

**“EL TEST DE LIMULUS COMO METODO DIAGNOSTICO
TEMPRANO EN PACIENTES EXPUESTOS
A GONORREA”**

**(Estudio prospectivo de 100 casos, realizado en el Departamento
de Venéreas de la Dirección General de Servicios de Salud,
en los meses de Octubre de 1983 a Enero de 1984)**

EDGAR ESTUARDO BERDUCIDO MORALES

INDICE

1. TITULO
2. INTRODUCCION
3. DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA
4. REVISION BIBLIOGRAFICA
5. MATERIALES Y METODOS
6. ANALISIS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS
7. CONCLUSIONES
8. RECOMENDACIONES
9. RESUMEN
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

INTRODUCCION

La Gonorrea es una enfermedad que permanece establecida endémica y epidémicamente en varias regiones del mundo, incluyendo a a nuestro medio, esto a pesar de los amplios y extensos esfuerzos de que se disponen (17).

La forma en que se diagnostica en nuestro medio es en base a Historia Clínica, por Frote de Gram. dejando en última instancia al cultivo de Thayer-Martin.

El objetivo principal de esta investigación fue el de ver la eficacia de una nueva prueba diagnóstica en nuestro medio, para detectar más rápida y eficazmente la Gonorrea. A esta prueba se le conoce como "Test del lisado de los amebocitos del *Limulus polyphemus*" o Test LAL 50, el cual se caracteriza por detectar endotoxinas en los microorganismos Gram Negativos exclusivamente.

En estudios realizados anteriormente se ha comprobado que es tan efectivo o más que el Frote de Gram en la detección temprana de Gonorrea, a pesar de no ser específico para la misma.(17).

En el presente estudio se tomaron un total de 100 casos, obtenidos en dos centros de control de venereas de la capital, tomándose pacientes de ambos sexos, entre los 15 y 35 años de edad, los cuales presentaron sintomatología o características de Gonorrea. Además de tomárseles la muestra para la prueba LAL, se les tomó también muestras para realizar Tinción de Gram y Cultivo de Thayer-Martin, para su comparación y confiabilidad, efectuando estos en el laboratorio de la Dirección General de Servicios de Salud.

DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

El presente estudio se realizó en los centros de - Salud No. 2 y Dispensario Municipal No. 3, en el horario que estas tienen para el control de venereas en la capital. Se tomaron un total de 100 casos, entre los meses de octubre de 1983 a enero de 1984. .

Se tomaron pacientes de ambos sexos, entre los 15 y 35 años de edad, los cuales presentaron sintomatología o características de gonorrea a la breve historia - clínica que se le efectuó, clasificados previamente por el personal médico de dichos centros, luego de este se les tomaron muestras para efectuar cultivo de Thayer - Martín, test LAL y frote de Gram, en su orden. Luego - de tomadas estas se llevaron al laboratorio de la -- D.G.S.S., para su estudio y procesamiento. En este estudio se seleccionaron a los pacientes que no habían recibido tratamiento a la consulta, y que no tuvieran más de 8 días de tener los síntomas.

Este trabajo evaluó la eficacia del test LAL, para diagnósticar más rápida y eficazmente la gonorrea, comparándolo con el frote de Gram y el cultivo de Thayer-
Martín, pruebas tradicionales para la misma.

El uso del test LAL ha venido en aumento desde -- 1964, en que se demostró que la sangre del Cangrejo - *Limulus polyphemus* se ponía firme, en la presencia de - endotoxinas producidas por los microorganismos Gram negativos exclusivamente. (3)

Es por ello el interés que representó ver en nuestro medio por primera vez como actuaba esta nueva prueba y su utilización para detectar tempranamente la -- gonorrea, exponiéndose los resultados más adelante.

REVISION BIBLIOGRAFICA

GONORREA (BLENORRAFIA, PURGACION)

Es una inflamación de la mucosa de la uretra anterior o posterior y vías genitales. (7,11)

Es la enfermedad venérea más frecuente y una de las más frecuentes de todas las enfermedades. Esta es producida por la *Neisseria gonorrhoeae* (Neisser 1879) difundida por todo el mundo. El reservorio de gérmenes es el hombre enfermo. La transmisión tiene lugar en adultos mediante las relaciones sexuales, la puerta de entrada son las mucosas urogenitales, pero también se pueden afectar a los órganos internos, así en la afección blenorragica crónica pueden producirse metastásis a distancia por siembra hematógena. (12)

La gonorrea es una enfermedad de transmisión sexual, como índice ha aumentado a nivel mundial a proporciones alarmantes. Se encuentra en individuos con vida sexual activa siendo su mayor frecuencia en personas de ambos sexos entre los 15 y 24 años. (15)

La mujer con gonorrea tiene 2 desventajas las cuales prolongan el intervalo entre la adquisición de la infección y el diagnóstico, lo cual retarda el tratamiento e incrementa la probabilidad de las complicaciones. En primer lugar, lo inespecífico de los síntomas y en segundo lugar el examen microscópico del material de secreción que en las mujeres únicamente detecta el 60% de la gonorrea en comparación con los hombres que es del 95%. (2)

La *Neisseria gonorrhoeae* es un diplococo gram negativo que mide de 0.8 a 1 micra de diámetro. Los diplococos son aeróbios inmóviles, no esporulados y no encapsulados.

Los cocos en forma individual tienen forma de riñón - con los lados adyacentes planos o cóncavos, aunque en - cultivos viejos o en gonococos expuestos a antibióti--cos pueden encontrarse hinchados o distorsionados. Ge--neralmente se encuentran agrupados en pares y su locali--zación característica es intracelular. (7,14)

La *Neisseria* ha sido dividida en 2 grandes gru--pos:

Grupo No. 1: Consiste en los patógenos *N. gono--rrhoeae* y *N. meningitidis*.

Grupo No. 2: Este grupo abarca los que no están - catalogados como patógenos *N. catarrhalis* y *N. sicca*.

La *Neisseria gonorrhoeae* es el causante de uretri--tis, cervicitis y salpingitis en adultos (Gonorrea), - vulvovaginitis en niñas y conjuntivitis en recién naci--dos. (1).

Diversos factores han sido reconocidos como respon--sables de que la enfermedad prevalezca. A pesar de que el germen causante *N gonorrhoeae* no muestra una resis--tencia completa a la penicilina, tal como la demostra--da por el *Estafilococo aureus*, productor de la penicili--nasa en la última década se ha observado una resistencia aumentada a este antibiótico, la dosis masiva de penici--lina es exigitiva para obtener un mayor índice razona--ble de curación. Los factores de resistencia del hués--ped y la respuesta inmunológica a la infección gonocóc--tica en forma repetida porque aún no se ha descubierto una inmunidad protectora. Contrariamente a lo que ocu--rrer en la sífilis, no se dispone de un test serológico útil y el único modo de diagnosticar la enfermedad es mediante cultivo. (6)

La *Neisseria gonorrhoeae* no puede atravesar el epi--telio plano estratificado de los genitales externos y la vagina, pero atraviesa e infecta fácilmente el epi--telio cilíndrico y de transición.

En los varones ataca primero la uretra, originando uretritis purulenta, posteriormente próstata, epidídimo y vesículas seminales.

En las mujeres la uretritis es leve y pasajera, - luego infecta las glándulas de Bartholin y Skene y las del cuello, con participación de la uretra o sin ella. La difusión del proceso infeccioso puede alcanzar las - trompas de falopio y próstata y producir salpingitis o proctitis.

La fibrosis que provoca en las trompas puede provo--car obstrucción y esterilidad. (5,7,11)

Recientemente ha sido descubierto en el hombre la Gonorrea uretral asintomática lo que puede representar un factor adicional en las epidemias de la actualidad. En el hombre homosexual puede encontrarse un receptácu--lo adicional de gérmenes, constituyéndose en un porta--dos anal. (6)

SINTOMAS CLINICOS

Este varía según el sexo.

