UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

"EL TEST DE LIMULUS EN LA DETECCION DE ENDOTOXINAS EN AGUAS POTABLES DE LOS PRINCIPALES DEPOSITOS Y ABASTECIMIENTOS DE LA CIUDAD CAPITAL."

(ANALISIS DEL AGUA DE LA RED DE DISTRIBUCION DE EMPAGUA)

GUILLERMO BATZIN PATAL

GUATEMALA, JULIO DE 1994

INTRODUCCION

Las bacterias son los microorganismos más numerosos de todas las especies vivientes, que frecuentemente se encuentran en el agua, tanto superficial, atmosférica, como subterránea.

En nuestro medio la contaminación de las aguas principalmente las de uso potable, tienen una importancia directa desde el punto de vista sanitario, puesto que pueden ser vehículos transmisores de agentes patógenos, encontrándose dentro de ellos principalmente los bacilos entéricos Gram-negativos, cuyas endotoxinas al ser liberadas de le membrana de la célula por lisis de la bacteria, pueden causar patología en el hombre.

El objetivo primordial de este estudio se basó fundamentalmente en la detección de endotoxinas de bacterias Gram-negativas mediante el uso del método de diagnóstico de lisado de los amebocitos del Limulo.

Este estudio se realizó durante los meses de Noviembre 83 a Marzo de 1984, se tomaron muestras de agua de la Empresa Municipal de Aguas de la Ciudad de Guatemala (EMPAGUA) en número de 50, que luego se procesaron en los laboratorios de la Dirección General de Servicios de Salud, efectuándose primeramente un análisis bacteriológico completo, posteriormente se aplicó el test de Limulus.

DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

Entre los elementos contaminantes del ambiente, que afectan sobre todo a las aguas superficiales, se encuentran las distintas especies de bacterias.

En la mayoría de los casos, la introducción de microorganismos patógenos en el agua, suele atribuirse a la contaminación por heces humanas y de animales. En los últimos años también se ha señalado a menudo la presencia de bacterias resistentes a los agentes químicos en la naturaleza; asi mismo, es relativamente común aislar bacterias portadoras de plásmidos de resistencia en el tracto digestivo, en heces humanas y del ganado.

Sobre la base de estos datos, el índice de contaminación en el agua de consumo de una población se convierte en un parámetro muy representativo para detectar el estado predominante de la distribución de los microorganismos con potencial patógeno para producir cambios en el organismo, manifestados sobre todo por procesos diarréicos.

El conocimiento de la magnitud de estos problemas podría utilizarse en proyectos tendientes a erradicar los cuadros gastroentéricos mediante un estudio programado.

La presente investigación pretende establecer la efectividad de otro método de diagnóstico cuya especificidad se limita a la detección de endotoxinas de bacterias Gram-negativas.

Es una prueba sencilla, específica, rápida y la más sensible que existe hasta ahora para la detección de endotoxinas, que puede ser manejada por personal de laboratorio que para ello no necesita mucha experiencia.

REVISION BIBLIOGRAFICA

El test de Limulus Amebocyte Lysate ha sido usado para detectar ciertas cantidades de entotoxinas que producen las bacterias Gram-negativas. Este test es el método más sensitivo, válido para detectar endotoxinas.

El procedimiento es simple, específico, rápido y barato, comparándolo con el test USP Rabbit para pirógenos y además es 10 veces más sensible que éste.

El método descrito en el boletín técnico de Difco Laboratories, es el basado en la fórmula clásica del gel en su punto de evaporación completa, sin embargo, existen otros procedimientos basados en la misma reacción (detectar endotoxinas) tales como el uso de radioisótopos, espectómetros o sustratos cromogénicos, pero ninguno específico como el test de Limulus. (5)

El test de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) consiste en adherir 0.1 ml del pyrotest a 0.1 ml de la solución que se va a estudiar, o también adherir 0.2 ml del pyrotest directamente dentro de la solución de estudio. Para esto se utilizan varios tubos de ensayo en los que se mezclan las soluciones, luego estos se incuban a 37° C por una hora en baño de María, al cabo del cuál son invertidos dichos tubos, uno a la vez. La presencia de endotoxina en la sustancia estudiada es detectada por la formación de un gel firme obscuro el cuál permanece intacto a pesar de que los tubos son invertidos a a 180 grados inclusibe. (5)

APLICACIONES REPORTADAS DEL TEST

Aunque el uso del test del LAL para detectar septicemia a Gram-negativos y artritis piógena es limitado debido a los factores inhibidores encontrados en la sangre y líquido sinovial, ha sido útil para detectar la presencia de bacteriuria o las endotoxinas en otros fluidos del cuerpo.

Los procedimientos para detectar meningitis, bacteriuria y uretritis a Gram-negativos han sido reportados.

