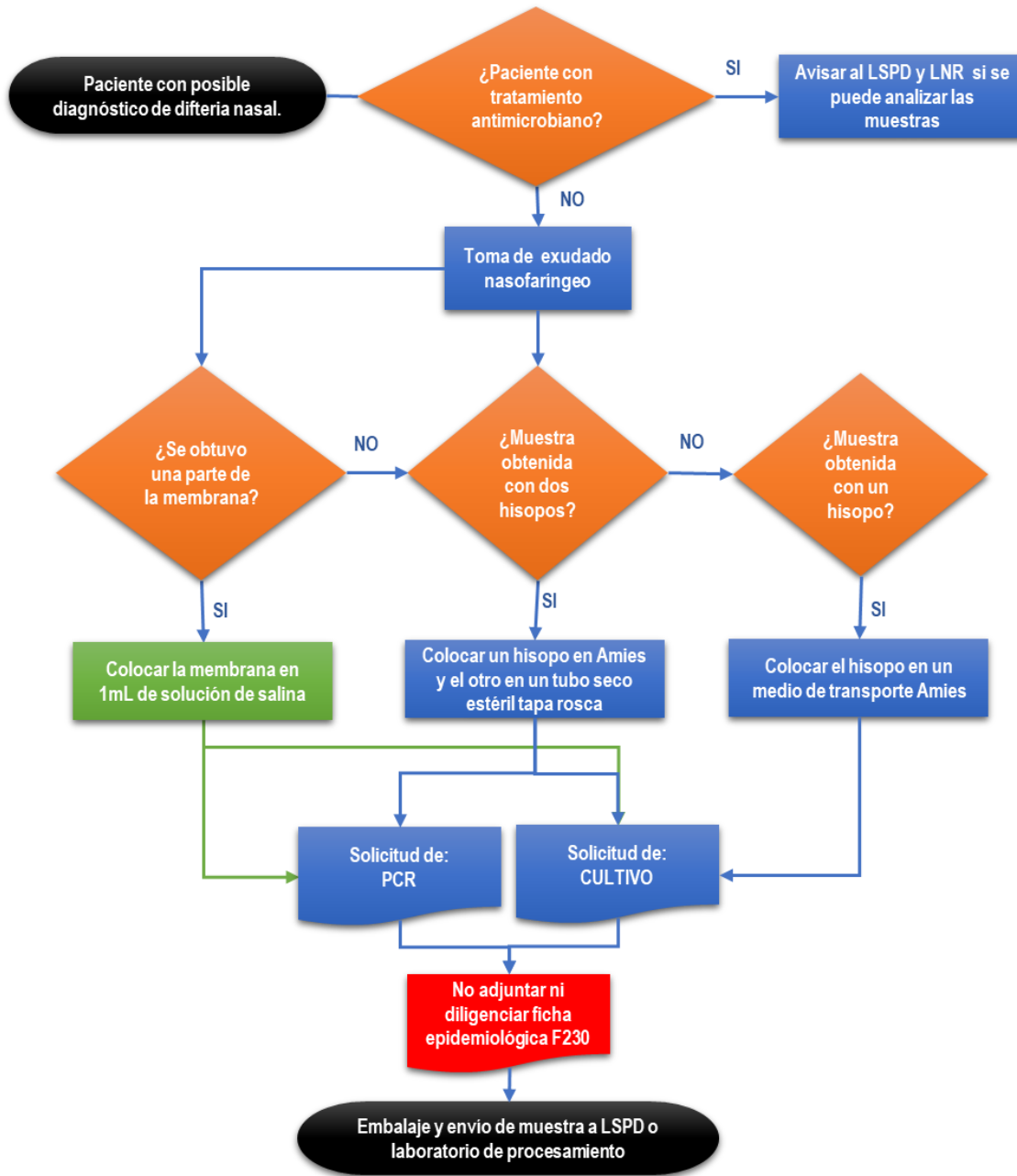
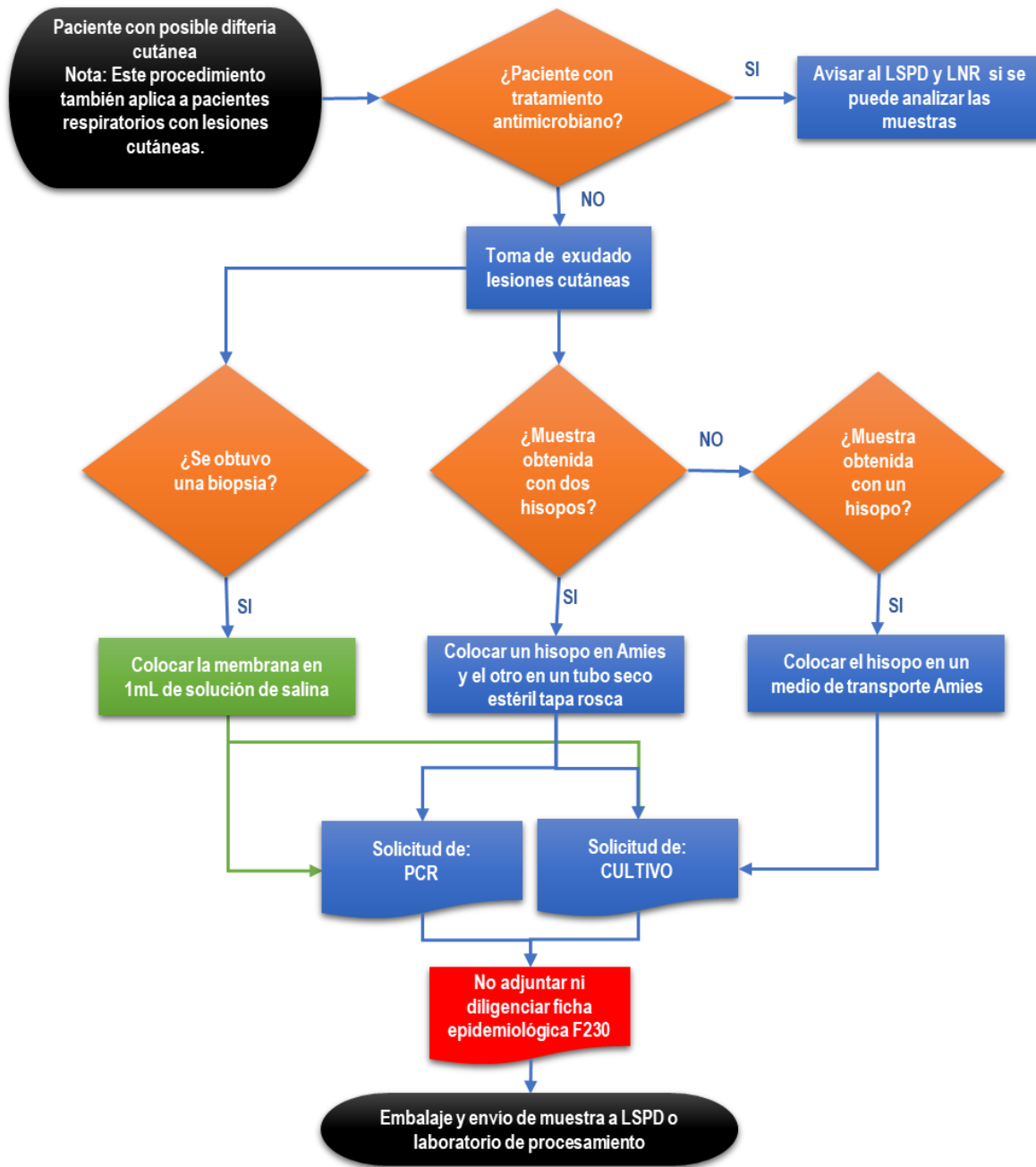


