

**El Estado de Portador sano en Difteria.
Estudio Bacteriológico y de Susceptibilidad
a los Agentes Antimicrobianos.
Ensayos de Esquemas Terapéuticos.**

Dr. Ricardo Cárdenas C.

Profesor Asistente de la
Cátedra de Microbiología
Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento al personal Médico y Enfermeras del Departamento de Epidemiología y al personal de Laboratorio de la Unidad Sanitaria de Maracaibo.

A todos los integrantes de la Cátedra de Microbiología por su valiosa colaboración durante la realización de este estudio.

A la Sra. Yolanda de Moreno quien estuvo a cargo de la transcripción mecanográfica.

CONTENIDO

	Págs.
Lista de Ilustraciones	278
Símbolos y abreviaturas	280
Introducción	280
Materiales y Métodos	285
Resultados	289
Discusión	299
Resumen	302
Resumen analítico	303
Referencias Bibliográficas	304

LISTA DE ILUSTRACIONES:

	Pág.
Cuadro No. 1: Portadores sanos en Venezuela durante los últimos 10 años.	282
Cuadro No. 2: Portadores sanos en Maracaibo durante los últimos 10 años.	283
Cuadro No. 3: Porcentaje de portadores sanos en Maracaibo en los últimos 5 años.	284
Cuadro No. 4: Guía para interpretar el tamaño del halo de inhibición.	287
Cuadro No. 5: Esquemas del tratamiento.	288
Fotografía No. 1: Medio de Tinsdale Modificado. Colonias de <i>C. diphtheriae</i> , rodeadas de un halo marrón intenso.	290
Cuadro 6: Características bioquímicas de las cepas aisladas.	290

Cuadro No. 7:	
Otras características de las cepas aisladas.	291
Cuadro No. 8:	
Corynebacterium diphtheriae: Caracterización del tipo Mitis.	291
Cuadro No. 9:	
Pruebas de toxigenicidad.	292
Fotografía No. 2:	
Prueba de toxigenicidad in vitro.	292
Fotografía No. 3:	
Prueba de toxigenicidad in vivo.	293
Cuadro No. 10:	
Edad de los portadores.	294
Cuadro No. 11:	
Sexo de los portadores.	294
Cuadro No. 12:	
Actividad laboral de los portadores sanos	295
Cuadro No. 13:	
Halos de inhibición.	296
Cuadro No. 14:	
Corynebacterium diphtheriae 17 casos 1973-1974. Niveles en $\mu\text{gr/ml}$. y U/ml. de Penicilina G.	
Método de dilución seriada en tubo.	296
Cuadro No. 15:	
Corynebacterium diphtheriae. 17 casos 1973-1974. Niveles en $\mu\text{gr/ml}$. a los agentes antimicrobianos. Método de dilución seriada en placa.	297
Cuadro No. 16:	
Número de pacientes tratados con los diferentes esquemas.	298
Cuadro No. 17:	
Cultivos de control.	298

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

M.S.A.S.	Ministerio de Sanidad y Asistencia Social.
C.	Corynebacterium
ml.	mililitros
U.	Unidades
μ gr. ó mcg.	microgramos
T.A.T.	Tripticasa Agar Telurito.
M. T.M.	Medio de Tinsdale Modificado
A.S.H.	Agar Sangre Humana
h.	horas
mm.	milímetros

INTRODUCCION

Dentro del cuadro epidemiológico de la Difteria, es importante establecer tres factores como fuente de infección; casos clínicos, subclínicos y portadores. Los portadores pueden ser divididos en primarios y secundarios. Los primarios o portadores sanos son aquellos que no han padecido la enfermedad, siendo completamente asintomáticos pero alojando el bacilo en la cavidad naso y orofaríngea. Los secundarios vienen a ser los portadores convalecientes, quienes luego de padecer la enfermedad pueden continuar alojando el bacilo en nariz y garganta, por un período variable de tiempo el cual oscila entre 4 a 10 semanas.

Al jerarquizar las fuentes de contaminación de acuerdo a su importancia, los enfermos y portadores convalecientes ocupan el primer lugar, el segundo lugar lo ocupan los portadores sanos.

El portador sano no es infrecuente, en sitios donde la Difteria es endémica por lo general oscilan entre 1 % al 5 % y constituye indudablemente una fuente muy importante de contagio (1-4).

De acuerdo a trabajos realizados por diversos autores (5-10), estas cifras anteriormente mencionadas acusan variaciones de país a país e inclusive entre regiones de un mismo país.

Paraje et al. en Córdoba, Argentina, estudiando escolares, encontraron porcentajes de portadores sanos de 0.20% a 0.40 % durante los años de 1949-1950 (5).

Tranchet realizando investigaciones en escolares de Tucumán, Argentina, reporta 1.07 % de portadores sanos durante los años 1942-1943. (6).

Durante los años de 1945 hasta 1948 Manzullo y Hansen en Argentina, reportan 7% y 10% respectivamente. Estudiando el mismo problema en el período de 1950 a 1953 Manzullo realiza un trabajo en niños provenientes de clase económica alta y baja, reportando porcentajes de 17.5 % y 19.6% (7,8).

Burrows (9) cita los trabajos de Doull y Falles, que reportan en escolares de Baltimore porcentajes de 2,32% y también de Dudley que en escolar da porcentajes de portadores sanos del 6.6% .

Halbrohr et al. (10) utilizando la reacción de Schick para determinar la susceptibilidad a la Difteria en la población infantil de Maracaibo, concluyen en base a los resultados obtenidos que existe un número importante de portadores sanos en nuestra población, desafortunadamente ellos no fundamentan esta afirmación en bases estadísticas.

En el cuadro No. 1, según los datos obtenidos de los Anuarios de Epidemiología y Estadística Vital del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, puede verse cual es la situación con respecto a los portadores sanos en Venezuela en los últimos 10 años (11).

En el cuadro No. 2 se observan, según la información suministrada por el Servicio de Epidemiología y Estadística Vital de la Unidad Sanitaria de Maracaibo, las cifras de portadores sanos en la ciudad de Maracaibo durante los últimos 10 años (12).

CUADRO No. 1
PORTADORES SANOS EN VENEZUELA DURANTE LOS ULTIMOS
10 AÑOS

AÑO	PORTADORES
1964	41
1965	67
1966	153
1967	104
1968	108
1969	195
1970	428
1971	415
1972	584
1973	291

Anuario de Epidemiología y Estadística Vital del M.S.A.S. años 1964-1974.