Recientes adelantos en la tecnología LAL han indicado que su futuro valor clínico para detectar organismos Gram-negativos y las endotoxinas que ellos producen, solamente han principiado a ser realizados. (5)

HISTORIA ACERCA DEL TEST DE LIMULUS:

A pesar de que Loeb en 1902 realizó estudios acerca del test de Limulus en procesos inflamatorios y en las células linfáticas de la sangre, no fué sino hasta en 1964 cuando Levin y Bang demostraron que la sangre de este animal se ponía firme o dura en la presencia de endotoxinas producidas por bacterias Gram-negativas.

Ellos, más adelante reportaron que la fracción sensitiva de endotoxinas estaba dentro del Amebocito (especie de cangrejo) y no en la fracción líquida de la sangre.

Estos reportes, así como los de Rojas y cols, Levin y cols y Reinnold y Fine fueron los responsables para incrementar el interés en el uso del test. (5)

PRINCIPIOS BIOLOGICOS DEL TEST DE LIMULUS

Todavía no ha sido determinado el mecanismo exacto de la reacción LAL-endotoxina; aparentemente el lisado de gelación es una coagulación enzimática similar al sistema de coagulación sanguínea en los mamíferos.

La actividad de la coagulación enzimática es la de abrir una pequeña molécula de proteina soluble estrecha (coagulen) para formar un gel proteico insoluble (coagulin).

El test LAL ha sido demostrado previamente por Jorgensen y cols, de ser un implemento de diagnóstico útil para la detección de bacterias Gram-negativas clínicamente significantes. (5)

Su potencial utilidad como un procedimiento selectivo es evidente por las razones siguientes: 1- El análisis microbiológico para bacterias, constituye un trabajo pesado en los laboratorios. 2- En la mayoría de los casos las bacterias son de etiología Gram-negativa. 3- Las pruebas tienen un alto grado de especificidad y sensibilidad.

4- Los resultados pueden ser obtenidos rápidamente, lo que es un factor crítico para una efectiva elección del test, y 5- El test es fácilmente realizado por personal de laboratorio sin mayor experiencia y tiene una fácil lectura y punto de interpretación (gelación vrs. no gelación). (5)

No obstante, el carácter formativo del coágulo que es algo frágil en su naturaleza, requiere algún cuidado para no agitarlo y efectuar una disolución accidental cuando el tubo es invertido a 180 grados. (5)

La mayor deficiencia del test es su inhabilidad para - detectar bacterias Gram-positivas y fermento, que no presentan gelación con el lisado del cangrejo Limulus poliphemus, por lo que dicha observación confirma la especificidad del - test para endotoxinas bacterianas Gram-negativas. (5) (15)

Algunos compuestos con trombina, tromboplastina, ácido poliriboadenílico y ribonucleasa, presentaron reacción positiva al test de Limulus, mientras que cuando se adicionaron leucocitos humanos, pirógenos y dextran, las pruebas - reaccionaron negativamente, al efectuarse estos ensayos. todas las endotoxinas bacterianas estuvieron limitadas o desconocidas, aunque es esencial poner de manifiesto la no especificidad de la reacción cuando éstas acontecieron en una interpretación positiva al test en reacciones no conocidas. (6)

En otra investigación se reportó la comparación del lisado de Limulus con el test de conejo; falsos positivos y falsos negativos, aunque el test para pirógeno de conejos descrito por la famacopea europea, es diferente para la detección clínica de concentraciones importantes de pirógenos. - presentó algunas desventajas prácticas, por ejemplo: se interrumpe el uso antiguo de un conejo por tres semanas, que fué utilizado como test, una solución de contenidos pirógenos.

El LAL de endotoxinas bacterianas y polisacaridos fué explorado como una alternativa, como método para la detección de pirogenos, en infusión de fluidos y preparaciones medicinales. (11)

Falsos negativos con el LAL fueron obtenidos con algunas preparaciones corticosteroideas y en otras infusiones -

fluidas de donde algunos presentaron reacciones febriles en clínica. (12)

LAS ENDOTOXINAS

Las endotoxinas bacterianas, son complejos de polisacáridos, proteínas y lipidos, se encuentran en la pared celular y representan el antígeno 061.

En general no ha sido posible destoxicar la endotoxina sin destruir su antigenicidad. (3) (14)

Las endotoxinas se diferencian claramente de las exotoxinas ya que se encuentran intracelularmente en muchas bacterias Gram-negativas, especialmente en los bacilos entéricos, como complejos lípido-polisacádo-polipéptido. Son termostables a la ebullición en solución neutra, pero son destruídas por hidrólisis ácida débil, y no son digeridas por enzimas proteolíticas.

Una consecuencia curiosa de la inoculación parenteral de endotoxina es un aumento de resistencia del animal receptor a la infección por bacterias o virus.

El mecanismo de este fenómeno no es bien conocido pero. en el caso de ataque por virus puede guardar relación con la movilización del interferón endógeno.

Contrariamente a lo que suele creerse, las endotoxinas son excelentes antígenos y estimulan la formación de anticuerpos aglutinantes y precipitantes en titulos altos. El anticuerpo sin embargo, solo neutraliza la toxicidad en proporción menor. (3) (7)

La membrana exterior de la bacteria Gram-negativa - contiene lipopolisacáridos que le dan su característica, también sirve como una barrera, lo cual le confiere resistencia contra muchos antimetabolitos, químicos y detergentes.