Figura 4. Requisitos generales y toma de decisiones para recolección de muestras de exudado de lesiones cutáneas



2.3 Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:

Tabla 2. Tipo de recipientes, temperatura de almacenamiento y tipo de almacenamiento de muestras para diagnóstico de difteria

Muestra/Matriz	Recipiente primario/medio de transporte/volumen mínimo requerido	Temperatura de almacenamiento y transporte para procesamiento de las muestras		Almacenamiento después del procesamiento	
		antes de 24 horas	después de 24 horas		
Exudado faríngeo para cultivo	Insertar el hisopo dentro del medio de transporte Amies con carbón o Loeffler <24 horas; preferiblemente en bolsas con sílica gel >24 horas	10°C-25°C	2-8°C	Esterilizar y descartar el medio de transporte	
Exudado faríngeo para PCR	Insertar el hisopo en un criovial o tubo tapa rosca y cortar el exceso del mango	2°C-8°C		Guardar una alícuota mínimo de 200µL y almacenar de -20°C a -70°C	
Exudado nasofaríngeo para cultivo	Insertar el hisopo dentro del medio de transporte Amies con carbón o Loeffler <24 horas; preferiblemente en bolsas con sílica gel >24 horas	10°C-25°C		Esterilizar y descartar el medio de transporte	
Exudado nasofaríngeo para PCR	Insertar el hisopo en un criovial o tubo tapa rosca y cortar el exceso del mango	2°C-8°C		Guardar una alícuota mínimo de 200µL y almacenar de -20°C a -70°C	
Exudado de lesiones cutáneas para cultivo	Insertar el hisopo dentro del medio de transporte Amies con carbón o Loeffler <24 horas; preferiblemente en bolsas con sílica gel >24 horas	10°C-25°C		Esterilizar y descartar el medio de transporte	
Exudado de lesiones cutáneas para PCR	Insertar el hisopo en un criovial o tubo tapa rosca y cortar el exceso del mango	2°C-8°C		Guardar una alícuota mínimo de 200µL y almacenar de -20°C a -70°C	
Aislamiento bacteriano	Impregnar todo el hisopo con el aislamiento y colocarlo en el medio de transporte Amies con carbón.	10°C-25°C		10-25°C	Para un aislamiento de <i>Corynebacterium</i> spp criopreservar a -70°C en Skim Milk al 20% o crioperlas para conservación de cepas a -20°C
Muestras de membrana o tejido	Colocar la membrana o tejido en 1 mL de solución salina (0,85%)	2°C-8°C		2-8°C	Guardar una alícuota mínimo de 200µL y almacenar de -20°C a -70°C

2.4 Documentación requerida

- Para los aislamientos de *Corynebacterium* spp. se debe enviar al LNR con el formato diligenciado de envío de cepas para bacteriología general y anaeróbica FOR-R01.5030-005 de solicitud del análisis y ficha epidemiológica INS: F230.
- Para el análisis de muestras tanto para cultivo como para PCR en tiempo real se debe remitir los especímenes con los formatos de datos básicos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública del INS y la ficha epidemiológica de tos ferina INS: F230 adecuadamente diligenciados a los LSPD como al LNR. La única excepción para no anexar la ficha epidemiológica es en los casos de difteria cutánea y nasal en las cuales se solicita un resumen de la historia clínica.

2.5 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico

Las pruebas diagnósticas utilizadas para confirmar la infección incluyen el cultivo para el aislamiento de *C. diphtheriae* y la prueba de Elek la cual verifica la producción de la toxina a partir del aislamiento. Actualmente, varios LNR en el mundo utilizan la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras clínicas para apoyar a la confirmación de la infección en búsqueda de una cepa toxigénica de *C. diphtheriae*, en adición, existen publicaciones de PCR que permiten la detección del gen de la toxina diftérica (*tox*) con y sin detección del gen regulador de la toxina (*dtxR*), sin embargo, la diferencia de las secuencias usadas en PCR afecta la especificidad del resultado debido a las similitudes de secuencias entre algunas especies de corynebacteria. A continuación, se enuncian las pruebas usadas rutinariamente para confirmación de difteria:

2.5.1 Aislamiento de *C. diphtheriae* por cultivo

El aislamiento de *C. diphtheriae* por cultivo es esencial para confirmar la difteria. No obstante, incluso si el cultivo del paciente es negativo y existe un aislamiento de *C. diphtheriae* de contactos cercanos este resultado ayuda a confirmar el diagnóstico del caso. Las muestras clínicas para el cultivo pueden ser tomadas de la faringe, nariz o nasofaringe, no obstante, se recomienda la toma de muestras faríngeas de todos los casos sospechosos y contactos cercanos. Los hisopados en los casos sospechosos deben realizarse con preferencia por debajo de la membrana y en lo posible debe extraerse una pieza de la membrana. Las muestras para el cultivo se deberán obtener tan pronto como la difteria se sospeche, incluso si el tratamiento con antibióticos ha comenzado. Conviene alertar con anterioridad a los laboratorios que vayan a procesar la muestra debido a la necesidad de preparar los medios especiales que contengan telurito de potasio (7) (ver anexo A).

El medio descrito por Tinsdale que contiene L-cistina y telurito de potasio ayuda al aislamiento de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* y *C. pseudotuberculosis* producen un halo marrón bien delineado alrededor de las colonias negro-grisáceas. Un halo marrón se produce por el H₂S obtenido por la acción de la cistinasa en L-cistina y el telurito de potasio (K₂O₃Te) que se reduce a telurito metálico (Te) (2). Se debe incubar a una temperatura de 35-37°C de 18-48 horas preferiblemente en atmosfera de 5% CO₂. El medio de agar sangre cistina telurito es utilizado también para el aislamiento primario de *C. diphtheria* el cual inhibe el desarrollo de la mayoría de las bacterias que normalmente habitan en las vías respiratorias altas por la acción del telurito de potasio. *C. diphtheriae* se desarrolla con producción de colonias grisáceas o negras después de 24 a 48 horas de incubación. Pueden distinguirse el morfotipo de la colonia de los tres biotipos:

1. Colonias del biotipo gravis son planas, de color gris oscuro, con estrías radiales, secas y de bordes irregulares.
2. Colonias de biotipo mitis son pequeñas, negras, brillantes y convexas, con bordes lisos y aspecto húmedo.
3. Colonias del biotipo intermedius son pequeñas planas con un centro negro elevado (8).