De acuerdo a información obtenida del Servicio de Epidemiología de la Unidad Sanitaria de Maracaibo y tomando en consideración los exudados nasofaríngeos, en el cuadro No. 3 se expresa el número y porcentaje de portadores sanos detectados en ese servicio en los últimos 5 años.

Los criterios usados para la identificación de los portadores sanos y que permitieron determinar las cifras anteriormente señaladas, no están de acuerdo con los acá utilizados para tal fin. Llama la atención que desde el inicio del trabajo con el Servicio de Epidemiología de la Unidad Sanitaria de Maracaibo, el descenso en el número de portadores sanos es

CUADRO No. 2
 PORTADORES SANOS EN MARACAIBO DURANTE LOS ULTIMOS
 10 AÑOS

AÑO	PORTADORES
1964	22
1965	50
1966	93
1967	85
1968	86
1969	175
1970	341
1971	397
1972	563
1973	233

Servicio de Epidemiología y Estadística Vital. Unidad Sanitaria de Maracaibo.

considerable. En base a lo anteriormente expuesto se concluye que probablemente no todos los portadores sanos reportados en el pasado lo eran realmente.

Se considera que la determinación de los porcentajes de portadores sanos y la eliminación de tal estado en la población, es de capital importancia para el control epidemiológico de la Difteria, por ello el especial cuidado que debe prestarse a ambos aspectos.

No obstante que Frobisher y Dudley le conceden acción patogénica e inmunizante a las cepas no toxigénicas (1), es generalmente aceptado la

importancia que reviste la determinación de la toxigenicidad de las cepas aisladas, por el significado patogénico y epidemiológico de las cepas toxigénicas que de las no toxigénicas.

CUADRO No. 3
PORCENTAJES DE PORTADORES SANOS EN MARACAIBO EN
LOS ULTIMOS 5 AÑOS.

AÑO	EXUDADOS	PORTADORES	%
1969	18.520	175	0,94
1970	27.611	341	1,24
1971	29.955	397	1,33
1972	32.492	563	1,73
1973	27.821	233	0,84

Aun cuando la antitoxina diftérica se ha mostrado de gran utilidad por su acción neutralizante sobre la toxina, ella no logra ejercer acción alguna para erradicar el bacilo del huésped, teniéndose que recurrir a la acción de los antimicrobianos. La Penicilina ha resultado ser el antimicrobiano más comúnmente empleado en el tratamiento de la Difteria y se han acumulado evidencias que muestran que su uso reduce el período clínico y erradica el estado de portador (13-15).

La finalidad de este estudio es la de establecer en nuestro medio normas bacteriológicas que permitan detectar con certeza el estado de portador sano y la determinación de toxigenicidad en las cepas aisladas. Se trata además de ensayar varios esquemas terapéuticos para evaluar su posible utilidad en la erradicación del estado de portador sano. En relación a éste último aspecto se ensayan regímenes terapéuticos con Penicilina, Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina.

MATERIALES Y METODOS

El material está representado por 17.000 exudados nasofaríngeos practicados entre los meses de Noviembre y Diciembre de 1973 y de Enero a Julio de 1974, a una población de personas que en virtud de su actividad laboral, acudieron a la Unidad Santiaria de M̄racaibo, en solicitud del certificado de salud.

La población estudiada está constituida principalmente por: manipuladores de alimentos, educadores, niñeras, peluqueros y en menor número por Médicos, Odontólogos, Bioanalistas y Enfermeras.

De las muestras estudiadas 115 (0.67%) mostraron microscópicamente morfología compatible con los miembros del grupo *Corynebacterium*, y de ellos 17 (0.1%) resultaron, al ser cultivados y caracterizados bioquímicamente ser *C. diphtheriae*, ellos constituyen el material definitivo de estudio utilizado en este trabajo.

La sistemática utilizada para el aislamiento y caracterización de estas cepas de *C. diphtheriae* es la que se describe.

La muestra tomada por hisopado nasofaríngeo, se siembra en el bisel de un medio de Loeffler incubándose luego a 37° C durante 6 a 18 horas. Transcurrido este tiempo se practican extendidos para coloración de Gram y gránulos metacromáticos (Azul de metileno, Neisser o Ljubinsky). Si en los extendidos se observan bacilos con morfología y afinidad tintorial sugestiva de un representante del género *Corynebacterium*, a partir del medio de Loeffler se realiza una siembra en Trypticase Agar Telurito en placa, este último a concentración del 0.1%, la cual es incubada durante 18 a 24 horas a 37° C. A partir de este medio, a colonias con características de un miembro del género *Corynebacterium*, se les practica coloración de Gram con el fin de corroborar morfología y afinidad tintorial. Si las características son compatibles con un *Corynebacterium*, para obtener un cultivo puro, se realiza un nuevo repique en medio de Loeffler el cual es incubado a 37° C. durante 6 a 18 horas. La pureza del cultivo es luego confirmada mediante extendidos coloreados con la técnica de Gram y gránulos metacromáticos. El cultivo puro es sembrado en caldo libre de carbohidratos para ser sometido a estudio bioquímico en medios de Urea de Christensen, Nitratos, Cistina Trypticase Agar con Glucosa, Maltosa y Sacarosa. Los medios se incuban a 37° C por 24 a 48 horas. Si en ellos

las reacciones resultan compatibles con las descritas para *C. diphtheriae*, las siguientes características son estudiadas: actividad en medio de Cistina Tripticasa Agar con Almidón, Glucógeno y Dextrina, morfología de las colonias en medio de Tripticasa Agar Telurito, producción de halo en el medio de Tinsdale modificado, formación de película en caldo, motilidad producción de catalasa y de hemólisis en Agar Sangre Humana y Agar Sangre de Carnero (16-23).

Se determina también la toxigenicidad de las cepas *in vivo* e *in vitro*. Para detectar la producción de toxina; *in vitro*, se sigue el método de inmunodifusión, originalmente descrito por Eleck (25) con la modificación de Hermann, Moore y Parsons. El medio utilizado es KL Virulencia, con el enriquecimiento KL incorporado. (Difco). Una solución de 500 U de antitoxina diftérica (Bering) por ml. es utilizada para impregnar una tira de papel filtro (Watman No. 1) estéril de 60 por 15 mm. la cual después de eliminar el exceso de antitoxina diftérica, se sumerge en el seno del agar en el momento de su preparación. La placa después de solidificado el agar, es secada colocándola a temperatura de incubadora durante una hora. La placa puede ser usada después de secada o dentro de cinco días si se la guarda en refrigeración. Se recomienda usarla el mismo día de su preparación. Para la siembra se emplea un cultivo puro de 24 horas en Caldo Cerebro Corazón. En la prueba debe incluirse un control positivo (cepa toxigénica) y un control negativo (cepa no toxigénica) (16, 17, 24).