La especificidad serológica reside primariamente en las diferentes porciones de polisacáridos, los cuales corresponden al antígeno somático "O" de los organismos Gram-negativos. (11)

El antígeno "O" es también un sitio específico que funciona como receptor de ciertos bacteriófagos.

Las propiedades endotóxicas termoestables de los lipopolisacáridos es dado por la porción lipolítica llamada "Lípido A".

Los síntomas observados en animales de laboratorio al inyectar éstas substancias incluyen: Fiebre, diarrea, parálisis de los miembros, trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono y degeneración de los vasos sanguíneos. - (11) (2)

Los animales criados sin la flora intestinal normal o corriente Gram-negativa no son susceptibles a la endotoxina, en tanto los que tienen flora típica si son susceptibles.

En la medida que aumenta la población, incluye gran cantidad de bacterias con endotoxinas, con lo que aparece - lentamente "anticuerpos naturales". (4)

La actividad tóxica de las endotoxinas se expresan en los siguientes efectos:

A. LETALIDAD: Se observa al ser administrada la substancia por via intravenosa, el animal muere por choque anafiláctico. (10) (14)

B. PIROGENICIDAD: Provoca la salida de una substancia intermedia o pirógena interna, ya sea de los granulocitos, de los mononucleares o de las células de Küpffer la que actuaría a nivel del hipotálamo. Esta substancia intermedia se ha encontrado en el exudado inflamatorio, en el plasma y linfa durante períodos febriles. (10) (14)

C. REACCION NECROTICA HEMORRAGICA: O fenómeno de Schwartzman, se produce al inocular la endotoxina por - vía intradérmica, se observa una lesión necrótica hemorrágica precedida por enrojecimiento y edema, el mecanismo no es claro, según algunos, hay liberación de enzimas proteolíticas en el sitio de inoculación. (10) (14)

D. EFECTO INFLAMATORIO: Efecto no claro.

E. LEUCOPENIA Y TROMBOCITOPENIA: Disminución del número normal de plaquetas y leucocitos, se debe a la depresión de la endotoxina a nivel de la médula ósea.

F. EFECTO SOBRE EL SISTEMA VASCULAR: Liberación de substancias que actúan sobre los centros reguladores de la tensión arterial, que provocan su caida, contribuyendo al choque. (10) (14)

G. EFECTO EPINEFRINA: Muy relacionado con lo anterior, ya que estos lipopolisacáridos, alteran la actividad de arteriolas y capilares, provocando hemorragias y necrosis, facilitando el estado de choque. (10) (14)

H. EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO. Se advierte primero un ligero aumento de la glucosa sanguínea después de su inoculación intravenosa y más tarde hipoglicemia que incluso puede conducir al choque. (10) (14)

I. INTERACCIONES CON EL COMPLEMENTO: Los lipopolisacáridos activan las fracciones C3, C5 y esta actividad favorece la fagocitosis y el fenómeno de Schwartzman, lo cual favorece a la vez el efecto citolítico y el aumento de la permeabilidad vascular. Este efecto se suprime al eliminar estas fracciones del complemento, lo cual comprueba la participación de estas substancias mediante su interacción como complemento.

El mecanismo exacto no se conoce, algunos autores sostienen que actuan mediante los anticuerpos o properdina o las fracciones C1, C2, C4. La actividad del complemento por las endotoxinas se ha estudiado también como mecanismo patogénico de otras enfermedades como la glomerulonefritis aguda. (10) (14)

J. OTRAS PROPIEDADES: Las endotoxinas poséen efecto necrótico-hemorrágico sobre los tumores malignos, propiedad que sin embargo no ha sido aprovechada en terapéutica. También se conoce un efecto abortivo de los lipopolisacáridos, lo cual tal vez explique éste fenómeno que se observa en seres humanos, en períodos de gestación, que adquieren una infección por bacilos Gram-negativos. (10) (14)

Es curioso que no todas las propiedades de las endotoxinas son perjudiciales, ya que se conocen efectos beneficiosos, como el estímulo a la resistencia inespecífica a bacterias, hongos, virus y protozoos, probablemente por un

estímulo de la síntesis de properdina.

También se describe un efecto transitorio de estímulo de la actividad de los macrófagos del reticulo endotelial y de los granulocitos, asi como la síntesis del interferón. (13, 14)

POTABILIZACION DEL AGUA DE LA CIUDAD DE GUATEMALA.