EN LA MUJER: En la mujer la enfermedad puede empe--zar con disuria, urgencia y frecuencia de micciones, - después de un período de dos a ocho días, pero en la ma--yoría de los casos es asintomática. Puede existir au--mento del flujo vaginal, al ginecológico se observa en docervicitis, con mucosa congestiva, tumefacta que san--gra con facilidad, y cubierta de abundante exudado puru--lento. La participación de los conductos de las glándu--

las de Skene y Bartholin es frecuente y pueden formarse absesos. Pueden aislarse gonococos del recto en el 20 a 50 por 100 de las mujeres con gonorrea.

La salpingítis se manifiesta por comienzo agudo de fiebre y dolor abdominal bajo, a la palpación hay dolor abdominal bajo, hipersensibilidad en los anexos. -- (7, 11, 13, 14, 15)

EN EL HOMBRE: El período de incubación de la uretritis gonocócica en el varón suele ser de dos a ocho días o más, en personas con infecciones previas y tan corto como en horas en personas que no han sido infectadas jamás.

Hay comienzo brusco con disuria, urgencia y frecuencia de orinar prurito ligero a nivel de la fosa no vicular, seguidamente se presenta un exudado uretral mucoso que rápidamente se vuelve purulento y profuso, fílate, de aspecto turbio y de color amarillento verdoso que puede estar mezclado con sangre por lesión provocada en la uretra.

Puede existir además: dolor durante la micción, polaquiuria marcada y dolor postmiccional, erecciones dolorosas prolongadas que se explican por la irritación de la zona del verumontanum. (5, 7, 11, 14, 15)

La enfermedad sin tratamiento desaparece espontáneamente en un período de 5 a 6 semanas. (2, 15)

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

La muestra o espécimen para el diagnóstico de la gonorrea usualmente se obtiene tomándola de uretra, cervix, recto, vagina y glándula de Skene y Bartholín y Orofaringe actualmente. (8)

TOMA DE LA MUESTRA: En la Mujer: para tomar la muestra se usa asepsia, en primer lugar se introduce un espéculo estéril sin lubricante, luego se limpia el moco del cuello del útero y luego introduciendo bajo visión directa un hisopo y dejarlo unos segundos para que absorba los microorganismos. En el Hombre: De preferencia en la mañana antes de orinar se exprime la uretra y se toma la secreción con un palillo de dientes para frotar. Con un hisopo se toma el material para cultivos, si el frote de gram inicial no es satisfactorio, se repiten nuevamente para descartar con certeza si no es una uretritis gonocócica. (8)

MORFOLOGIA DEL FROTE DE GRAM: Se observan diplococos gram negativos los cuales pueden aparecer simples o en grupos dentro del citoplasma de las células de pus (Polimorfonucleares) también en algunas ocasiones se encuentran presentes extracelularmente. Los lados adyacentes son planos o ligeramente cóncavos, su contorno lateral es convexo, en su forma en si, se parece a un frijol y sus dimensiones oscilan entre 0.6 y 1 micra de diámetro. (1)

El encontrar esto, no representa hacer un diagnóstico correcto de gonorrea, ya que algunos organismos gram negativos simulan *N gonorrhoeae* tales como los *Cocobacilos*, *Acinobacter polymorpha* y la *N. catarrhalis*, y los *Difteroides*, además los *Estreptococos* y *Estafilococos* decolorados simulan *Neisseria*. Los reportes de los frotis podrían leerse diplococos gram negativos intracelulares, los cuales podrían ser o no *N. gonorrhoeae*, si solo se encuentran extracelularmente podría volverse a ver o repetir la muestra y cultivarlo. Además en el reporte del frote deberían de describirse el número de células de pus, por ejemplo: Pocas, muchas etc. El diagnóstico de Gonorrea en hombres está hecho más que todo en base a los frotis, en cambio en la mujer con infección crónica, el frote es usualmente negativo y con los cultivos podrían ser estos obtenidos. (1)

CULTIVO DE THAYER-MARTIN

El medio de Thayer-Martin, el cual está compuesto de Vancomicina Colistimitato sódico y Nistatina, permite el crecimiento de *N meningitidis* y *N. gonorrhoeae*, pero inhibe el crecimiento de otras muchas bacterias que se encuentran corrientemente en muestras de uretra, cuello, vagina, recto y faringe. El crecimiento de otras Neisserias queda también inhibidos. El medio de Thayer-Martin puede ser modificado (Thayer-Martin sin Hemoglobina). (7, 14)

TEST OXIDASA:

La Neisseria produce una enzima oxidada que en la presencia de aire actúa sobre algunas aminos aromáticas que producen compuestos colorados, el test no es diagnóstico para *N. gonorrhoeae* como otros. Otras especies de *Neisseria*, algunos fermentos y *Pseudomonas* son también oxidasa positivos, pero estos organismos son eliminados por los medios de Transgrow y Thayer-Martin, los cuales son cultivablemente diferenciales para *Neisseria*. La diplococcia gram negativa crece en medios de Transgrow y Thayer-Martin, cuando son oxidasa positivos, permiten un diagnóstico presuntivo de Gonorrea. El diagnóstico debería ser confirmado por la fermentación de azúcares o por un test FA. (1)

El test oxidasa puede ser usado para detectar colonias de *Neisseria* en cultivos mixtos o para confirmar su presencia en cultivos puros.

PROCEDIMIENTO:

Pequeñas cantidades (0.5 ml.) de una solución acuosa al 1% de Dimetil-pFenilenodiamina, son guardados y congelados en una congeladora. Después de deshielada, la solución es roceada en la colonia o en un medio sólido,

o una gota es adherida a un papel filtro y la colonia estudiada es esparcida sobre el papel impregnado, en una reacción positiva, las colonias llegan a ser rosadas, después rojas y finalmente moradas-negras. Sobre un agar sólido las colonias permanecen viables a través del estadio rosado, en la cual ellas pueden ser sub-cultivadas, pero morirían por el reactivo en un largo contacto. El reactivo no hace interferencia con el frote de gram ni con la técnica de FA. (1)

IDENTIFICACION DEFINITIVA:

La identificación definitiva se basa en la típica fermentación de azúcar o sobre la coloración positiva del FA.

El procedimiento FA puede ser realizado como un test inmediatamente, o como un test dilatado en un cultivo de 18 hrs. que es oxidasa positivo en medios de TG. o TM. El método dilatado es el que se describirá a continuación, ya que el método inmediato no es recomendado por su carencia de especificidad. (1)

PROCEDIMIENTO:

Se prepara un ligero frotis en una laminilla, teniendo un pequeño círculo de 6mm de diámetro grabado, toque con una aguja a la colonia sospechosa (pero antes de esto, ponga agua destilada en el círculo) y en ésta, emulsione el material, luego esparza ésta tan ligeramente como le sea posible sobre el círculo grabado y el área del rededor. Seque el frote al aire. NOTA: Los frotis pueden ser preparados de una colonia y coloreada con etiqueta fluorescente conjugándola arriba de 15 minutos después de que la colonia ha sido tratada con oxidasa reactiva.

TECNICA DE COLORACION DEL TEST FA: Sêquese completamente y suavemente inmovilice el frotis. Cúbrase una gasa completamente de 3mm de un firme conjugado GC y póngala sobre el especimen dentro del círculo de 6mm e incúbelo a temperatura de cuarto durante 5 minutos.. (Evitar el secado completo). (1)

Suavemente enjuague el frotis en agua destilada, - seque con aire o papel absorbente limpio y póngale un cubre-objetos, poniendo para ello antes una sol. de 9 partes de glicerina y una parte de bicarbonato pulido, con PH de 9, luego examine el frote con un microscopio de inmersión fluorescente, el gonococo aparecerá como un diplococo amarillo verdoso. (1)

Con este método, use un frotis uretral positivo o un frote preparado de una conocida fresca aislada de gonococcia como un frote de control positivo. Use un frote de una suspensión atenuada de *Enterobacter choca* como control específico.

FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS (OXIDACION)

Una identificación presumtiva de un cultivo como *N. gonorrhoeae* puede ser confirmado por una fermentación de carbohidratos. *N. gonorrhoeae* fermenta solamente la glucosa produciendo ácido y no gas. Un medio semisólido tal como cistina tripticasa (agar) contienen fenol rojo, como un indicador de producción de ácido es usado como medio base. Un porcentaje de soluciones de glucosa, maltosa y sacarosa son adheridos a este. (1)

CUADRO DE FERMENTACION DE AZUCARES Y REACCION OXIDATIVA SEGUN TIPO DE NEISSERIA FERMENTACION DE AZUCARES

ESPECIES	GLUCOSA	MALTOSA	SACAROSA	REACCION OXIDATIVA
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	+
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	+
<i>N. catarrhalis</i>	-	-	-	+
<i>N. sicca</i>	+	+	+	+

Con el afán de tener una más uniforme inoculación en todos los tubos de carbohidratos, se prepara una alta suspensión de organismos provenientes de un plato de Thayer Martin en 0.5 tripticasa esteril o agua destilada estéril. Con un lazo bacteriológico, transfiera este lleno de la suspensión alta de microorganismos a la superficie y área justo abajo de la misma de el medio de carbohidratos, o usando una pipeta capilar estéril. -- Adhiere 2-3 gotas de la suspensión a la superficie del medio, luego se le pone la capa y se cierra, incubándola a 35-36°C., no se adhiere tensión de CO₂. (1)

Examine los tubos a las 24, 48 y 72 horas, para ver el crecimiento y producción de ácido (cambios de rojo a amarillo = Positivo, si permanece rojo = Negativo). Prepare un frote de gram del crecimiento que se obtuvo de los tubos de la reacción ácida y examínelos para ver la pureza del cultivo. (1)

DIAGNOSTICOS SEROLOGICOS DE LA GONORREA:

Dos métodos son valorables para demostrar anticuerpos a *N. gonorrhoeae* en el suero de los pacientes: 1. Técnica indirecta FA y 2. Una aglutinación de Látex de Slide Test, que es comercialmente valorable.

Los anticuerpos antigonocócicos reaccionan con -
partículas de látex con una tensión de *N. gonorrhoeae* (1).

TEST DE LIMULUS

Limulus polyphemus (Cangrejo Cacerola): Una de las 5 especies de la familia de los *Xiphosura polyphemus*, - cangrejos fociles que se encuentran en las riveras o - costas de Yucatán y sur de los Estados Unidos, tienen el cefalotorax en forma de herradura, y miden hasta 600 mm. (9)

Amebocitos: Corpusculus sanguineos o células amiboides libres que se encuentran en el mesenquima o mesoglea, la cual está formada por una matriz gelatinosa. Estos se encuentran presentes en esta variedad de cangrejos. (9).

Test de Limulus: El test del lisado de los amebocitos del *Limulus polyphemus*, ha sido usado para detectar ciertas cantidades de endotoxinas que producen las bacterias Gram-Negativas. Este test es el más sensitivo - método válido para detectar endotoxinas producidas por estas bacterias, el procedimiento es simple, específico, rápido y barato comparándolo con el test USP rabbit para pirógeno y además es 10 veces más sensible que éste.

El método descrito por los Laboratorios Difco, es el basado en el clásico método del gel en su punto de dilución final, sin embargo, existen otros procedimientos basados para la misma reacción (detectar endotoxinas) tales como el uso de radioisótopos, espectrometros o sustratos cromogénicos, además varios micrométodos - conservando la reacción de lisado han sido usados. (13)

PROCEDIMIENTO

Resumiendo a grandes rasgos el test del lisado de los amebocitos de *Limulus* (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 (test de *Limulus*) directamente dentro de la solución de estudio, para esto se utilizan varios tubos de ensayo en los que se mezclan las soluciones, luego éstos se incuban a 37°C por una hora en baño de maría, al cabo de la cual son invertidos dichos tubos uno a la vez, la presencia de endotoxina en la sustancia estudiada es detectada por la formación de gel firme oscuro el cual permanece intacto a pesar de que los tubos son invertidos a 180° inclusive. (3)

APLICACIONES REPORTADAS DEL TEST DE LIMULUS

Aunque el uso del test del LAL para detectar septicemia a Gram negativos y artritis pirógena a Gram negativos es limitado debido a los factores inhibidores en contrados en la sangre y líquido sinovial, ha sido útil para detectar la presencia de Bacteriuria Gram negativa o las endotoxinas que ellos producen en otros fluidos del cuerpo. Los procedimientos para detectar la meningitis Gram negativos, Bacteriuria Gram negativa y Uretritis Gonococcica han sido reportados. (3)

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. La FDA -- aclara que a partir del 1o. de junio de 1982 la sensibilidad de las preparaciones LAL deben ser leídas o designadas como endotoxinas en unidades (EU/ml) en lugar del clásico Nanograma mililitro (Ng/ml). (3)

En una evaluación del test de *Limulus* lisado de -

amebocitos como método para detectar endotoxinas gonocócicas en exudados cervicales diluidos en 1:800, resultó positivo en 17 de 18 pacientes (94%) con cultivo probado de cervicitis gonococcica y negativo en 22 de 22 pacientes (100%) con cultivos negativos. In vitro comparando la sensibilidad del test de *Limulus* para detectar *N. gonorrhoeae* y otros organismos Gram negativos, se demostró que el test de LAL es más eficaz en detectar esta que otras bacterias Gram negativas comunmente encontradas en el aparato urogenital. De este modo el estudio preliminar implica o enfoca de otra manera la salud de la mujer evidenciando la correlación del test LAL con otros métodos bacteriológicos para diagnosticar cervicitis gonococcica y puede auxiliar en detectar esta, en conclusión el test LAL se hace de manera rápida y los resultados pueden valorarse una hora después de la evaluación inicial de la paciente.(17)

El test de *Limulus* ha sido usado para detectar endotoxinas en sangre, LCR., orina y exudados de Uretra. La sensibilidad del test de *Limulus* para detectar las endotoxinas de la *Neisseria gonorrhoeae* es eficaz ya que la endotoxina constituye una porción de la pared de ésta, en consecuencia este test ha sido propuesto como un test sensitivo para una temprana detección de gonorrea.(17)

En resumen en estudios preliminares, en mujeres con gonorrea indican que el test de *Limulus*, puede ser usado directamente en los casos clínicos, de tal manera, es altamente seguro para la detección de *Neisseria gonorrhoeae*.

Con este test como ayuda a otros procedimientos de diagnóstico puede ser posible dar un tratamiento específico en la visita inicial de la paciente antes de obtener los resultados de los cultivos disponibles para detectar *Neisseria gonorrhoeae*.

Tres preparaciones LAL obtenidas de 3 diferentes

distribuidores fueron comparativamente evaluadas por sensibilidad a endotoxemia natural contenido en exudados urétricos de 28 hombres con uretritis gonococcica y 16 hombres con uretritis no gonococcica. Una preparación LAL fue extraída sin solventes orgánicos durante su manufactura, mientras que las otras 2 fueron extraídas con cloroformo. Las tres preparaciones LAL tuvieron sensibilidades equivalentes (0.06 ng/ml) para establecer una referencia standard de endotoxina (EC-2) pero significantes diferencias en sensibilidad fueron encontradas dentro de las diferentes preparaciones LAL cuantprobadas con especímenes clínicos.