Para la prueba *in vivo*, se utiliza la metodología descrita por G. J. Hermann (23). Se emplean conejos blancos, cuyo dorso es afeitado con máquina eléctrica y demarcado en cuadrantes. De un cultivo de 24 horas en Caldo Cerebro Corazón, 0.2 ml. de la cepa en estudio y de los controles es inyectado, por vía intradérmica, en los cuadrantes antes mencionados. Para la inyección se utilizan jeringas de 2 ml. graduadas en décimas de ml. con agujas No. 26. Las jeringas son guardadas inmediatamente bajo refrigeración con el resto del cultivo. Se esperan de cuatro a seis horas para inyectar 500 U de antitoxina diftérica por vía endovenosa (vena marginal de la oreja) ó 1.000 U, si se emplea la vía intraperitoneal o muscular. Si se utiliza la vía endovenosa, inmediatamente o, transcurridos 30 minutos si se emplean las otras dos vías, se inyectan intradérmicamente 0,2 ml. del cultivo inoculado anteriormente. Ha de tenerse precaución en utilizar el cuadrante opuesto al empleado en la primera inyección intradérmica (16, 17). Para establecer criterios de sensibilidad y resistencia, con la finalidad de iniciar el tratamiento en base al uso de cualquiera de los agentes anti-

microbianos antes mencionados, se emplea el método del disco único de alta potencia según lo determinado por A. W. Bauer (26, 27). El medio empleado es Mueller Hinton, el inóculo utilizado proviene de un Caldo Cerebro Corazón, el cual es incubado durante 24 horas y luego diluido en solución salina fisiológica estéril, hasta alcanzar una turbidez comparable a la mostrada por un patrón, preparado por adición de 0,5 ml de BaCl_2 0,048 M (11,7 gr. de $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por litro) a 99 ml. de H_2SO_4 al 1 % v/v (0.36 N). El patrón es preparado mensualmente y repartido en tubos idénticos a los empleados para efectuar la dilución. Para Penicilina, Lincomicina y Tetraciclina se siguen los criterios establecidos por el método. Para Rifampicina se siguen los suministros por los Laboratorios Lepetit, los cuales elaboran el antibiótico.

En el cuadro No. 4 puede apreciarse la concentración de los discos en U o en mcg., y los diámetros de la zona de inhibición en mm. para los diferentes agentes utilizados en el estudio. Los resultados de alta sensibilidad obtenidos por el método del disco único de alta potencia de A. W. Bauer, se corroboran utilizando el método de dilución seriada en tubo para la Penicilina y el de dilución seriada en placa para Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina.

CUADRO No. 4
GUIA PARA INTERPRETAR EL TAMAÑO DEL HALO DE INHIBICION.

AGENTE ANTI-MICROBIANO	POTENCIA DEL DISCO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION EN MILIMETROS.		
		<u>RESISTENTE</u>	<u>INTERMEDIO</u>	<u>SENSIBLE</u>
PENICILINA G	10 U	11 ó menos	12 - 21	22 ó más
RIFAMPICINA	30 ugr			13 ó más
LINCOMICINA	2 ugr	9 ó menos	10 - 14	15 ó más
TETRACICLINA	30 ugr	14 ó menos	15 - 18	19 ó más

Los medios utilizados fueron Caldo Cerebro Corazón y Mueller Hinton Agar respectivamente. El inóculo utilizado es aproximadamente 10^5 bacterias. La concentración inhibitoria mínima (MIC) es interpretada como la menor concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de *C. diphtheriae*, lo cual se traduce por ausencia de turbidez o de crecimiento en los tubos o en las placas respectivamente. La misma es expresada en U o mcg./ml. Las concentraciones utilizadas de los antibióticos son de: 25 ug/ml., 12,5 ug/ml., 6.25 ug/ml., 3,17 ug/ml., 1,56 ug/ml., 0,78 ug/ml., 0,39 ug/ml., 0,09 ug/ml., 0,045 ug/ml. Un tubo o una placa conteniendo el caldo o el agar sin antibiótico es utilizado como control (28, 29).

El tratamiento del portador sano se realiza de acuerdo a uno de los esquemas descritos en el cuadro No. 5. La selección del esquema de tratamiento se hace, una vez que el *C. diphtheriae* resulte ser sensible de acuerdo a los criterios descritos previamente.

CUADRO No. 5

ESQUEMA DE TRATAMIENTO	
ESQUEMA No. 1: PENICILINA G PROCAINICA:	400.000 Unidades dos veces diarias cada 4 días seguidas de 400.000 Unidades diarias por 3 días.
ESQUEMA No. 2: RIFAMPICINA:	Dosis inicial 2 cápsulas de 300 mgr, seguidas de 1 cápsula cada doce horas por 4 días.
ESQUEMA No. 3: LINCOMICINA:	Una cápsula de 500 mgr. cada ocho horas durante seis días.
ESQUEMA No. 4: TETRACICLINA:	Una cápsula de 250 mgr. cada seis horas durante una semana.

Para evaluar los resultados del esquema terapéutico, utilizado en el portador sano con el fin de eliminar dicho estado, a cada uno de ellos se le realizan controles bacterianos al 2o., 3o., 4o., día y 2o., mes después de finalizado el tratamiento con el antimicrobiano, el criterio para determinar la eliminación del estado de portador sano, se basa en la ausencia total del *C. diphtheriae* en los cultivos de los exudados nasofaríngeos, que se realizan en los períodos antes mencionados (4, 14).

También se interrogan a los tratados sobre alguna manifestación durante la administración del tratamiento; tales como alergias, diarreas, náuseas, vómitos, mareos, cólicos, epigastálgias o cualquier otra cosa que fuese descrita.