La empresa municipal de agua de la ciudad de Guatemala (EMPAGUA) aprovecha las aguas superficiales y subterráneas para abastecer el sector capitalino, sometiendo dichas aguas a diversos tratamientos, ya que en estudios realizados se han encontrado bacterias y otros microorganismos patógenos intestinales del hombre y los animales, que se consideran indicadores de contaminación, de los cuales se pueden enumerar los siguientes: Bacilos del género Clostridium, anaerobios, cocos del género Streptococcus, Gram-positivos, bacilos Gram-negativos no esporógenos de los géneros Escherichia, Enterobacter y Proteus, y los géneros Salmonella y Shigella que incluyen muchas especies patógenas. (1) (9) (8)

El tratamiento de las aguas comienza en las presas, aplicándose sulfato de cobre, químico que se encarga de eliminar las algas. Posteriormente el agua se transporta por tubería, túneles o canales, a las plantas donde pasa por vertederos, que sirven para medir el caudal de agua que entra, luego pasa a un canal que se denomina de mezcla y es donde se aplica sulfato de Aluminio, químico que actúa como floculante de la turbidez. Dependiendo de la acidez del agua se aplica cal hidratada.

En el mismo canal, posteriormente pasa a los tanques sedimentadores en donde se asientan los lodos y se clarifica el agua.

Dependiendo del grado de contaminación, se puede aplicar una pre-cloración con H.T.H (cloro en polvo), sigue su recorrido a los filtros en donde deja las últimas particulas y sale cristalina, es entonces donde se aplica la cloración. químico que se encarga de eliminar las bacterias. (1) (9)

En la presentación de resultados se mencionan a menudo las palabras Pozo y tanque, por lo que se considera necesario describirlas.

POZO: Hoyo o perforación que se hace en el terreno hasta encontrar vena de agua, la cual es sacada a la superficie mediante varios métodos.

TANQUE: Depósito en el cual se almacena el agua, después de recorrer tuberías y lugar donde se les aplica tratamiento.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES:

25 muestras de aguas tomadas de los pozos situados en las diferentes zonas de la ciudad capital. (EMPAGUA)

25 muestras de aguas tomadas de las diferentes plantas de procesamiento de aguas de la ciudad. (EMPAGUA)

Laboratorio bacteriológico de la Dirección General de Servicios de Salud.

INSTRUMENTAL UTILIZADO EN LABORATORIO:

Tubos de ensayo de 20 a 25 ml, con caldo lactosado - fuerte y débil.

Cajas de nutriente Agar (lactosa-gelosa) en el medio de Eosina.

Tubos de ensayo de 10 x 75 mm, con medios de: Kligler, LIA (lisina, hierro y agar), citrato, urea, malonato y MIO (movilidad-indol-ornitina).

Pyrotest (Lisado de los Amebocitos de Limulus) con: 1 vial Pyrotest, 50 viales.
5 viales pyrotrol positivo control 100 ng/ml.
5 viales pyrotrol positivo control.

Tubos de ensayo apirógenos de 20 a 25 ml. de volúmen para preparar las diluciones de endotoxina.

Agua apirógena para preparar las diluciones adicionales.

Tubos de ensayo apirógenos de 10 x 75 mm de volúmen para llevar a cabo la prueba.

Pipetas apirógenas de 1.0, 5.0 y 10 ml para efectuar la prueba reconstruyendo el pyrotest, el pyrotrol positivo control y las diluciones necesarias.

Horno de aire caliente con capacidad calorífica de 250 grados C. para apirogenar la cristalería.

Agitador tipo vortex.

Baño de María ajustable a 37 grados C.

METODOLOGIA:

Por la técnica de muestreo aleatorio, se tomaron muestras de aguas de 25 pozos y 25 tanques, situados en las diferentes zonas de la ciudad capital, todos pertenecientes a la Empresa Municipal de Aguas de la Ciudad de Guatemala (EMPAGUA)

Las muestras se procesaron en el laboratorio bacteriológico de la Dirección General de Servicios de Salud, donde se efectuó lo siguiente:

ANALISIS BACTERIOLOGICO:

Se empleó la técnica de tuvos múltiples de contenido de lactosado fuerte y débil que se incubaron a 37 grados C. durante 24 horas. Se empleo además cajas de nutriente Agar

(lactosa-gelosa) incubándose unas a 37 grados C. y otras a temperatura ambiente,, en las cuales se identificaron variedades de colonias, las que se sembraron nuevamente en medios de identificación bioquímica: Kligler, Lisina, Citrato, Urea, Malonato y MIO (movilidad-indol-ornitina).

TECNICA EMPLEADA PARA EL TEST DE LIMULUS:

Se estandarizó el pH de las muestras, se preparó el pyrotrol positivo control con 4 ml de agua apirógena, y el pyrotest LAL con 5.2 ml de pyrotrol negativo. En la tabla I se indica como se prepararon las diluciones del pyrotrol positivo control para estandarizar la sensibilidad del pyrotest y determinar la compatibilidad con los productos a probar.