2.5.2 Coloración Azul de metileno o coloración Albert (Loeffler) : En esta tinción se observan dentro de las células gránulos de depósito de polifosfato con apariencia rojizo-púrpura (gránulos metacromáticos) casi terminales que confieren una apariencia de cuentas y que pueden sugerir la sospecha de una estructuras (2).

2.5.3 Pruebas de biotipificación y toxigenicidad

Después de haber aislado a *C. diphtheriae* se debe realizar la biotipificación para determinar el biovariedad de la especie *diphtheriae* (intermedius, belfanti, mitis, o gravis) por medio de pruebas bioquímicas convencionales o con técnicas semi o automatizadas de identificación. Las características bioquímicas los biotipos, incluyendo el biotipo belfanti como la variante negativa de nitrato reductasa del biotipo mitis, todas estas características se muestran en este documento; es de destacar que todas las cepas de *C. diphtheriae* carecen de actividad de pirazinamidasa. El biotipo gravis se distingue de mitis por su capacidad de producir ácido a partir de glucógeno(2, 7).

La prueba de Elek es una técnica que determina la producción de la toxina diftérica por parte del microorganismo de manera *in vitro*. Esta técnica es la confirmación de un caso sospechoso de difteria por tres razones:

1. La toxina diftérica es una exotoxina que destruye el tejido local (formación de la pseudomembrana) y se absorbe en el torrente sanguíneo distribuyéndose a sus alrededores resultando en complicaciones sistémicas de la difteria como la neuritis periférica por desmielinización y la miocarditis. También se encuentra involucrada en la trombocitopenia y proteinuria.
2. No todos los aislamientos de *C. diphtheriae* tienen la probabilidad de expresar la toxina debido a que el gen involucrado debe estar integrado al cromosoma bacteriano (profago). Además, el gen se encuentra regulado por una proteína represora bacteriana que controla la expresión del mismo. La expresión de la toxina de acuerdo con su biotipo es → belfanti: 0%, gravis: 95%, intermedius: 99%, mitis: 85%(3).
3. La técnica de PCR no demuestra la producción de toxina diftérica únicamente la detección del gen de la toxina, por tanto una prueba de PCR positiva en ausencia de un cultivo positivo y ausencia de una prueba de toxigenicidad positiva (prueba de Elek) determina que el resultado de PCR no es suficiente para clasificar un caso como difteria (7). No obstante, sí existe una situación de brote y para el caso índice se pudo aislar una *C. diphtheriae* toxigénica, la PCR en tiempo real se convertiría en un apoyo para clasificar los casos según amerite los criterios epidemiológicos y clínicos.