RESULTADOS

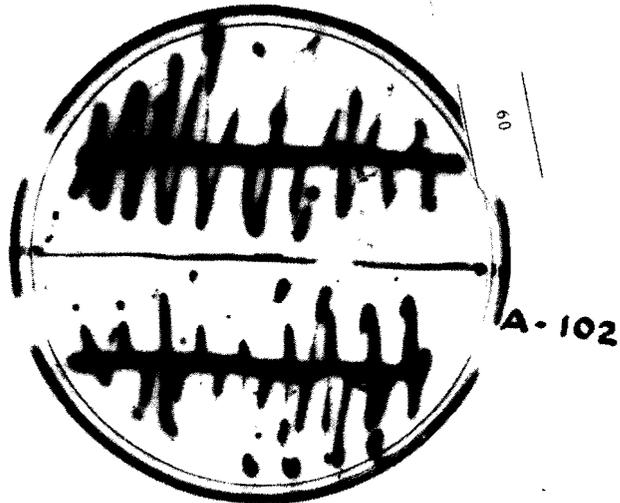
En el medio de Trypticase Agar Telurito y utilizando concentraciones de telurito de 0.1 % , todas las 17 cepas aisladas muestran las características descritas para el tipo mitis de *C. diphtheriae*.

Las colonias, por lo general, después de 18 a 24 horas de incubación, son lisas, grises con centro negro y van ennegreciéndose a medida que transcurre el tiempo de incubación.

En el medio de Tinsdale Modificado las cepas producen colonias convexas, grises o negras, rodeadas, en el 100% de ellas de un halo marrón intenso, después de 24 a 48 horas de incubación. La punción del medio con el asa, permite detectar prematuramente el oscurecimiento del medio por el *C. diphtheriae*, pudiendo ello hacerse evidente entre 12 a 18 horas.

En la fotografía No. 1 puede apreciarse, en el medio de Tinsdale Modificado, las colonias de *C. diphtheriae*, rodeadas de un halo marrón intenso.

Microscópicamente la morfología corresponde a la propia del género *Corynebacterium*, observándose la presencia de los gránulos metacromáticos y la existencia de un marcado pleomorfismo. Es de hacer notar que morfológicamente es difícil hacer diferenciación entre *C. diphtheriae* y los difteroides, pues la semejanza es muy marcada.



FOTOGRAFIA No. 1: Puede apreciarse en el medio de Tinsdale Modificado, las colonias de *C. diphtheriae*, rodeadas de un halo marrón intenso.

En su comportamiento bioquímico hay un predominio de la variedad de *C. diphtheriae* que fermenta la Sacarosa, el 88.2 % pertenecen a esta variedad.

En los cuadros No. 6 y No. 7, se observan las características presentadas por las cepas aisladas.

CUADRO No. 6

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

No. CEPAS	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	ALMIDON	GLUCOGENO	DEXTRINA	UREA	NITRATOS
17	+100	+100	+88.2	-0	-0	-0	-0	+100
A-102	+	+	-	-	-	-	-	+

Los números expresan porcentajes de positividad.

A-102 Cepa Control. *C. diphtheriae* obtenida del Instituto Pasteur de París.

CUADRO No. 7

OTRAS CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS

No. CEPAS	MORFOLOGIA EN T.A.T.	HALO EN M. T. M.	PELICULA EN CALDO	HEMOLISIS EN A.S.H.	MOTILIDAD	CATALASA
	24 h					
17	Lisos grises. Centro negro	Marrón intenso.	- 0	+100	-0	+100
	+100	+100				
	24 h					
A-102	Lisas grises. Centro negro	Marrón intenso.	-	+	-	+

Los números expresan porcentajes de positividad.

El cuadro No. 8 muestra las características de las cepas estudiadas que permiten su clasificación dentro del tipo mitis.

CUADRO No. 8

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE 17 CEPAS. CARACTERIZACION DE TIPO MITIS

TIPO	No DE CEPAS	MORFOLOGIA	COLONIAS EN T. A. T. 24 h.	HALO EN M. T. M.	G	M	S	Al.	Gl.	Dex.	Urea	Nit.	Pel. en caldo	Hemol. en ASH	Mot.	Cat.
C. diphtheriae Mitis	15	Bacilos con gránulos metacromáticos	Pequeñas, lisas, grises o negras	Halo marrón	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
C. diphtheriae Mitis	2	Bacilos con gránulos metacromáticos	Pequeñas, lisas, grises o negras	Halo marrón	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
C. diphtheriae Mitis	A-102	Bacilos con gránulos metacromáticos	Pequeñas, lisas, grises o negras	Halo marrón	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+

G = Glucosa

M = Maltosa

S = Sacarosa

Al. = Almidón

Gl. = Glucógeno

Dex. = Dextrina

Nit. = Nitratos

Pel. = Película

Hemol. = Hemólisis

Mot. = Motilidad

Cat. = Catalasa.

CUADRO No. 9
PRUEBAS DE TOXIGENICIDAD

No. DE CEPAS	IN VITRO	IN VIVO
15	+ 100	+ 100
2	- 0	- 0
A-102	+	+

Los números expresan porcentaje de positividad.

Por los métodos in vitro e in vivo es demostrada la toxigenicidad en 15 de las cepas (88.2%). En dos de las cepas aisladas, los métodos in vivo e in vitro, fracasaron en detectar la producción de toxina. El cuadro No. 9 muestra la existencia de una correlación del 100% entre ambos métodos. En el método in vitro cuando cepas toxigénicas están adyacentes, una reacción de identidad entre las bandas de precipitación producidas por la reacción toxina-antitoxina puede hacerse evidente después de las 48 horas. Ello puede evidenciarse en la fotografía No. 2.



FOTOGRAFIA No. 2: PRUEBA DE TOXIGENICIDAD IN VITRO. Se pueden apreciar las bandas de precipitación y la reacción de identidad que evidencia la producción de toxina, en dos de las cepas estudiadas. La cepa A-102 (control positivo) es mostrada al lado izquierdo de la foto.



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

En la fotografía No. 3 pueden apreciarse en el dorso de un conejo las lesiones necróticas ocasionadas por la toxina de las cepas, en la prueba de toxigenicidad in vivo.

La edad de los portadores sanos detectados, oscila entre los 14 y 70 años, 6 de ellos (35.2%) corresponden a la segunda década de la vida, y 8 (47.5%) aislamientos de *C. diphtheriae* se producen en individuos entre 30 y 70 años.

El cuadro No. 10 muestra los detalles sobre las edades de los portadores sanos detectados.

CUADRO No. 10

EDAD DE LOS PORTADORES

EDAD	PORTADORES
14 a 20 años	6 (35,2 %)
20 a 30 años	3 (17,6 %)
30 a 70 años	8 (47,5 %)

En relación al sexo de los portadores sanos, el porcentaje más elevado corresponde al sexo femenino. En el cuadro No. 11 revela la relación entre el número de portadores y el sexo de los mismos, con sus respectivos porcentajes.