TABLA I

Tubo	Al reconstruir un vial de pyrotrol positivo control con 4 ml de agua apirógena se obtiene:	Volumen ml de agua apirógena para añadir a la columna No.1	Concentración final de endotoxina	Endotoxina que se añade para la prueba del test.	Pyrotest que se debe añadir.	Resultado del gel con la endot. Difco. sen. 0.0625 ng/ml.
1	25 ng/ml.	-	25	0.1	0.1	+
2	1 ml, 25 ng/ml.	9 ml.	2.5	0.1	0.1	+
3	4 ml, 2,5 ng/ml.	6 ml.	1.0	0.1	0.1	+
4	5 ml, 1.0 ng/ml.	5 ml.	0.1	0.1	0.1	+
5	5 ml, 0.5 ng/ml.	5 ml.	0.25	0.1	0.1	+
6	5 ml, 0.25 ng/ml.	5 ml.	0.125	0.1	0.1	+
7	5 ml, 0.125 ng/ml.	5 ml.	0.0625	0.1	0.1	+
8	5 ml, 0.0625 ng/ml.	5 ml.	0.032	0.1	0.1	-
9	5 ml, 0.032 ng/ml.	5 ml.	0.016	0.1	0.1	-
10	5 ml, 0.016 ng/ml.	-	-	0.1	0.1	-

Referencia: Difco Laboratories. Lisado de los amebocitos de Limulus. Información técnica No. 761 (5)

Para determinar la compatibilidad del pyrotest, se repiten las mismas diluciones explicadas anteriormente, pero utilizando la muestra a estudiar, en lugar del pyrotrol positivo control. (5)

DESCRIPCION DE LA TABLA I

Para determinar la sensibilidad del pyrotest, se remueven los sellos de aluminio y los tapones de goma, utilizándose forceps estéril, previo a que los viales alcanzaron la temperatura ambiente.

Se añade asépticamente 5,2 ml de pyrotrol negativo control al pyrotest, 50 viales (LAL).

En tubos de 10 x 75 mm, se añade 0.1 ml de pyrotrol positivo control, comenzando con la concentración de 0.016 hasta 2.5 ng/ml.

Se añade a un tubo adicional, 0.1 ml de agua apirógena.

Finalmente se añade 0.1 ml de lisado reconstituido a todos los tubos.

Se agita suavemente cada uno de los tubos hasta obtener una mezcla homogénea.

Se cubren todos los tubos con parafilm, se colocan en la gradilla y en baño de María a 37°C.

Se dejan en baño de María por una hora, sin tocarlos;

pasada la hora, se invierte cada tubo a 180º y se observa - la presencia de un gel que permanezca intacto.

El punto final es la dilución más alta que permanezca - con un gel firme, la sensibilidad del pyrotest esta habitual- mente entre 0.032 y 0.25 nanogramos con la endotoxina E. coli del pyrotrol positivo control de Difco. (5)

TABLA II

PRUEBA DE LAS 50 MUESTRAS CON EL PYROTEST, 50 TEST VIALES

Mezcla de la prueba.	No. de viales 50 test.
Muestra	0.1 ml.
Pyrotest 50 viales	0.1 ml.

DESCRIPCION DE LA TABLA II.

Antes de proceder a realizar la prueba se dejó que to- das las muestras y el pyrotest alcanzarán la temperatura - ambiente.

En tubos de 10 x 75 se añadió 0.1 ml. de cada muestra hasta completar las 50.

Posteriormente se añadió 0.1 ml. de Pyrotest (LAL) ya reconstituído a las 50 muestras, mezclándose luego suave- mente y se cubrieron con parafilm, incubándose después en baño de María a 37 grados centígrados por una hora, sin to- carlos.

Pasada la hora, se invirtió cada tubo a 180 grados, - observándose la información de geles firmes. (5)

RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se encontró un alto indice de contaminación de las aguas, principalmente la que se distribuye teniendo como fuente los pozos, de donde a pesar del tratamiento a que son sometidos, se aislaron géneros entéricos tales como Esche- richia coli, Enterobacter, Citrobacter.

CUADRO No. 1

Estandarización de la sensibilidad y compatibilidad del pyrotest, al realizar la prueba con las muestras de agua.

Guatemala, Noviembre 83 a Marzo de 1984.

Tubo	Pyrotrol positivo control reconstituido con 4 ml de agua apirógena.	Volumen de agua apirógena para las diluciones de la columna 1	Concentración final de endotoxina ng/ml.	Vol. ml. endotoxina que se añadió para la prueba	Vo. ml. de pyrotest que se añadió	Resultado de la prueba del gel con endot. Difco sensibil. 0.0625 ng/ ml.	Result. de la prueba del gel con endotoxina sen. 0.032 ng/ml.
1	25 ng/ml.	—	25	0.1	0.1	+	+
2	1 ml. 25 ng/ml.	9 ml.	2.5	0.1	0.1	+	+
3	4 ml. 2.5 ng/ml.	6 ml.	1.0	0.1	0.1	+	+
4	5 ml. 1.0 ng/ml.	5 ml.	0.5	0.1	0.1	+	+
5	5 ml. 0.5 ng/ml.	5 ml.	0.25	0.1	0.1	+	+
6	5 ml. 0.25 ng/ml.	5 ml.	0.125	0.1	0.1	+	+
7	5 ml. 0.125 ng/ml.	5 ml.	00625	0.1	0.1	+	+
8	5 ml. 0.0625 ng/ml.	5 ml.	0.032	0.1	0.1	-	+
9	5 ml. 0.032 ng/ml.	5 ml.	0.016	0.1	0.1	-	-
10	agua apirógena	-	-	0.1	0.1	-	-

Fuente: Se obtuvieron las muestras de Agua, de pozos y - tanques situados en las diferentes zonas de la ciudad capital.