Figura 5. Algoritmo de diagnóstico y resultados por el laboratorio para cultivo

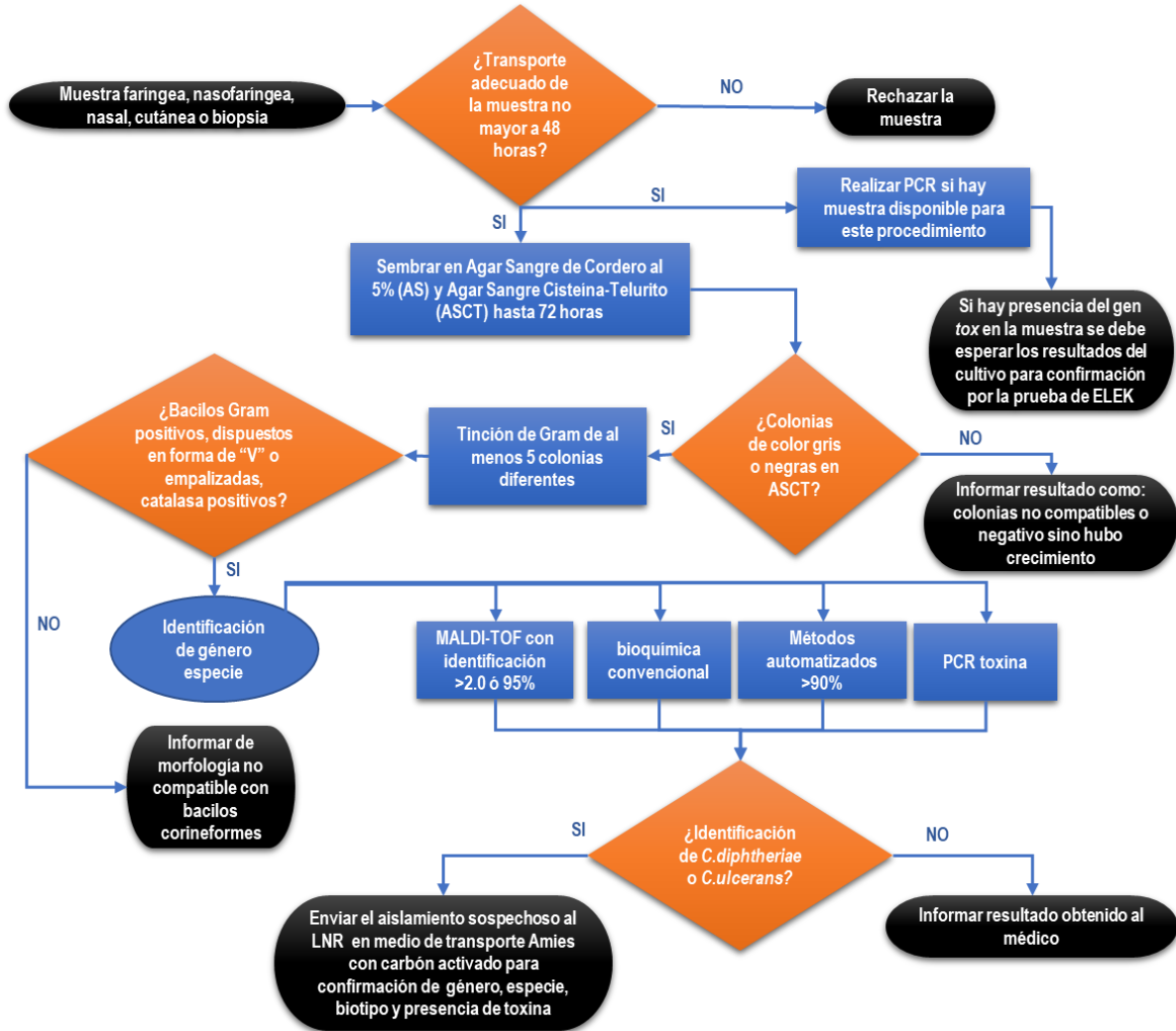
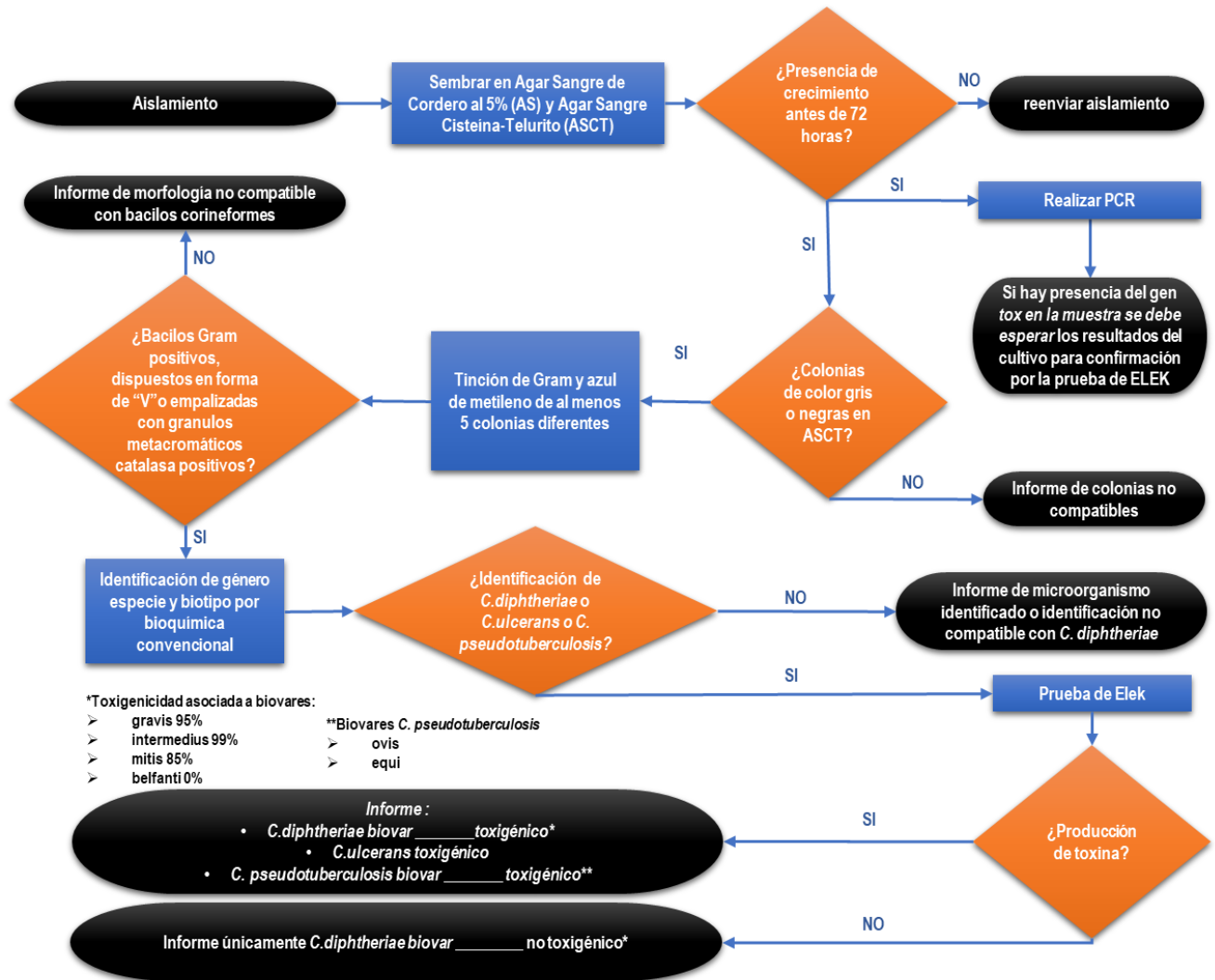