CUADRO No. 11

SEXO DE LOS PORTADORES

SEXO	No. PORTADORES	%
MASCULINO	3	17,7
FEMENINO	14	82,3

El cuadro No. 12 muestra el número y porcentaje de los portadores sanos, de acuerdo a su actividad laboral.

Predominan los portadores sanos dentro de los manipuladores de alimentos, 8 de los 17 portadores realizan este oficio. 6 laboran como domésticas haciendo notar que en sus lugares de trabajo tienen contacto con niños y también con alimentos. El resto de los portadores sanos están representados por: una camarera de un hospital, un oficinista y por último un desempleado.

Se considera de importancia estudiar a todas las personas que mantienen contacto con los portadores sanos, sin embargo no se obtiene el éxito deseado, pues varios de los contactos no asisten al llamado. No se aísla ningún portador sano entre los contactos a quienes se logra realizar exudados nasofaríngeos.

CUADRO No. 12

ACTIVIDAD LABORAL DE LOS PORTADORES SANOS	
Manipuladores de alimentos	8 (47 %)
Domésticas	6 (35,2 %)
Oficinista	1 (5,8 %)
Camarera de hospital	1 (5,8 %)
Sin ocupación	1 (5,8 %)

En el cuadro No. 13 se expresan los halos de inhibición de las 17 cepas aisladas, determinados por los cuatro antimicrobianos, Penicilina, Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina.

La sensibilidad mostrada por las cepas aisladas a los 4 antimicrobianos, al emplear el método del disco de alta potencia de A. W. Bauer es corroborada mediante el método de dilución seriada en tubo utilizado para la Penicilina y la dilución seriada en placa para Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina.

CUADRO No. 13
HALOS DE INHIBICION

CEPAS	PENICILINA	RIFAMPICINA	LINCOMICINA	TETRACICLINA
60	38	53	35	35
936	36	50	35	37
2321	38	55	40	40
2625	47	60	40	40
1771	37	45	30	30
18214	36	55	35	40
321	50	45	30	35
3013	36	50	35	40
7622	36	50	40	35
01	41	55	35	40
18884	36	55	40	40
17659	34	53	45	40
7576	39	59	35	35
6954	37	50	35	37
6385	40	50	35	37
8744	36	50	35	37
14875	37	50	37	37

Expresados en mm.

CUADRO No. 14

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE. 17 CASOS 1973-1974 NIVELES EN ugr/ml. y U/ml. DE PENICILINA G. METODO DE DILUCION SERIADA EN TUBO.

AGENTE ANTIMICROBIANO	ugr/ml.	U/ml.	No. CEPAS
PENICILINA	25	(41.3)	
	12.5	(20.6)	
	6.25	(10.3)	
	3.17	(5.15)	
	1.56	(2.57)	
	0.78	(1.28)	
	0.39	(0.64)	
	0.19	(0.32)	
	0.09	(0.16)	4
	0.045	(0.08)	17
	Control	(0.08)	17

Los cuadros No. 14 y 15 muestran los resultados obtenidos con el método de dilución seriada en tubo y placas respectivamente.

CUADRO No. 15

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE. 17 CASOS 1973-1974. NIVELES EN $\mu\text{gr/ml}$. A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS. METODO DE DILUCION SERIADA EN PLACA.

AGENTE ANTIMICROBIANO	$\mu\text{gr/ml}$.	No. DE CEPAS
RIFAMPICINA	25	
	12.5	
	6.25	
	3.17	
	1.56	
	0.78	
	0.39	
	0.19	
	0.09	
	0.045	17
	Control	17
LINCOMICINA	25	
	12.5	
	6.25	
	3.17	
	1.56	
	0.78	
	0.39	
	0.19	
	0.09	
	0.045	17
	Control	17
TETRACICLINA	25	
	12.5	
	6.25	
	3.17	
	1.56	
	0.78	
	0.39	
	0.19	
	0.09	
	0.045	17
	Control	17

En el cuadro No. 16 se indica el número de portadores sanos tratados con los diferentes esquemas de tratamiento.

CUADRO No. 16

NUMERO DE PACIENTES TRATADOS CON LOS
DIFERENTES ESQUEMAS

ESQUEMA No. 1	5
ESQUEMA No. 2	4
ESQUEMA No. 3	5*
ESQUEMA No. 4	4

*Un fracaso tratado nuevamente con Penicilina G.

Al observar los resultados del tratamiento con los 4 esquemas anteriormente mencionados, se aprecia que con excepción de Lincomicina, los otros 3 resultan igualmente efectivos, teniendo como criterio de eliminación del estado de portador sano, la ausencia de *C. diphtheriae* en los cultivos de control que se realizan al 2, 3; 4 día y 2 meses después de finalizado el tratamiento.

De los 5 portadores sanos tratados con el esquema No. 3 (Lincomicina), 4 respondieron exitosamente al mismo, pero uno de ellos, aun cuando sus estudios bacteriológicos de control se muestran negativos durante el 2, 3 y 4 día después de finalizado el tratamiento, este resultó nuevamente positivo en el estudio bacteriológico realizado al 2do. mes. Nuevamente es tratado con Penicilina y en los controles bacteriológicos hasta el 2do. mes resultan negativos.

El cuadro No. 17 indica los resultados de los cultivos de control luego de finalizado el tratamiento, con los 4 esquemas.

CUADRO No. 17
CULTIVO DE CONTROL

	2 do. día	3er. día	4 to. día	2 do. mes
PENICILINA	-5	-5	-5	-5
RIFAMPICINA	-4	-4	-4	-4
LINCOMICINA	-5	-5	-5	-4
				+1
TETRACICLINA	-4	-4	-4	-4

(-) Indica ausencia de *C. diphtheriae* en los cultivos

(+) Indica crecimiento de *C. diphtheriae* en los cultivos

Los números indican los portadores sanos tratados.

DISCUSION

Parece ser una necesidad apremiante que el Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de la Unidad Sanitaria de Maracaibo y cualquiera otra entidad similar deba disponer de una metodología adecuada para detectar casos y portadores sanos de *C. diphtheriae*. Esta es una falla no solo local, sino que reviste un carácter nacional. Deben hacerse esfuerzos para que se adopten criterios de diagnósticos bacteriológicos adecuados, en lo referente a esta enfermedad ya que ello es fundamental para su control epidemiológico.