La dilución de muestras uretrales para máxima sensibilidad y especificidad oscilaron de 1:400 a 1:1,600 dependiendo de la preparación LAL. (12)

Los métodos de diagnóstico usados fueron los de rutina. Antes de obtener una muestra uretral para cultivo de gonorrea y frote de Gram se aspiró una pequeña cantidad de muestra urétrica con una jeringa tuberculina estéril, lo aspirado osciló entre 0.025 a 0.05 ml. y se extrajo del meato uretral y sin aguja y se transfirió a un tubo de ensayo sin plástico, conteniendo un mg. de agua estéril. Las muestras fueron ajustadas a una dilución de 1:50 con agua y refrigerada a 20°C antes de haber sido probados para el ensayo LAL. (12)

Resultados positivos LAL fueron obtenidos en un 100% (16/61) de pacientes con uretritis gonococcica a una dilución de 1:50 a 1:6,400 de muestras uretrales. Fueron positivos también un número de pacientes con uretritis no gonococcica pero a diluciones más bajas (1:50 a 1:800) sin embargo, a una dilución de 1:1600 todos menos dos pacientes con uretritis no gonococcica fueron negativos para actividad endotoxica. El único paciente con LAL positivo a una dilución de 1:51,000 fue uno que estableció contacto sexual con una mujer que tuvo cultivo positivo por *N. gonorrhoeae* y puede por lo

tanto representar un fracaso en el cultivo. Las sensibilidades y especificidades fueron 95% (58/61) y 98% (54/55) para frotos Gram y de 100% (61/61) y 53/55) para la prueba LAL para casos de Uretritis Gonocócica y no gonocócica respectivamente. (12)

"Otros resultados obtenidos en una evaluación inicial para 116 hombres con uretritis exudativa confirmaron los primeros descubrimientos resultando que la preparación LAL tiene un alto grado de sensibilidad mayor que 99% y especificidad mayor que 96%. La habilidad para predecir los resultados de los cultivos fue de aproximadamente 98% a pesar de que este test no es específico para gonorrea. La endotoxina asociada con *N. gonorrhoeae* ha demostrado reaccionar contra el test de Limulus tan bajo como 0.07 ng de la membrana exterior intacta por ml." (12)

Así es que la prueba del test de Limulus es muy sensitiva a endotoxinas producidas por las bacterias Gram negativas y más sensitiva aún a las endotoxinas que provienen de las descargas uretrales de hombres con uretritis en gonorrea. (12)

En otra investigación el test LAL fue evaluado para la detección rápida de bacteria Gram negativa en una población de pacientes adultos. El tiempo de gelación de la preparación standard LAL fue usado como una medida significativa (10.5 bacteria por cada ml) de bacteria Gram negativa, y los resultados de 190 ensayos LAL fueron comparados con cultivos de orina cuantitativos 33 de las 36 muestras urinales conteniendo bacteria Gram negativa 10.5 por ml. fueron detectados por el ensayo LAL. Los 3 falsos negativos LAL fueron el resultado de los niveles de orina Ph inferiores al Ph mínimo para la gelación LAL. Neutralizando estos resultados de orina resultaron resultados positivos y en el 100% en correlación con cultivos. Todos los 36 resultados fueron LAL positivos dentro de los 15 minutos y la mayo

ría en el 86.1% son positivos 10 minutos después de la incubación a 37°C. El resultado de este estudio ha mostrado que el test LAL puede ser usado como un rápido, simple y confiable procedimiento para detectar clínicamente el significado de la bacteria Gram negativa. (10)

El lisado del test LAL ha sido usado para indicar la presencia de endotoxina con una variedad de muestras. El test ha sido usado con buen éxito en orina y en líquido cerebro espinal; sin embargo, la muestra de suero o plasma ha sido complicado por la presencia de proteínas inhibidoras, así como por posibilidad de que algunas sustancias en plasma puedan imitar endotoxina en el test LAL. (4)

En otro estudio, el test de Limulus fue usado para evaluar a 115 mujeres, las cuales fueron nombradas como contactos sexuales de hombres con cultivos positivos para gonorres. Estas pacientes fueron tratadas antes de la confirmación por el laboratorio como recomienda el Centro de Control de Venéreas por la falta de un rápido y confiable test y las serias consecuencias de la infección no detectada a tiempo. Para el test LAL las muestras cervicales fueron colectadas con tiras de algodón despirogenadas y estas fueron puestas en 10 ml. de diluyente de la prueba para endotoxinas. El negativo valor predictor de la prueba LAL a esta dilución fue 100% la incubación fue transportada afuera a 37° por 30 minutos; resultados positivos o negativos fueron indicados por gelación o falta de gelación respectivamente. La sensibilidad del lisado fue de 0.3 ng/ml, con una endotoxina standard de *E. coli*. Simples cultivos endocervicales y las pruebas de LAL fueron ambas positivas en 71 pacientes, y el frote de Gram fue sólo en 36 (50.7%) en estos casos. Para los 44 casos negativos probados con cultivos. El test de LAL fue negativo en 21 (47%). (13)

De este modo el test LAL es hábil para selectivamente excluir la mitad de los cultivos negativos para -

gonorrea y podría tener estos pacientes una inadecuada terapia escasa y contacto pasajero. Se excluyen los casos con cultivos probados de gonorreas. (13)

HISTORIA ACERCA DEL TEST DE LIMULUS:

A pesar de que Loeb en 1902 realizó estudios acerca del *Limulus polyphemus* en procesos inflamatorios y en las células linfáticas de la sangre, no fue 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 las bacterias Gram negativas. Ellos más adelante reportaron que la fracción sensitiva de endotoxinas estaba dentro del Amebocito y no en la fracción líquida de la sangre, estos reportes así como los de Rojas y Cols., Levin y Cols. y Reinhold y Fine, fueron los responsables para incrementar el interés en el uso del Test de Limulus para detectar endotoxinas. (3,112)

Adicionales ímpetus fueron dados con el uso de este test por Cooper y Cols. quienes reportaron la superioridad de este sobre el test para pirógenos USP Rabbit. Además los dados por Jorgensen y Cols. en el reporte del uso del test LAL para detectar endotoxinas en Radio farmacéutica y Biología. (3)

PRINCIPIOS BIOLOGICOS DEL TEST DE LIMULUS:

Todavía el mecanismo exacto de la reacción LAL-endotoxina no ha sido determinado, aparentemente el lisado de gelación es una coagulación enzimática similar al sistema de coagulación sanguínea en los mamíferos. Una representación esquemática de la reacción postulada es demostrada como sigue: Una enzima molecular larga y estrecha es semicoagulada o ensimas lisadas reaccionan con endotoxinas en la presencia de un metal de cationes

divalentes formando una activa enzima coagulada como propiedades similares a la proteinasa sérica.

La actividad de la coagulación enzimática es la de abrir una pequeña molécula de proteína soluble estrecha (Coagulen) para formar un gel protéico insoluble (Coagulin) (3)

LAS ENDOTOXINAS:

Se encuentran las endotoxinas en las Bacterias Gram negativas y se presentan en microorganismos no patógenos, los síntomas observados al inyectar estas sustancias en animales de laboratorio incluyen fiebre, diarrea, parálisis de los miembros, trastornos del metabolismo de carbohidratos y degeneración de los vasos sanguíneos, las endotoxinas producen los mismos síntomas generales, sin importar la especie de microorganismos de que provengan. (17)

Gran parte de lípidos puede eliminarse del resto del polisacárido sin pérdida notable de la actividad tóxica, pero las preparaciones sin lípidos son inactivas en lo absoluto. Los animales criados sin la flora intestinal corriente Gram negativa no son susceptibles a la endotoxina, en tanto que los que tienen flora típica son susceptibles, y cuando el animal es infectado o inyectado con material o bacterias endotóxicas, aparece cierto tipo de reacción de choque generalizado. (7)

En muchas otras bacterias Gram negativas, las sustancias celulares en toxina para animales de experimentación por inoculación parenteral. Esta endotoxina, probablemente es un complejo lípido polisacárido polipéptido que es separable como lipopolisacárido tóxico y se considera prototipo de endotoxina bacteriana. (7)

Las endotoxinas pueden formar toxinas que permanezcan dentro de la membrana celular. Estos venenos intracelulares se designan endotoxinas y son productoras de ellas los gonococos y los bacilos tíficos. (7)

INSTRUMENTAL PARA LA OBTENCION DE LA MUESTRA:

MATERIAL:

RECURSOS HUMANOS:

1. 100 pacientes con las siguientes características:
 - a) Sintomatología de gonorrea.
 - b) De 15 a 35 años de edad.
 - c) De ambos sexos.
 - d) Que consultaron entre los meses de octubre de 1983 a enero de 1984.
 - e) Que no hubiesen recibido tratamiento previo a la toma de la muestra.
2. Personal Médico de los Centros de Salud No. 2 y - Dispensario Municipal No. 3, quienes se encargaron de clasificar a los pacientes como posibles gonorreas, esto en base a sintomatología.
3. Personal del laboratorio microbiológico de la Dirección General de Servicios de Salud, que se encargaron de supervisar, la efectividad de los resultados en las diferentes pruebas realizadas.