Figura 6. Algoritmo de identificación de Corynebacteria causante de difteria en el Laboratorio Nacional de Referencia



Por razones de vigilancia epidemiológica únicamente el aislamiento identificado como *C. diphtheriae* toxigénico confirma la difteria. Las pruebas de PCR positivas sin aislamiento seguirá ajustado como caso sospechoso al menos que la clínica y las complicaciones pertenezcan a una difteria clásica

Tabla 3. Morfotipo de colonias del género *Corynebacteria* en medios de cultivo disponibles para el aislamiento de especies de importancia clínica

Especie/biovar	Agar Sangre	Agar Telurito de Hoyle	Agar Tinsdale
<i>C. diphtheriae</i> biovar <i>gravis</i>	No hemolítica	Gris / negro mate, opaco, 1,5-2 mm de diámetro, superficie mate, friable, móvil o que tiende a romperse en segmentos pequeños cuando se toca con un asa	Negro con halo de color castaño negro
<i>C. diphtheriae</i> biovar <i>mitis</i>	Pequeña zona de β -hemolisis	Gris / negro, opaco, de 1,5-2 mm de diámetro, borde entero y superficie brillante, variable en tamaño	Negro con halo de color castaño negro
<i>C. diphtheriae</i> biovar <i>intermedius</i>	Pequeña zona de β -hemolisis	Gris / negro, opaco, pequeño, 0.5-1 mm de diámetro, superficie brillante, discreto, translúcido, parcialmente con centro negro	Negro con halo de color castaño negro
<i>C. diphtheriae</i> biovar <i>belfanti</i>	Pequeña zona de β -hemolisis	Gris / negro, opaco, de 1,5-2 mm de diámetro, borde entero y superficie brillante, variable en tamaño	Negro con halo de color castaño negro
<i>C. ulcerans</i>	Pequeña zona de β -hemólisis, gris / blanco, seco, consistencia cerosa, circular, ligeramente convexa con un borde entero	Gris / negro, opaco, muy seco	Negro con halo de color castaño negro
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Pequeña zona de β -hemólisis, de color crema a naranja, anillada concéntrica	Gris / negro, opaco, muy seco	Negro con halo de color castaño negro
<i>C. striatum</i>	No hemolítico, blanco, húmedo, liso	Gris / negro	Negro sin halo
<i>C. jeikeium</i>	No hemolítico, gris / blanco, bajo convexo	Gris / negro	Negro sin halo

Tabla 5. Interpretación de PCR en tiempo real y prueba de Elek (toxigenicidad)