Para ambas pruebas se observó que la formación del gel para la endotoxina de E. coli, pyrotrol positivo control, estuvo presente entre las concentraciones de 0.0625 y 25ng/ ml, mientras que la prueba realizada con la endotoxina de - Escherichia coli, diagnosticada por cultivo de la muestra a probarse, estuvo entre 0.032 y 25 ng/ml.

De acuerdo a estos resultados, la prueba de Limulus - presentó funcionalidad y no hubo inhibición de la misma.

Se comprobó además su compatibilidad con la muestra seleccionada.

CUADRO No. 2

Cultivos de las 50 muestras de agua de pozos, tanques y su sensibilidad con el test de Limulus.

Guatemala, Noviembre 83 a Marzo 84.

PRUEBAS DX.	CULTIVOS				TEST LIMULUS			
	Pozos	%	Tanques	%	Pozos	%	Tanques	%
Positivos	25	100	5	20	23	92	17	68
Negativos	—	—	20	80	2	8	8	32
Totales	25	100	25	100	25	100	25	100

Fuente: Muestras de agua de la empresa EMPAGUA.

De acuerdo a los resultados de este cuadro, observamos que las muestras de agua obtenidas de los pozos, presentaron crecimiento bacteriano por cultivo en un 100%. En contraste, como las muestras obtenidas de los tanques, únicamente se encontró positividad por cultivo en 5 muestras (20%).

Así mismo, con respecto al test de Limulus, encontramos que de las 25 muestras de agua tomados de los pozos, 23 presentaron reacción positiva con un equivalente del 92%.

Las muestras tomadas de los tanques, presentaron positividad con el pyrotest LAL en 17 casos, 68%.

CUADRO No. 3

Relación del test de Limulus con el aislamiento bacteriano de muestras de agua tomados de los pozos, de la red de distribución de EMPAGUA.

Guatemala Noviembre 83 a Marzo de 1984.

Aislamiento	Frec	%	Test Limulus +		No. de Pozo
E. coli.	11	44%	+	11	13,14,15,16,17, 19,20,21,23,24, 25.
E. coli Enterobacter aggl.	4	16%	+	4	1,2,4,6.
E. coli Citrobacter freundi.	4	16%	+	4	8,10,11,12.
Citrobacter freundi	4	16%	+	3	9, 18, 22. posit. 3. negativo.
Enterobacter aggl.	2	8%	+	1	5. positivo. 7. negativo.
Total	25	100%		23	

Fuente: Libro de registro de datos.

En relación a los resultados obtenidos con el pyrotest y los bacilos aislados tenemos: Escherichia coli, se presentó en 11 muestras cultivadas (44%), así mismo, con positividad para el test de Limulus en todos los casos.

Escherichia coli más Enterobacter agglomerans, presentaron positividad en cultivos y el test de Limulus en un número de 4 casos, que equivale a un porcentaje del 16%.

Igualmente Escherichia coli mas Citrobacter freundi, dieron positividad para ambos métodos, en 4 casos con un porcentaje del 16%.

En cultivos donde únicamente se aisló Citrobacter freundi, 4 muestras (16%), 3 fueron positivos para el test de Limulus y uno negativo.

Enterobacter agglomerans, como único agente bacteriano aislado, ocurrió en 2 casos, una de las muestras dió positividad para el test de Limulus, y la otra negativa.

CUADRO No. 4

Correlación del test de Limulus con el aislamiento bacteriano de aguas tomados de los tanques de la red de distribución de EMPAGUA.

Guatemala, Noviembre 83 a Marzo de 1984.

Aislamiento	Frec	%	Test Limulus +		No. de Tanque
Enterobacter aggl.	5	20%	+	1	10 positivo: 1,5,6,8. negat.
Negativo	20	80%	+	16	3,4,7,9,11,12, 13,14,15,16,17, 16,19,21,22,23. positivos 2,20,24,25. negativos.
TOTAL	25	100%		17	

Fuente: Libro de registro de datos.

Según el cuadro anterior, se puede observar, que de las 25 muestras cultivadas, 5 presentaron positividad para crecimiento bacteriano, lo cual constituye un porcentaje del 20%.

Cultivos negativos se obtuvieron en 20 muestras con un porcentaje del 80%.

Con relación a los resultados obtenidos con el pyrotest LAL y los cultivos tenemos: Positivo para Enterobacter agglomerans y positivo para LAL una muestra. (4%)

Positivo para Enterobacter agglomerans y negativo para el pyrotest 4 muestras, (16%)

Negativo para cultivo y con positividad para el test de Limulus, 16 muestras (64%).