INSTRUMENTAL PARA LA OBTENCION DE LA MUESTRA:

- a) Láminas porta objetos.
- b) Hisopos Estériles
- c) Mechero Portatil
- d) Cajas de Petri (Contenido Medios de Cultivo para Thayer-Martin)
- e) Dos asas de laboratorio
- f) 100 tubos de ensayo de 10 x 75 mm conteniendo 2cc. de Solución Salina estéril en cada uno.
- g) Un cilindro con atmósfera del 2 al 10% de CO₂, obtenida por el método de la vela.

INSTRUMENTAL PARA LA REALIZACION DEL ESTUDIO:

FROTE DE GRAM:

- a) Láminas Porta Objetos
- b) Reactivos:

- b.1 Violeta Genciana
- b.2 Lugol
- b.3 Alcohol Acetona
- b.4 Fucsina de Gram.

- c) Aceite de Inmersión
- d) Microscopio.

CULTIVO DE THAYER MARTIN:

- a) 100 cajas conteniendo medio selectivo de Thayer-Martin.
- b) Láminas porta objetos
- c) Asas de laboratorio, para resiembras
- d) Discos de P-Aminodimethylaniline oxalate (Test oxidasa)
- e) Tubos para fermentación de azúcares (Lactosa, saca rosa, dextrosa y maltosa).
- f) Microscopio
- g) Cilindros con atmósfera del 2 al 10% lograda esta por el método de la vela.
- h) Incubadora de 35 a 37°C.

PRUEBA DE LIMULUS (Test LAL 50)

- a) Reactivo de lisado del *Limulus polyphemus*. 2 Fcos. 6 mls. c/u.
- b) Endotoxina *E. coli* 100 ng/ml. (Control positivo) 2 Fcos. 4 mls. c/u.
- c) Agua destilada apirógena (Control negativo) 10 fcos. 10 mls. c/u.
- d) Tubos de ensayo de 10 x 75 mm. apirogenizados a - 180°C. por 3 horas.

- f) Pipetas de 1.5 y 10 cc. apirogenizadas a 180°C. - por 3 horas.
- b) Gradillas de laboratorio de metal.
- h) Sellador parafilm.
- i) Baño de María ajustable a 37° C.
- j) Agitador vortex.
- k) Guantes apirogenizados a 180°C. por 3 horas.

METODOLOGIA:

Este estudio consistió en tomar una población de 100 pacientes de ambos sexos, los cuales estuvieron comprendidos entre los 15 y 35 años de edad, y que consultaron a los centros de salud No. 2 y dispensario Municipal No. 3 de la Capital, durante los meses de octubre - de 1983 a enero de 1984, presentando sintomatología o características de gonorrea sin que hubiesen recibido - tratamiento anterior a la consulta.

Como primer paso se tomaron a los casos en estudio previamente clasificados como posibles gonorreas por el personal Médico de los centros de Salud mencionados anteriormente, y antes de tomárseles las muestras para el estudio, se les hizo una breve historia Clínica por mi persona, para ver si estas encajaban en el mismo y luego se les tomó muestra de secreción uretral purulenta a los hombres y del canal endocervial a las mujeres.

TOMA DE LA MUESTRA:

Al efectuar la toma de la muestra se hizo de la siguiente manera: PACIENTES MASCULINOS: Primeramente por medio de un asa de laboratorio flameada, se tomó una - muestra de secreción uretral purulenta o del exudado - que presentaba, y de inmediato se inoculó en un medio - de Thayer-Martin, el efectuar esto se incubaron de inmediato en un cilindro con atmósfera del 2 al 10% de CO₂ lograda esta por el método de la vela.

Luego por medio de un hisopo estéril se obtuvo una segunda muestra, y se introdujo en un tubo de ensayo de 10 x 75 mm. conteniendo 2 cc. de solución salina estéril, enroscándolo de inmediato, esto para efectuar la prueba LAL, poniendo los tubos en congelación de -2 a -10° C., y para finalizar se tomó una tercera muestra para efectuar un frotis en una lámina porta objetos para elaborar la tinción de Gram.

PACIENTES FEMENINOS: En estas se expuso el canal endocervical por medio de un espéculo estéril, procediéndose a tomar una muestra mediante un asa estéril inoculándola de inmediato en un medio de cultivo de Thayer-Martin, colocándolos en un cilindro para atmósfera de 2 a 10% de CO₂ logrado por el método de la vela. Luego se tomó una segunda muestra por medio de un hisopo estéril y se introdujo en un tubo de ensayo de 10 x 75 mm. conteniendo 2 cc. de Sol. Salina estéril para realizar la prueba LAL, colocando estos tubos a una temperatura de -2 a -10°C., previo a realizarla. Por último y por medio de un hisopo estéril se obtuvo otra muestra para efectuar un frotis directo en una laminilla porta objetos para la tinción de Gram.

Luego de tomadas las muestras en el laboratorio de la DGSS, se realizaron todos los procedimientos: En primer lugar se colorearon los frotis con la tinción de Gram, y se observaron al microscopio, dándose como positivos a todos aquellos en que se encontraron diplococos Gram negativos, intra y extracelulares.

Los medios de cultivo de Thayer-Martin ya inoculados fueron incubados a una temperatura de 35 a 37°C. por 24 a 48 Hrs. efectuándose la primera lectura a las 24 Hrs., al detectar colonias pequeñas, redondas de 1mm de diámetro, brillantes y transparentes se les efectuaba frote para Gram, y si estas resultaban positivas para diplococos Gram negativos se les aplicaba test oxidasa, dando la reacción positiva si era de rosado o negro, luego se tomaban colonias (2 ó 3) y se inoculaban en -

tubos para fermentación de azúcares (Dextrosa, maltosa, sacarosa y lactosa) incubándolas a una temperatura de -35 a 37° C., con las roscas flojas, colocándolas a una atmósfera de 2 a 10% de CO₂ en un cilindro logrado siempre por el método de la vela, por 24 horas.

Los medios en que no crecieron colonias en las primeras 24 horas y si persistían sin crecimiento se daban como negativas. Así mismo donde crecieron colonias con otras características siempre se les efectuaron frotis de gram para identificarlas, si eran mixtas se pasaban a otro medio por lo regular Agar chocolate por 24 Hrs. más, esto para ver si se lograba aislar colonias de *N. gonorrhoeae*, lográndose en algunas ocasiones, si no se lograba se daban como negativas.

La forma en que se efectuó la prueba de Limulus fue la siguiente: Primeramente se pusieron los tubos de ensayo de 10 x 75 mm. conteniendo las muestras obtenidas a temperatura ambiente, y por medio de pipetas de Pasteur se extrajo una gota de cada muestra para medirles el Ph, el cual debe estar entre 6 y 8 para poder realizar la prueba (Test LAL). Para medirles el Ph a las muestras se utilizaron tiras de medición para Ph de 0 a 14, de las cuales únicamente 9 muestras de las cien estudiadas se encontraron con un Ph de 5 ajustándolas por medio de una gota de NaOH, para lograr colocarlas entre 6 y 8.

Al tener las 100 muestras ajustadas a un Ph entre 6 y 9 y los reactivos a una temperatura ambiente se procedió a lo siguiente:

- Se tomaron los Fcos. con los reactivos (Control positivo o endotoxina *E. coli* de Difco. y test LAL - 50), y se abrieron utilizando guantes y forceps estériles y apirógenos, agregándoseles por medio de pipetas de 10 mls. a cada uno 4 y 5.2 mls. respectivamente. El test LAL se agitó suavemente por medio minjto, no así la endotoxina *E. coli* la cual -

se colocó en un agitador Vortex por un minuto.