Especie/genes	PCR en tiempo real			Prueba modificada de Elek (toxigenicidad)	Interpretación	Asociado a difteria en humanos
	Gen tox <i>Corynebacterium</i>	Gen <i>rpoB</i> / <i>C. diphtheria</i>	Gen <i>rpoB</i> / <i>C. ulcerans</i> y <i>C. pseudotuberculosis</i>			
<i>C. diphtheriae</i>						
biovar gravis	+	+	-	+	<i>C. diphtheriae</i> biovar gravis toxigénico	SI
biovar mitis	+	+	-	+	<i>C. diphtheriae</i> biovar mitis toxigénico	SI
biovar intermedius	+	+	-	+	<i>C. diphtheriae</i> biovar intermedius toxigénico	SI
biovar belfanti	+	+	-	-*	<i>C. diphtheriae</i> biovar belfanti toxigénico	NO
<i>C. ulcerans</i>	+	-	+	+	<i>C. ulcerans</i>	SI
<i>C. pseudotuberculosis</i>						
biovar ovis	+	-	+	+	<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar ovis toxigénico	NO (afecta a ovinos)
biovar equi	+	-	+	+	<i>C. pseudotuberculosis</i> biovar equi toxigénico	NO (afecta a equinos)

rpoB gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa

*Toxigenicidad asociada a biovars: gravis 95%, intermedius 99%, mitis 85% y belfanti 0%

3. CONTROL DE CALIDAD.

Tabla 6. Evaluaciones del desempeño relacionada con difteria

Nombre		Institución que realiza la prueba y análisis de datos	Muestras que analizar	Población objeto
Evaluación directa del desempeño para cultivo (Nacional)	*Evaluación Directa del Desempeño de Bacteriología y Resistencia Antimicrobiano "EDDBRA"	Instituto Nacional de Salud	Una cepa relacionada con infección respiratoria	Laboratorios de Salud Pública Distritales/ Departamentales y laboratorios de microbiología privados o públicos
Evaluación Indirecta del Desempeño para Cultivo (Nacional)		Instituto Nacional de Salud	100% de las cepas identificadas como <i>Bordetella</i> spp.	Laboratorios de Salud Pública Distritales/ Departamentales

- Para participar de estas pruebas puede ingresar a: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Paginas/introduccion.aspx>

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Corynebacterium diphtheriae*

La vigilancia de agente etiológico *Corynebacterium diphtheriae*, consiste en identificar y describir su circulación en variables relacionadas con sus características genotípicas, su estacionalidad y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención en especial primaria y secundaria, así como estrategias de control.

De igual manera se definirán indicadores que permitirán resumir estos aspectos y publicarlos en forma periódica en informes técnicos, así como la construcción de repositorios institucionales donde fácilmente se puedan obtener los microdatos y permitir su uso por la comunicad científica, médica, académica, administrativa del sistema de salud y el público en general”.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO

5.1 Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)

- Apoyar en la confirmación del diagnóstico a los departamentos.
- Realizar la caracterización y confirmación de los brotes de difteria, el número de muestras dependerá el análisis epidemiológico.
- Realizar la prueba de la toxina (prueba de Elek) para confirmación de difteria.
- Realizar PCR de difteria para apoyo diagnóstico.

- Realizar el control de calidad directo (PEEDD).
- Brindar asesoría técnica al Ministerio de Salud y Protección Social para la formulación de políticas y lineamientos del evento.
- Elaborar informes, guías y documentos técnicos científicos.
- Definir las técnicas de confirmación en los laboratorios.
- Difundir los lineamientos de remisión, transporte, conservación de las muestras y de los aislamientos.
- Realizar la estandarización y/o validación de las metodologías diagnósticas para su implementación en el país.
- Realizar la caracterización microbiológica/ molecular definitiva que confirme la circulación del microorganismo frente a la vacuna.
- Capacitar a los profesionales de la Red de Laboratorios.
- Participar en programas interlaboratorios internacionales o de ensayos de aptitud.

5.2 Funciones del Laboratorio de salud pública departamental o distrital (LSPD).

- Adoptar las políticas nacionales de la RNL.
- Monitorear la red de hospitales y clínicas que realicen diagnóstico de difteria y verificar los estándares de calidad.
- Participar en las evaluaciones externas del desempeño.
- Mantener técnicas de diagnósticas actualizadas para la confirmación de difteria de acuerdo con las recomendaciones nacionales.
- Realizar evaluaciones de desempeño a los laboratorios de su red de laboratorios.
- Confirmar los aislamientos de *Corynebacterium* spp y realizar el envío de cepas confirmadas al laboratorio de referencia.
- Capacitar a la red de laboratorios en la toma, diagnóstico, interpretación de las pruebas y envío de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de difteria.

5.3 Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda.