Aislamiento negativo por cultivo, con negatividad para el test de Limulus, 4 muestras (16%).

DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS

En las fuentes estudiadas, los resultados obtenidos en un período de 4 meses, indican que el agua de consumo presenta un alto grado de contaminación por endotoxinas.

En cuanto a los resultados obtenidos del estudio de las muestras de aguas tomados de los pozos, se encontró crecimiento bacteriano en el 100% de cultivos, en 11 se aisló Escherichia coli; todas estas muestras reaccionaron positivamente con el test de Limulus. En cuatro muestras se aislaron Escherichia coli mas Enterobacter agglomerans, todas las cuales también presentaron reacción positiva con el test de Limulus. E. coli mas Citrobacter freundi se asilaron en 4 casos, con reacción positiva para ambos métodos. Citrobacter freundi se aisló en 4 muestras, de los cuales 3 fueron positivos con el pyrotest. Enterobacter agglomerans, aislado en dos muestras, y solo hubo reacción positiva con el test de Limulus en un caso. Estos datos estan de acuerdo a los reportados por otros autores, referente a aguas sin tratamiento. (8)

De las muestras tomadas de los tanques, se encontró crecimiento bacteriano, únicamente en 5 casos (20%) aislándose Enterobacter agglomerans, de los cuales 4 reaccionaron negativamente con el test de Limulus, y un caso con reacción positiva. 20 de las muestras obtenidas de la misma fuente (80%) fueron negativos bacteriológicamente, así mismo 16 de estas muestras reaccionaron positivamente con el test de Limulus, 4 casos fueron negativos.

Analizando ambos cuadros, encontramos mayor contaminación bacteriológica en las muestras de aguas de los pozos (100%) mientras que en los cultivos de las muestras toma

das de los tanques, únicamente 5 casos presentaron crecimiento bacteriano (20%), esto se adecúa a lo reportado internacionalmente cuando se hace referencia a las aguas potables tratadas. (8)

Con respecto a los resultados obtenidos con el test de Limulus, se observó que de las 25 muestras de aguas de los pozos, 23 (92%) reaccionaron positivamente. Así mismo, de las muestras obtenidas de los tanques, 17 (68%) fueron positivos para el pyrotest.

La presencia de E. coli, en las muestras de aguas de los pozos, indica contaminación fecal, (8) pero ésta bacteria ya no se encontró en las aguas de consumo, los datos son importantes, para hacer resaltar que el tratamiento a que son sometidas las aguas (clorinación) es adecuada para reducir el índice de contaminación bacteriana, pero insuficiente para eliminar endotoxinas, que pueden ser causantes de trastornos gastrointestinales al ser consumidas por el humano. (10) (14)

CONCLUSIONES

1. El estudio bacteriológico demostró crecimiento bacteriano en 31 muestras (62%), de microorganismos Gram-negativos, mientras que la prueba del lisado de los Amebocitos del Limulo, reaccionó positivamente con 40 muestras (80%).

2. El índice de contaminación por endotoxinas de las aguas de las muestras estudiadas es elevada.

3. Las muestras de aguas tomadas de los pozos, presentaron crecimiento bacteriano por cultivo en 25 casos (100%), reacciones positivas con el test de Limulus sucedieron en 23 casos (92%).

4. Las muestras de aguas tomadas de los tanques, dió resultados positivos por cultivo en 5 casos (20%), mientras que 17 (68%), fueron positivos con la prueba del pyrotest.

5. La presencia de E.coli, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundi, en los cultivos efectuados, indica presencia de contaminación de orígen fecal, en los pozos.

6. Las aguas preparadas para consumo tienen bajos niveles de contaminación bacteriana y la misma es de poco riesgo para la población.

7. La prueba del test de Limulus, es otro medio de diagnóstico rápido, confiable, específico, que puede ser

realizado por personal de laboratorio con poca experiencia.

RECOMENDACIONES

1. Efectuar estudios bacteriológicos quincenalmente para mantener la calidad del agua que se distribuye a la comunidad.

2. Que las instituciones nacionales (ministerio de Salud Pública, municipalidades etc.) impulsen la adopción de sistemas de alcantarillado y promueven el uso de letrinas, para disminuir la contaminación fecal de las aguas.

3. En tanto se resuelve el problema de alta contaminación de las fuentes de agua y la presencia de endotoxinas en las mismas, distribuida a la población, es conveniente que ésta sea sometida a ebullición, para destruir estas endotoxinas.

4. Que las empresas encargadas de la distribución del agua en los distintos sectores, adopten como complemento de diagnóstico, el test de Limulus, ya que su especificidad, son la detección de endotoxinas de bacterias Gram-negativas, y con ello garantizar la potabilidad del agua.

5. Que el personal encargado de la vigilancia y mantenimiento de las instalaciones de los depósitos, observen las normas de higiene en forma estricta, ya que es otra de las formas de contaminación, mediante el manipuleo de herramientas y demás utencilios.