- Se tomaron tubos con capacidad de 10 a 15 mls. para efectuar la prueba de compatibilidad y sensibilidad del test LAL., con el control positivo (endotoxina E. coli) y con la muestra en estudio, en este caso de gonorrea respectivamente. Los tubos se numeraron del 1 al 10 y se procedió de la siguiente manera.

- Del Fco. de control positivo se tomó un ml. y se colocó en el tubo No. 2, agregándosele a este 9 mls. de control negativo (Agua Apirógena) mezclándolos suavemente.

- Del tubo No. 2 se tomaron 4 mls. y se colocaron en el tubo No. 3 agregándosele 6 mls. de agua apirógena y mezclándolos suavemente.

- Del tubo No. 3 se tomaron 5 mls. y se colocaron en el tubo No. 4 colocándosele 5 mls. de agua apirógena mezclándolo suavemente. Esta operación se repitió hasta el tubo No. 9.

- En el tubo No. 10 se colocó únicamente un ml. de agua apirógena (Control Negativo).

- Al tener estas diluciones ya preparadas, se tomó de cada tubo 0.1 ml. colocándolos en tubos de ensayo de 10 x 75 mm. siempre apirógena, numerados del 1 al 10, y a c/u se le agregó también 0.1 ml. del test LAL mezclándolos suavemente. Luego se sellaron con papel parafilm y se pusieron en una gradilla de metal en baño de María a 37° C. por una hora.

- Para probar el test LAL con el producto en estudio, se siguieron exactamente todos los pasos anteriores, solo que en lugar de usar la endotoxina E. coli (Control positivo), se utilizó una muestra de

los 100 casos en estudio, la cual fue positiva para gonorrea en el cultivo. (Ver cuadros 4 y 5).

- Al tener presente la sensibilidad y compatibilidad del test LAL 50 con el control positivo y el producto en estudio se procedió a lo siguiente:

- Se tomaron las 99 muestras restantes, y por medio de pipetas apirógenas de un ml. graduadas en décimas, se obtuvo de cada una de ellas 0.1 ml. colocándolos en tubos de ensayo apirógenos de 10 x 75 mm. numerados; y de inmediato se les agregó 0.1 ml. de test LAL 50 a cada tubo y se procedió a mezclarlos suavemente. Por último se sellaron por medio de papel parafilm cada uno y se colocaron en gradillas de metal para inmediato ponerlas en baño de María a 37° C. por una hora, al cabo de la cual se leyeron los resultados. Los cuales se describirán más adelante.

- Se dió como positivo a todas aquellas muestras que presentaron un coágulo a gel firme al invertirlos inclusive a 180°, y como negativos en los que no se observó gel o coágulo alguno.

CUADRO No. 1

NUMERO DE CASOS POR EDAD Y SEXO SEGUN EL LUGAR
DE SU PROCEDENCIA - PERIODO COMPRENDIDO
de OCTUBRE/1983 A ENERO/1984.

Edad (años)	Centro de Sa- lud No. 2		Sub Total	Dispensario Mu- nicipal No.3		Sub Total	TOTAL
	F	M		F	M		
15-20	5	7	12	5	15	20	32
21-25	1	9	10	4	11	15	25
26-30	0	7	7	3	13	16	23
31-35	2	7	9	0	11	11	20
TOTAL	8	30	38	12	50	62	100

Fuente: Dispensario Municipal No. 3, Centro de Salud
No. 2

Se tomaron un total de 100 casos de ambos sexos - entre los 15 y 35 años de edad, provenientes de los Centros de Salud No. 2 y del Dispensario Municipal No. 3.- El primero con control de venereas por las mañanas y el segundo en su programa de control de venereas por las tardes.

Se tomaron en este estudio como se ha mencionado, - pacientes con sintomatología de Gonorrea, de ambos sexos y en el período de investigación comprendido de Octubre de 1983 a Enero de 1984.

Como se observa en el presente cuadro, se obtuvieron un total de 38 pacientes del Centro de Salud No. 2 (8 femeninos y 30 masculinos) y del Dispensario Municipal No. 3 un total de 62 casos (12 femeninos y 50 masculinos), siendo el grupo etareo más afectado con esta -

sintomatología entre los 15 y 20 años de edad, con un total de 32 pacientes (32%) siendo 10 Femeninos y 22 - Masculinos.

Observándose un mayor índice de afluencia al Dispensario Municipal No. 3 con un total de 62 pacientes - (62%) siendo 12 Femeninos y 50 Masculinos.

CUADRO No. 2

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS FROTIS DE GRAM
REALIZADOS EN LOS 100 CASOS EN ESTUDIO POR
EDAD Y SEXO, PERIODO COMPRENDIDO DE
OCTUBRE DE 1983 A ENERO DE 1984

Edad (años)	Frote de Gram		Sub Total	Frote de Gram		Sub Total	TOTAL
	Positivo			Negativo			
	F	M		F	M		
15-20	4	15	19	6	7	13	32
21-25	1	10	11	4	10	14	25
26-30	0	13	13	3	8	11	24
31-35	1	14	15	1	3	4	19
TOTAL	6	52	58	14	28	42	100

Fuente: Centro de Salud No. 2 y Disp. Municipal No. 3
Laboratorio de la D.G.S.S.

A todos los pacientes se les efectuaron Frotis de Secreción para Gram obteniendo los siguientes resultados: 58 casos resultaron positivos, siendo estos 6 Femeninos y 52 Masculinos. Así mismo se obtuvieron un total de 42 casos negativos de los cuales 14 casos fueron femeninos y 28 masculinos.

Se puede determinar que de los 80 pacientes masculinos, 52 fueron positivos para Gram (65%) y 28 negativos (35%). De los 20 pacientes femeninos 6 fueron positivos para Gram (30%) y 14 casos fueron negativos (70%). Siendo el grupo etareo con más casos positivos, entre los 15 y 20 años de edad con un total de 19 (4 femeninos y 15 masculinos).

CUADRO No. 3

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS CULTIVOS DE THAYER-MARTIN
REALIZADOS A LOS 100 CASOS EN ESTUDIO POR EDAD Y SEXO
PERIODO COMPRENDIDO DE OCTUBRE DE 1983 A ENERO DE 1984

Edad (años)	Thayer Mar- tin (+)		Sub Total	Thayer Mar- tin (-)		Sub Total	TOTAL
	F	M		F	M		
15-20	2	10	12	8	12	20	32
21-25	0	5	5	5	15	20	25
26-30	0	6	6	3	15	18	24
31-35	2	7	9	0	10	10	19
TOTAL	4	28	32	16	52	68	100

Fuente: Centro de Salud No. 2 y Dispensario Municipal
No. 3 Laboratorio de la D.G.S.S.

Se les practicó a todos los casos en estudio Cultivo de Thayer-Martin, para confirmar casos con *N. gonorrhoeae*, resultando un total de 32 casos positivos (32%), de estos 4 fueron femeninos y 28 masculinos. Dándose como negativos para el mismo un total de 68 casos: 16 - femeninos y 52 masculinos.