El criterio arriba expresado, es sustentado por los resultados obtenidos en este estudio. En él se aprecia un considerable descenso en el número de portadores sanos detectados, desde el momento en que conjuntamente con el Laboratorio de la Unidad Sanitaria de Maracaibo se comenzó a poner en práctica una metodología definida de diagnóstico y el alto número de los mismos cuando no se habían tomado en cuenta dichas pautas diagnósticas.

Las cifras reportadas con anterioridad a este estudio, son francamente superiores tanto en volumen total como porcentual y las personas investigadas en el pasado y durante el estudio comparten las siguientes propiedades:

- 1.- El número de personas estudiadas, se mantiene en los últimos cinco años relativamente estable, con respecto a esta investigación.
- 2.- Se trabaja con los mismos grupos sociales y laborales.
- 3.- Tanto anteriormente como ahora, los casos estudiados son adultos y en lo referente al sexo no existen variantes de importancia.
- 4.- Siempre las personas investigadas lo requerían para el mismo fin, o sea, la obtención de su certificado de salud para realizar un trabajo.

Aparentemente, la única explicación para causar el descenso en el número de portadores sanos dentro de este estudio, lo constituye el uso de un diagnóstico bacteriológico más depurado.

Luego de las anteriores consideraciones, toman mayor fuerza las conclusiones al respecto, de que por no tener una metodología racional de diagnóstico se consideraron como portadores sanos de *C. diphtheriae* a personas que realmente no lo eran.

En relación a esto deben tomarse en consideración los trastornos que representan para un individuo diagnosticado como portador sano de *C. diphtheriae* sin serlo realmente, los cuales incluyen problemas de tipo laboral, familiar y en lo personal el trauma psíquico que representa el sentirse como foco de infección para otras personas. Además el portador sano es sometido a una terapia innecesaria, la cual conlleva los riesgos inherentes a la terapia antimicrobiana especialmente en lo referente al uso de la Penicilina G (el más usado en estos casos) de presentar trastornos de hipersensibilidad, como por ejemplo los problemas de anafilaxia que pueden innecesariamente comprometer la vida a quien se le administre.

Resulta también de utilidad el establecer estas pautas de diagnóstico correcto, en lo referente a la fijación de normas preventivas, como la determinación de nuevos portadores en los contactos de los ya encontrados y también en los contactos de los casos denunciados que resulten realmente afectados por la enfermedad y en el establecimiento de campañas de vacunación como normas preventivas si las circunstancias así lo exigen.

El 100 % de las cepas pertenecen al tipo mitis, lo cual está acorde con los resultados obtenidos en estudios realizados anteriormente en la región y en el país (2, 30, 32).

Aunque algunos autores como Moore y Parsons (21), reportan falsos positivos y Porten falsos positivos y negativos, en lo referente al halo marrón intenso formado alrededor de las colonias de *C. diphtheriae* en el medio de Tinsdale Modificado; sin embargo se logra establecer importante diferencia entre la positividad de dicha característica en las cepas de *C. diphtheriae* y las de otros miembros de la familia *Corynebacterium* aislados, se cree por lo tanto que la utilización de dicho medio continúa siendo de ayuda diagnóstica (30).

La propiedad de reducir los nitratos a nitritos, la presentan todas las cepas aisladas, inclusive las no toxigénicas y se hace mención a esto de la no toxigenicidad, debido a que existen reportes de negatividad de dicha características en cepas no toxigénicas (4, 30, 33-36).

En los E.E.U.U. y Europa (16) las cepas de *C. diphtheriae* aisladas raramente utilizan la Sacarosa, se tienen reportes del Brasil (37) donde se considera esta característica como no infrecuente en cepas por ellos aisla-

das, sin embargo el 88.2% de las cepas de *C. diphtheriae* estudiadas presentan dicha propiedad y esa fue la experiencia en estudios anteriores en el Estado Zulia (30, 31).

De las 17 cepas aisladas, 15 (88,2%) demostraron su toxigenicidad tanto al emplear el método *in vitro* como *in vivo* y la correlación entre ambas pruebas fue del 100 % . En base a estos resultados y experiencias anteriores se recomienda por lo accesible y la utilidad del método *in vitro* que está al alcance de cualquier laboratorio de Microbiología, implantarlo como método para diagnosticar la toxigenicidad y dejar el recurso del método *in vivo* para aquellos casos en los cuales no se pueda demostrar toxigenicidad por el método *in vitro* (25, 38-40).

Fundamentalmente en esta discusión es obligante hacer algunos comentarios sobre el desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos y el uso indiscriminado de los mismos. Ello actualmente puede ser bien ilustrado por el estado actual de resistencia cromosómica y extracromosómica, o ambas, que ha alcanzado en la actualidad tal magnitud que constituye un problema en bacterias gramnegativas, especialmente en miembros de la familia Enterobacteriaceae y en grampositivos como el *St. aureus*. En este sentido es quizás más importante por su relación al estado de portador sano el desarrollo de resistencia cromosomal que ha adquirido el Meningococo a la Sulfonamida que ya alcanza cifras del 50%, dentro de esta entidad bacteriana y que inutiliza el uso de la sulfa para la erradicación del estado de portador sano, como lo había sido en las últimas tres décadas.

Afortunadamente en las cepas de *C. diphtheriae* aisladas de los portadores sanos estudiados, no se han operado ninguno de los mecanismos de resistencia bacteriana y continúan siendo completamente sensibles a los agentes antimicrobianos empleados en los esquemas del tratamiento. Los niveles de sensibilidad para cualquiera de ellos resultan fácilmente adquiribles a la dosis en que se les utiliza corrientemente, lográndose con facilidad la erradicación del estado de portador sano (41-43).

Aunque el número de portadores investigados y sometidos a los esquemas de tratamiento no es lo suficientemente alto para tener valor estadístico todos ellos son evaluados por su capacidad efectiva para erradicar el estado de portador, pues con la excepción de un caso tratado con Lincomicina en el cual se obtuvo negativización en los controles hasta el cuarto

día, con positividad al realizar nuevamente al segundo mes, todos los demás tratados con los otros tres esquemas fueron completamente negativos, aun en los controles realizados dos meses después del tratamiento.

RESUMEN

En el lapso de 9 meses se realizan 17.000 exudados nasofaríngeos a personas que solicitan el Certificado de Salud en la Unidad Sanitaria de Maracaibo, requerido por su actividad laboral; 17 de las personas investigadas resultan portadores sanos, lo cual representa el 0,1 % de la población estudiada.