6. Promover medidas, para evitar la contaminación mediante el arrastre de deshechos humanos y de otros animales.

7. Mantener control estricto de las condiciones de distribución, almacenamiento y tratamiento de las aguas, para evitar contaminación en el trayecto.

RESUMEN

En el período de Noviembre de 1983 a Marzo de 1984, se estudió la presencia de endotoxinas de bacterias Gram-negativas en el agua que distribuye la Empresa Municipal de Aguas de la Ciudad Capital, (EMPAGUA). Utilizándose para ello el test de Limulus (LAL).

Se efectuó un estudio prospectivo, con un total de 50 muestras, 25 de los cuales, se tomaron de pozos, y 25 de tanques, situados en diferentes zonas de la ciudad capital.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio bacteriológico de la D.G.S.S.

Por estudio bacteriológico se observó una positividad en 31 muestras, que corresponden a un 62% de crecimiento.

Entre las bacterias aisladas se encontraron E. coli, Enterobacter agglomerans, Citrobacter freundi, con diferentes porcentajes, predominando E. coli, en tanto que en los tanques de tratamiento el grado de contaminación fué insignificante, y por Enterobacter agglomerans.

Con respecto a la sensibilidad del test de Limulus se obtuvieron un total de 40 muestras positivas, constituyendo un porcentaje del 80%, 57.5% corresponde a muestras obtenidas de los pozos y, 42.5% a muestras de tanques.

De acuerdo a los resultados obtenidos, ambas pruebas presentaron alto porcentaje de positividad, indicando en general un alto índice de contaminación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. American Water Works Association. Los organismos que se encuentran en el agua. En su: agua, su calidad y tratamiento. México, U.T.E.H.A., 1968. 564p. (pp.12-21)

2. Brock, T. Biology of microorganism. New Yersey, prentice Hall, 1970. 574p. (pp.422-23)

3. Burrows, W. Tratado de microbiología. 2a.ed. México, Interamericana, 1974. 575p. (pp.348-49)

4. Carpenter, P. Tratado de microbiología. 2a.ed. México, Interamericana, 1969. 432p. (pp.209-10)

5. Difco Laboratories. Limulus amebocyte lysate, LAL metodology. Detroit, 1982. 8p.

6. Elin, J. et al. Nonspecificity of the Limulus amebocyte lysate: Positive reactions whit polynucleotides and proteins. J Infect Dis 1973 Sep; 129(3):349-352

7. Frobisher, M. et al. Microbiología patológica. 5a. ed. México, Interamericana, 1965. 467p.. (pp. 186-87)

8. García, R. Estudio bacteriológico del agua en una comunidad mexicana. Bol f Sanit Panam 1982 Aug; 93(2):127-139

9. Guatemala, (Municipalidad) Empresa municipal de agua de la ciudad de Guatemala. Potabilización de aguas. 1982. 8p. (mimeografiado)

10. Joklik, W. et al. Microbiology. 17th.ed New York, - Appleton Century-Croft, 1976. 215p. (pp.95-106)

11. Jawetz, E. y J. Melnick. Manual de microbiología médica. 6a.ed. México, Manual Moderno, 1975. - 631p. (pp.236-51)

12. Noordwijk, V. et al. Comparison of the Limulus test for endotoxin whit the rabbit test for pirogens. J Biol Stand 1977 Oct:34(3):39-43(3):39-43

13. Peleczar, M. J., et al. Microbiología. 2a.ed. Madrid, Castilla, 1965. (pp.235-36)

14. Rodríguez, L. Mecanismo de patogenicidad de los microorganismos. Washington, OEA, 1976. 60p. - (pp.24-26)

15. Woldfeuer, A. et al. Investigations on the specificity of the limulus test of detections of endotoxins. - - Appl Environ Microbiol 1974 Nov:28(5):867-71

Vo Bo

Universidad de San Carlos de Guatemala
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
OPCA — UNIDAD DE DOCUMENTACION

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS

DE LA SALUD

(C I C S)

CONFORME:

Dr. César Leonel Gonzáles Canarro
ASESOR.

Dra. Elma Esperanza Villatoro López
ASESOR

Elma Villatoro López
MEDICO Y CIRUJANO
Colegiado 2572

SATISFECHO:

Dr. César Agreda Godinez
REVISOR.

Dr. César Agreda Godinez
MEDICO Y CIRUJANO
Colegiado No. 2706

APROBADO:

Lic. Francisco Mendizabal Prem.
DIRECTOR DEL CICS

IMPRIMASE:

Dr. Mario René Moreno Cámbara
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS.
U S A C .

Guatemala, 16 de Julio de 1984

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
U S A C
CICLO LECTIVO 1984
DECANO 82 - 84
Dr. Mario René Moreno Cámbara
GUATEMALA, C. A.

Los conceptos expresados en este trabajo son responsabilidad únicamente del Autor. (Reglamento de Tesis, Artículo 44).