Se puede observar que el Cultivo de Thayer-Martin solo detectó *Neisseria gonorrhoeae* en el 20% de las pa-

cientes femeninas o sean 3 casos y en los pacientes masculinos un 35% o sean 28 casos, de los 80 pacientes estudiados

CUADRO No. 4

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA ESTANDARIZACION DE LA SENSIBILIDAD DEL TEST LAL 50 CON EL CONTROL POSITIVO O ENDOTOXINA E COLI DE DIFCO.-

TUBO	Endotoxina E. coli 100ng. Reconstituida con 4 mls. de agua apirogena.	Cantidad en Mls. de agua apirog.a añadir	Concentra- ción final de diluci- ón de En dotoxina	Canti- dad en Mls. to en Mls. aña- dir del test LAL	Resul- tados obte- nidos
1.	1 ml.	-	25	0.1 ml 0.1 ml	+
2.	1 ml(25ng/ml)	9 mls.	2.5	0.1 ml 0.1 ml	+
3.	4 mls(2.5ng/ml)	6 mls.	1.0	0.1 ml 0.1 ml	+
4.	5 mls(1.0ng/ml)	5 mls.	0.5	0.1 ml 0.1 ml	+
5.	5 mls(0.5ng/ml)	5 mls.	0.25	0.1 ml 0.1 ml	+
6.	5 mls(0.25ng/ml)	5 mls.	0.125	0.1 ml 0.1 ml	+
7.	5 mls(0.125ng/ml)	5 mls.	0.062	0.1 ml 0.1 ml	+
8.	5 mls(0.062ng/ml)	5 mls.	0.032	0.1 ml. 0.1 ml	-
9.	5 mls(0.032ng/ml)	5 mls.	0.016	0.1 ml. 0.1 ml	-
10.	Agua apirógena	-	-	0.1 ml. 0.1 ml.	-

Fuente: Laboratorio de la D.G.S.S., OCTUBRE 1983/Enero/1984. (3)

CUADRO No. 6

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA COMPATIBILIDAD PROBADA DEL TEST LAL CON EL PRODUCTO EN ESTUDIO (GONORREA). OCTUBRE/1983-ENERO/1984

TUBO	Muestra de un caso con Gonorrea 2 mls.	Cantidad de mls. de agua apirogena a añadir	Concentra- ción final de dilu- ción	Cant. de mls. toma- das de los tubos	Cant. en mls. del Test LAL a añadir	Resul- tados obte- nidos
1	1 ml.	-	25	0.1 ml.	0.1 ml.	+
2	1 ml.	9 mls.	2.5	0.1 ml.	0.1 ml.	+
3	4 mls (Tubo N.2)	9 mls.	1.0	0.1 ml.	0.1 ml.	+
4	5 mls(Tubo No.3)	5 mls.	0.5	0.1 ml.	0.1 ml.	+
5	5 mls(Tubo No.4)	5 mls.	0.25	0.1 ml.	0.1 ml.	+
6	5 mls(Tubo No.5)	5 mls.	0.125	0.1 ml.	0.1 ml.	+
7	5 mls(Tubo No.6)	5 mls.	0.062	0.1 ml.	0.1 ml.	+
8	5 mls(Tubo No.7)	5 mls.	0.032	0.1 ml.	0.1 ml.	+
9	5 mls(Tubo No.8)	5 mls.	0.016	0.1 ml.	0.1 ml.	+
10	Agua Apirogena	1 ml.	-	0.1 ml.	0.1 ml.	-

Fuente: Laboratorio D.G.S.S. (3)
Centro de Salud No. 2 y Dispensario Municipal No. 3

ANALISIS DE LOS RESULTADOS DE LOS CUADROS Nos. 4 y 5.

Para poder realizar la prueba del Test de Limulus, como ya se mencionó anteriormente se hizo necesario estandarizar la sensibilidad y compatibilidad de este con el control positivo (Endotoxina *E. coli*) y con el producto en estudio respectivamente. Se detectó que la sensibilidad del Lote de Test LAL 50, con el Control Positivo de los laboratorios fabricantes dió una reacción positiva hasta la 7a. dilución, concentración de 0.062 ng/ml de endotoxina *E. coli*.

En cuanto a la compatibilidad del producto en estudio, el Test LAL reaccionó con este hasta la 9a. dilución o sea hasta 0.016 ng/ml. o sea que el lote de Limulus que se empleó, sí resultó bastante sensible y compatible con la detección de endotoxinas de *Neisseria gonorrhoeae*.

CUADRO No. 6

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS 100 CASOS EN ESTUDIO AL EFECTUARSELES LA PRUEBA DE LIMULUS, (TEST LAL 50), POR EDAD Y SEXO PERIODO COMPRENDIDO DE OCTUBRE 1983 A ENERO DE 1984

Edad	Test LAL 50 Positivo		Sub Total	Test LAL 50 Negativo		Sub Total	TOTAL
	F	M		F	M		
15-20	4	8	12	6	15	20	32
21-25	1	11	12	4	9	13	25
26-30	0	7	7	3	14	17	24
31-35	1	9	10	1	8	9	19
TOTAL	6	35	41	14	45	59	100

Fuente: Laboratorio de la D.G.S.S.
Centro de Salud No. 2 y D. Municipal No. 3

Al efectuar el test de Limulus como diagnóstico de Gonorrea, en los cien casos en estudio se obtuvieron los siguientes resultados: Se detectó un gel o coágulo firme en un total de 41 casos (41%) siendo de estos 6 casos femeninos y 35 masculinos, resultando negativos un total de 59 casos, siendo estos 14 femeninos y 45 masculinos. Estos resultados se obtuvieron luego de permanecer las muestras por una hora en baño de María a 37° C.

El grupo etareo que se vió con más casos positivos fue el de 15 a 20 años, con un total de 12 casos, observando igual número en el grupo de 21 a 25 años.

CUADRO No. 7

RESULTADOS OBTENIDOS ENTRE LOS TRES METODOS DE DIAGNOSTICOS EMPLEADOS FROTE DE GRAM, CULTIVO DE THAYER-MARTIN Y TEST LAL 50 POR EDAD Y SEXO PERIODO COMPRENDIDO DE OCTUBRE/1983-ENERO/1984

Edad	Frote de Gram		Total	Cultivo de Thayer-Mar.		Total	Test de Limulus		TOTAL
	F	M		F	M		F	M	
15-20	4	15	19	2	10	12	4	8	12
21-25	1	10	11	0	5	5	1	11	12
26-30	0	13	13	0	6	6	0	7	7
31-35	1	14	15	2	7	9	1	9	10
TOTAL	6	52	58	4	28	32	6	35	41

Fuente: Laboratorio de la D.G.S.S.
Centro de Salud No. 2 y Disp. Municipal No. 3

Este cuadro sistetiza los resultados obtenidos en los tres métodos de diagnóstico empleados para la detección de Gonorrea en cuanto a los casos positivos se refiere, encontrándose que el Frote de Gram detectó un to

tal de 58 casos (58%), el Test LAL detectó un total de 41 casos (41%), mientras tanto el Cultivo comprobó un total de 32 casos (32%). Determinándose que el Frote de Gram dió un mayor índice de casos falsos positivos que la prueba de Limulus, en base al cultivo de Thayer-Martin.

CUADRO No. 8

RESULTADOS FINALES OBTENIDOS DE LOS 100 CASOS
ESTUDIADOS POR METODO DIAGNOSTICO EMPLEADO,
EDAD Y SEXO. PERIODO COMPRENDIDO DE
OCTUBRE DE 1983 A ENERO DE 1984

Métodos de Diagnóstico empleados.			Edad (años)		15-20		21-25		26-30		31-35		TOTAL
Frote Gram	Cultivo de T.M.	Test LAL	Sexo		F	M	F	M	F	M	F	M	
+	+	+			2	5	0	5	0	1	1	4	18
+	+	-			0	5	0	0	0	2	0	2	9
-	+	+			0	0	0	1	0	1	0	1	3
+	-	+			0	2	0	2	0	2	0	2	8
+	-	-			2	3	1	4	0	8	0	5	23
-	+	-			0	0	0	0	0	0	1	1	2
-	-	+			2	2	1	4	0	2	0	1	12
-	-	-			4	5	3	4	3	4	0	2	25
TOTAL					10	22	5	20	3	20	2	18	100

Fuente: Dispensario Municipal No. 3, Centro de Salud
No. 2, Laboratorio de la D.G.S.S.