Se establece la metodología del diagnóstico microbiológico del portador sano de *C. diphtheriae*, en base a la identificación bioquímica y toxigénica de las cepas aisladas. El 100% de ellas resultan ser del tipo Mitis. La mayoría pertenecen a la variedad que fermenta la Sacarosa (88,2%). Por los métodos in vivo e in vitro se demuestra la toxigenicidad en 15 de las 17 cepas aisladas, esto representa el 88,2%, existiendo una correlación del 100% entre ambos métodos.

En lo referente a la edad de los portadores sanos, esta oscila entre los 14 y 70 años.

En cuanto al sexo de los investigados que resultaron portadores sanos, el sexo femenino predomina con un porcentaje de 82,3 % sobre el sexo masculino que representa un 17,7% .

Los porcentajes más elevados en cuanto a la ocupación de los portadores sanos detectados, lo representan los manipuladores de alimentos con el 47 %, seguidos con un 35,2 % por personas dedicadas a oficios domésticos.

No se observa resistencia in vitro a los agentes antimicrobianos de las cepas *C. diphtheriae* aislados de los portadores. Los niveles de sensibilidad son altamente satisfactorios (0,09 μ gr/ml. para la Penicilina y 0,045 μ gr/ml. para Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina).

Se ensayan esquemas de tratamiento para: Penicilina G*, Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina, con el fin de evaluar su posible utilidad en la

* Penicilina G., 1653 U/mg. obtenido de Eli Lilly and Company.

erradicación del estado de portador sano. Aunque el número de portadores sanos tratados no es lo suficientemente elevado para crear bases estadísticas, se juzga que los antimicrobianos estudiados son de utilidad ya que logran erradicar el estado de portador sano en el 94 % de los casos cuando son utilizados con los esquemas terapéuticos señalados. Sólo un portador sano tratado con Lincomicina ameritó para lograr su erradicación un segundo curso terapéutico utilizándose exitosamente para ello el esquema con Penicilina G.

RESUMEN ANALITICO

CARDENAS CEDEÑO, Ricardo. "El estado de portador sano en Difteria. Estudio bacteriológico y de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos. Ensayo de esquemas terapéuticos". Maracaibo, Universidad del Zulia, Facultad de Medicina. 1974, p. 40, ilus.

En un lapso de 9 meses se realizan 17.000 exudados nasofaríngeos a personas que solicitan el Certificado de Salud en la Unidad Sanitaria de Maracaibo, requerido por su actividad laboral; 17 de las personas investigadas resultan portadores sanos, lo cual representa el 0,1% de la población estudiada.

Se establece la metodología del diagnóstico microbiológico del portador sano de *C. diphtheriae*, en base a la identificación bioquímica y toxigénica de las cepas aisladas. El 100% de ellas resultan ser del tipo Mitis. La mayoría pertenecen a la variedad que fermenta la Sacarosa (88,2%). Por los métodos in vivo e in vitro se demuestra la toxigenicidad en 15 de las 17 cepas aisladas, esto representa el 88,2%, existiendo una correlación del 100% entre ambos métodos.

En lo referente a la edad de los portadores sanos, esta oscila entre los 14 y 70 años.

En cuanto al sexo de los investigadores que resultaron portadores sanos, el sexo femenino predomina con un porcentaje de 82,3% sobre el sexo masculino que representa un 17,7%.

Los porcentajes más elevados en cuanto a la ocupación de los portadores sanos detectados, lo representan los manipuladores de alimentos con el 47 % , seguidos con un 35,2% por personas dedicadas a oficios domésticos.

No se observa resistencia in vitro a los agentes antimicrobianos de las cepas *C. diphtheriae* aisladas de los portadores. Los niveles de sensibilidad son altamente satisfactorios (0,09 μ gr/ml. para la Penicilina G y 0,045 μ gr/ml. para Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina).

Se ensayan esquemas de tratamientos para: Penicilina G*, Rifampicina, Lincomicina y Tetraciclina, con el fin de evaluar su posible utilidad en la erradicación del estado de portador sano. Aunque el número de portadores sanos tratados no es lo suficientemente elevado para crear bases estadísticas, se juzga que los antimicrobianos estudiados son de utilidad ya que logran erradicar el estado de portador sano en el 94% de los casos cuando son utilizados con los esquemas terapéuticos señalados. Solo un portador sano tratado con Lincomicina ameritó para lograr su erradicación un segundo curso terapéutico utilizandose éxitosamente para ello el esquema con Penicilina G.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 – BRACHO, D. **Epidemiología de la Difteria**. Publicación del Departamento de Medicina Preventiva y Social. Maracaibo, LUZ, Facultad de Medicina. (Trabajo de ascenso. Mimeo.).
- 2 – OSUNA, A., **Epidemiología de la Difteria**. s.p.i. 36 p. (Tema dictado al curso de Médicos Higienistas, 1949-1950. Escuela de Salud Pública. Caracas).
- 3 – FROBISHER, M., Familia Corinebacteriaceae. En su: **Microbiología Médica**. 3ra. ed. Barcelona, Salvat, 1964. p. 463-467.
- 4 – DAVIS, B. D., et al. Corinebacterias. En su: **Tratado de Microbiología**. Barcelona, Salvat, 1970. p. 686-698.
- 5 – PARAJE, R., et al. **Rev. Asoc. Bioquím. Argentina**. (143-144): 173-178, 1962. (Citado por De Nader, Ref. No. 40).
- 6 – TRANCHET M., Estudio de *C. diphtheriae* sobre niños portadores sanos. **Arch. Farm. Bioquím.** 2(1): 73-102, 1945.
- 7 – MANZULLO, A. y Hansen, Y. "Investigación de portadores de *C. diphtheriae* en algunas escuelas y comedores escolares de la Capital Federal". **Rev. Inst. Bacteriol. "Malbrán"**. 12:243, 1945-1948.
- 8 – MANZULLO, A., Epidemiología de la Difteria. **Rev. Inst. Bacteriol. "Malbrán"**. 15:73, 1950-1953.

*Penicilina G., 1.653 U/mg. obtenido de Eli Lilly and Company.