- Informar a los laboratorios de salud pública las técnicas de diagnóstico que realizan en sus laboratorios para difteria.
- Realizar el cultivo de difteria en los laboratorios que tengan áreas microbiología o bacteriología.
- Participar en evaluaciones externas del desempeño para difteria.
- Realizar la remisión de muestras con la documentación establecida para la vigilancia del evento (ficha de notificación INS:230).
- Informar a los epidemiólogos y al LSP de los casos sospechosos que ingresan al laboratorio.

Tabla 7. Responsabilidades y flujo Red Nacional de Laboratorios

Procedimientos	IPS Laboratorios públicos y privados sin capacidad diagnóstica en microbiología	IPS Laboratorios públicos y privados con capacidad diagnóstica en microbiología	Secretaría departamental de Salud y LSPD Laboratorios de Salud Pública Departamentales y Distrital	INS Grupo de Microbiología
Recolección de muestra	X	X		
Recolección de muestra en apoyo a brotes			X	
Envío de muestra en medio de transporte al LSP	→			
Envío de muestra en medio de transporte al LSP		La muestra debe procesarse aquí		
Aislamiento e identificación del agente etiológico				
Aislamiento de microorganismo en Agar Sangre o Agar Sangre Cisteina-Telurito o Agar Tinsdale		X	X	
Identificación del microorganismos por medios convencionales, semi o automatizados o MALDI-TOF		X	X	
Envío de aislamiento para confirmación		1 →	2 →	
Confirmación del agente etiológico				
Confirmación por pruebas fenotípicas de Género y especie			X	X
Identificación de biotipo (aplica solo para <i>Corynebacterium diphtheriae</i>)				X
Prueba de Elek (prueba de toxina)				X
PCR en tiempo real (muestra y aislamiento)				X
Confirmación de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> toxigénico				X
Confirmación de caso de difteria				Grupo de vigilancia INS
Flujo de resultados de confirmación	←←←			← 1

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia de Difteria. Instituto Nacional de Salud, 2016.
2. Burkovski A. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species: Springer; 2014.
3. Parija SC. Textbook of Microbiology & Immunology. 2nd ed: Elsevier India; 2012. 684 p.
4. CDC. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. 13th ed: Public Health Foundation; 2015 April.
5. OPS. Control de la difteria, la tos ferina, el tétanos, la infección por *Haemophilus influenzae* tipo b y la hepatitis B: guía práctica (Publicación Científica y Técnica No. 604): Organización Panamericana de la Salud; 2006.
6. Ministerio de Salud. Manual de normas y procedimientos de Vigilancia y Control de Enfermedades de Notificación Obligatoria. 2007. p. 98-100.
7. CDC. Diphtheria. In: Sandra W Roush LMB, editor. VPD Surveillance Manual. 5th ed 2012.
8. Koneman EW, Allen S. Koneman. Diagnóstico Microbiológico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas: Médica Panamericana; 2008.
9. CDC. Check List for Assessing a Patient with Suspected Diphtheria. Available from: <https://www.cdc.gov/diphtheria/downloads/dip-cklist-diag.pdf>.

Anexo A

Agar Sangre Cistina Telurito (ACT)

Agua destilada o purificada tipo II	250 mL
Agar Infusión de cerebro y corazón.....	13 g
Sangre de cordero desfibrinada.....	12,5 mL
Telurito de potasio al 0.3%	37,5 mL
L-Cistina (no confundir con L-Cisteína)	12,5 mg

Preparación:

- Colocar en un matraz de Erlenmeyer o botellas de laboratorio de 500 mL, 250 mL de Agua destilada o purificada tipo II + 13 g de agar Infusión de cerebro y corazón. Disuelva y hierva de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- Esterilizar a 15 libras de presión, a 121 °C por 15 minutos.
- Mantener a 47,5 ± 2,5°C en un baño serológico el medio después de esterilizado como mínimo por 15 min.
- Con el medio temperado agregar 37,5 mL de telurito de potasio al 0,3% (ver abajo la preparación de esta solución) y mezclar.
- Agregar 12,5 mg de L-Cistina y mezclar
- Agregar 12,5 mL de Sangre de cordero y mezclar
- Servir en placas de Petri
- Realizar los controles de calidad pertinentes
- Mantener los medios de 6 ± 2°C

Nota: para la mezcla es preferible utilizar planchas donde funcionen las barras magnéticas de mezcla.

Telurito de potasio al 0.3%

Agua destilada o purificada tipo II	400 mL
Telurito de potasio	1200 mg

Preparación:

- Colocar en un matraz de Erlenmeyer o botellas de laboratorio de el agua y el telurito de potasio y mezclar hasta disolver.
- Esterilizar al vacío con unidades de filtro desechables de 500mL.
- Mantener la solución de 6 ± 2°C