- 9 – BURROWS, W., *Corynebacterium*. En su: **Tratado de Microbiología**. 19 ed. México, Interamericana, 1969, p. 635-647.
- 10 – HALBROHR, J., Echezuria, E. y Pizzi, M., "La susceptibilidad a la Difteria de la población infantil de Maracaibo medida por la Reacción de Schick". **Salud Pública**. (23): 259-283, 1963.
- 11 – Venezuela. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. **Anuario de Epidemiología y Estadística Vital del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social**, 1964/1973.
- 12 – ANZOLA, E., Servicio de Epidemiología y Estadística Vital de la Unidad Sanitaria de Maracaibo (información personal).
- 13 – JAWETZ, E., et al. *Corynebacteria*. En su: **Manual de Microbiología Médica**. 5ta. ed. México, Manual Moderno 1973, p. 215-219.
- 14 – American Public Health Association. Difteria. En su: **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre**. 11 ed. Washington, Organización Panamericana de la Salud. 1970, p. 76-81 (OPS, Publicación Científica No. 252).
- 15 – CARDENAS, C., Prieto, G., y Vargas J., "Estudio de la susceptibilidad y resistencia de *Corynebacterium diphtheriae* a 8 agentes antimicrobianos". **Investigación Clínica**. (34): 44-45 Jun. 1970 (IV Jornadas Venezolanas de Microbiología Maracaibo, Junio 10-13, 1970).
- 16 – HARRIS, A., and Coleman, M., Diphtheria. En su: **Diagnostic Procedures and Reagents**. 4th ed. New York, American Public Health Association, 1963, p. 231-259.
- 17 – PRIETO, G., **Notas sobre identificación de *C. diphtheriae***. Maracaibo, LUZ. Facultad de Medicina, Cátedra de Microbiología (mimeo.).
- 18 – TINSDALE, G. F. W. New medium for isolation and identification of *C. diphtheriae* based on production of H_2S . *J. Path. Bact.* 59:461-466, 1947.
- 19 – CRUICKSHANK, R. *Corynebacterium*. En su: **Medical Microbiology**. 11ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1965, p. 178-191.
- 20 – BILLINGS, E., An investigation of Tinsdale tellurite medium: its usefulness and mechanism of halo formation. Detroit, University of Michigan (M.S. Thesis).
- 21 – MOORE, M. S. and PARSONS, E. I. A study of modified Tinsdale's medium for the primary isolation of *Corynebacterium diphtheriae*. **J. Infect. Dis.** 102:88-93, 1958.
- 22 – PORTEN, H. M., Evaluation of a medium for Primary Isolation of *Corynebacterium diphtheriae*. **Can. J. Med. Technol.** 161-167, 1968.
- 23 – HERMANN, G. J., Diphtheriae. En: **Diagnostic procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections**. American Public Health Association 5 th. ed. New York APHA, 1970, p. 86-105.
- 24 – HERMANN, G. J., Moore, M., and Parsons, E. I., A substitute for serum in the diphtheriae in vitro toxigenicity test. **Amer. J. Clin. Path.** 29:181, 1958.
- 25 – ELEK, S. D., "The recognition of toxigenic strains in vitro". **Brit. Med. J.** 1: 493, 1948.
- 26 – BAUER, A. W., "Current status of antibiotic susceptibility testing with single high potency disk. **Am. J. Med. Technol.** 32(2): 97-102, 1966.
- 27 – BAUER, A. W. et al., Antibiotic susceptibility testing by standardised single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45 (4): 493-496. 1966.
- 28 – ANDERSON, T. G., Testing of susceptibility to antimicrobial agents and assay of antimicrobial agents in body fluids". En: Blair, J. E. Lennette, B. H. and Truant, J. P. **Manual of Clinical Microbiology**. Bethesda, Md., American Society for Microbiology, 1970, p. 299-310.

- 29 – BAILEY, W. R. and Scott, E. G., "Determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents". En su: **Diagnostic Microbiology**. 3th ed. Saint Louis, C. V., Mosby, 1970, p. 289-304.
- 30 – CARDENAS, C. R., Prieto, G., Vargas, J. y Martínez, A., *Corynebacterium diphtheriae*. Características de cepas aisladas recientemente en Maracaibo-Venezuela. *Kasmera*. 4(2): 185-198, 1972.
- 31 – CARDENAS, C. R., Prieto, G. Estudio de las características bioquímicas y toxigénicas de 38 cepas de *Corynebacterium diphtheriae* aisladas en Maracaibo. En: **Memorias, I Jornadas Zulianas para el avance de la ciencia**. Mcbo. 1969, p. 56.
- 32 – BRICEÑO IRAGORRY, L., Receptividad de la difteria en Caracas según 4.010 reacciones de Schick. **Gaceta Med. Caracas**. 47:244, 1934.
- 33 – MICROBIAL DISEASES LABORATORY. **Notes on Laboratory Identification of C. diphtheriae**. Berkeley, Calif. Department of Public Health.
- 34 – BERJAK, V. Differentiation of *C. diphtheriae* of mitis type found in diphtheriae and ozaena. **Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbial. Serol.** 20: 269, 1954.
- 35 – PAPPENHEIMER, A. M., The diphtheria bacille and the diphtheroid. En: Dubos, R. J. and Hirsch, J. **Bacterial and mycotic infection of man**. 4ed. Philadelphia, J. B. Lippencoth, 1965, p. 468-489.
- 36 – HERMANN, G. J. and Weaver, R. E., *Corynebacterium*. En: Blair J. E. et al. **Manual of clinical microbiology**. Bethesda, Md. American Society for Microbiology. 1970, p. 88-94.
- 37 – CRISTOVAO, D., Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae* 1. Fermentacao da Sacarose por bacilos diftericos virulentis isolados em Sao Paulo. **Arg. Fac. Hig. Saude Publ.**
- 38 – KING, E. O., Frobisher, M., and Parsons, E. I., Further studies on the in vitro toxigenicity test. **Am. J. Public. Health**. 40:704, 1950.
- 39 – MANIAR, A. C., and Fox, J. G., Techniques of an In vitro Method for determining toxigenicity of *Corynebacterium diphtheriae* Strains. **Can. J. Public. Health**. 59 (8):297-301, 1968.
- 40 – DE NADER, O., Villalonga, J. F., Massi, A., Estudio de susceptibilidad a difteria y detección de portadores. **Rev. Lat. Amer. Microbiol.** 13:239-244, 1971.
- 41 – RAZZI, A., "Rifamycin S. V. in the treatment of diphtherial infection". **Minerva Pediát.** 15: p. 751-753, 1963.
- 42 – FRAGALE, A., et al., "Osservazioni sull'impiego della tetraciclina nei portatori e malati difterice". **Giorn. Mal. infez.** 2:103, 1956.
- 43 – RAZZI, A., "Contributo clinico sull'azione terapeutica e sulla tolleranza delle Rifamicine B e SV in campo pediátrico". **Giorn. Mal. Infez.** 14:423, 1962.