En el presente cuadro se puede determinar que de los 100 casos estudiados, solo en 18 (3 femeninos y 15 masculinos) se obtuvo un resultado positivo para las 3

pruebas diagnosticas empleadas. Así mismo se pudo determinar lo siguiente:

- En 9 casos (masculinos todos) se obtuvo resultados positivos para Frote y Cultivo, no así para Test LAL.
- En 3 casos (masculinos todos) se obtuvo resultados positivos para Cultivo y Test LAL, no así para Frote de Gram.
- En 9 casos (masculinos todos) se observó positividad para Frote de Gram y Test LAL, no así para Cultivo de Thayer-Martin.
- En 23 casos (3 femeninos y 20 masculinos) solo se observó positividad para Frote de Gram, no así en el cultivo, ni en el Test LAL.
- En 2 casos (uno femenino y uno masculino) se obtuvo positividad unicamente al cultivo de Thayer-Martin, resultando negativos el frote ni para Test LAL.
- En 12 casos (3 femeninos y 9 masculinos) hubo positividad unicamente para Test LAL, no así para Cultivo de Thayer-Martin, ni para Frote de Gram.
- De los 100 casos estudiados, hubo un total de 25 casos que fueron negativos para las tres pruebas de diagnóstico empleadas.

Así mismo se puede observar en el presente cuadro que en cuanto a la totalidad de casos positivos para Frote de Gram en relación al Cultivo de Thayer-Martin fue de 27 casos (3 femeninos y 24 masculinos).

La totalidad de casos positivos para Test LAL en relación a los casos positivos para Cultivo de Thayer-Martin fue de 21 casos (3 femeninos y 18 masculinos).

CUADRO No. 9

RESULTADO COMPARATIVO ENTRE CASOS POSITIVOS PARA FROTE DE GRAM Y TEST LAL 50 EN BASE A LOS CASOS POSITIVOS PARA CULTIVO DE THAYER-MARTIN, OCTUBRE/1983-ENERO/1984.

Medio de Diagnóstico	Número de casos positivos	Porcentaje (%)
Cultivo de Thayer-Martin	32	100
Frote de Gram	27	84.34
Test LAL 50	21	65.62

Fuente: Centro de Salud No. 2 y Dispensario Municipal No. 3 y Lab. D.G.S.S.

Como se observa en este cuadro el número de casos positivos comprobados con cultivo de Thayer-Martin fue de 32 casos.

En base a esto se pudo determinar que el Frote de Gram detectó un número mayor de casos o sean 27 (84.34%) de los 32 con cultivo comprobado, en relación a la prueba de Limulus que solo detectó un total de 21 casos (65.62%), de los 32 casos positivos para Cultivo de Thayer-Martin.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los pacientes con sintomatología de Gonorrea, demuestran que la prueba diagnóstica del test LAL para detectar la enfermedad, se reduce a un 65.62% de efectividad en base a los resultados alcanzados con el medio selectivo de Thayer-Martin. Este resultado fue bajo en relación al obtenido por el

Frote de Gram que fue del 84.34%, siempre en base al cultivo.

El test LAL dió un total de 41 casos positivos de los 100 en estudio, o sea que en relación al cultivo de Thayer-Martin este Test dió un total de 20 casos falsos positivos (29.41%), pudiéndose deber esto a que algunas muestras se les ajustó el Ph para que estuvieran entre 6 y 8, agregándoseles NaOH pudiendo este alterar el gel. Estos casos falsos positivos fueron en base a los 68 negativos.

En cuanto al frote de Gram este dió un total de 58 casos positivos, o sea que en relación al Cultivo de Thayer-Martin, dió un total de 31 casos falsos positivos (45.58%) de los 68 negativos para el Cultivo, por lo tanto se comprobó que el Frote de gram dió un alto índice de falsos positivos en relación al Test LAL.

Los resultados obtenidos con el Test LAL son bajos en relación a estudios similares efectuados anteriormente (12,13,16,17), como los efectuados por Prior y Cols. en donde el Test LAL detectó el 100% de 61 casos comprobados para Gonorrea. (12)

Los bajos resultados alcanzados por el Test LAL pueden deberse a varios factores por ejemplo: Es la primera vez que se usa en nuestro medio, y su alto costo limitó la investigación a efectuar una muestra o prueba por caso y no en duplicado como lo recomiendan. (3)

El método que se utilizó para realizar la prueba LAL fue la de gelación vrs. no gelación en su punto final de dilución, y se necesitaron 2 sets de Test LAL 50, para 50 muestras cada uno, con un valor aproximado de Q. 125.00 quetzales por unidad, y lo distribuyen los Laboratorios Difco de Detroit, Michigan, USA.

El frote de Gram representa un medio diagnóstico - presumtivo más económico, en comparación con la prueba

LAL, empero lo que persiguió este estudio fue el de ver como funcionaba este nuevo método diagnóstico en nuestro medio, y ver si era eficaz en la detección precoz de la enfermedad gonorreica.

Todo el material usado tanto para la obtención como realización del estudio, a excepción del Test LAL, - fue proporcionado por el Dr. César Leonel González Camargo, Jefe del laboratorio Microbiológico de la Dirección General de Servicios de Salud.

CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, se comprobó que de los 100 pacientes con sintomatología de Gonorrea, un total de 41 casos fueron positivos para la prueba LAL. - De estos solo 21 concordaron con los 32 casos comprobados con cultivo, o sea que solo detectó el 65.62% de estos. Así mismo se obtuvo un total de 20 casos que fueron positivos, de los 68 negativos al cultivo, o sea que tuvo un índice de falsos positivos del 29.41%.
2. El frote de Gram demostró un total de 27 casos positivos o sea 84.34%, en base a los 32 casos probados para cultivo de Thayer-Martin. Así mismo demostró un alto índice de casos falsos positivos o sea 31 casos (45.58%). Esto comprobó que el frote de Gram es efectivo en la detección temprana de la enfermedad, pero también comprobó que da un alto índice de falsos positivos para la misma.
3. Comparando los resultados del frote de Gram con los obtenidos por el test LAL, se comprobó que el frote Gram fue más efectivo en detectar casos positivos de gonorrea comprobados por Cultivo, o sea un 84.34%, en tanto que el Test LAL obtuvo un 65.62% de positividad. Lo que demuestra que el Test LAL resultó inferior al Frote de Gram en la detección precoz de Gonorrea, esto efectuando la prueba LAL simple y no en duplicado como lo han recomendado. (3)
4. Se determinó que en una población de 100 casos con características o sintomatología de Gonorrea, solo el 32% resultó con esta enfermedad comprobada por cultivo, en comparación con la utilización de las pruebas presuntivas usadas, siendo de un 58% para el frote de Gram y de un 41% para la prueba LAL.

RECOMENDACIONES

1. Efectuar estudios en el futuro similares al presente, solo que utilizando una mayor cantidad de casos y por ende una mayor cantidad de Test LAL, tomando como base la metodología empleada en este estudio, y así comparar los resultados obtenidos.
2. Efectuar la prueba del Test de Limulus en duplicado a cada muestra para un mejor índice de positividad y confiabilidad de la misma. Esto al realizar futuras investigaciones.
3. Sería necesario que en nuestro medio que a todos los casos con sintomatología de Gonorrea, se les efectúe en la medida de las posibilidades Cultivo de Thayer-Martin, y no solamente se basen en el frote de Gram, ya que este da un alto índice de falsos positivos.

RESUMEN

El test de Limulus (LAL test), es una prueba que se caracteriza por detectar endotoxinas en los microorganismos Gram negativos exclusivamente, y desde 1964 en que Levin y Bang detectaron que la sangre del cangrejo Limulus se ponía firme en presencia de las endotoxinas de los microorganismos Gram negativos su uso ha venido en aumento.

Este test ha sido empleado en varios estudios sobre orina, LCR, sangre y exudados uretrales, y realizan do varios estudios relacionados con gonorrea. (3,12,13, 16,17).

El interés que persiguió esta investigación fue la de utilizar este test LAL por primera vez en nuestro medio y ver la efectividad en la detección precoz de la gonorrea en nuestro medio.

En esta investigación se tomaron un total de 100 - casos con sintomatología de gonorrea de los centros de Salud No. 2 y Municipal No. 3, de los cuales 20 resultaron femeninos y 80 masculinos, de edades comprendidas entre los 15 y 35 años de edad, a quienes luego de tomárseles una breve historia clínica se les tomó muestras para Gram, Limulus y cultivo de Thayer-Martin, obteniendo los siguientes resultados.

Por medio del cultivo de Thayer-Martin se obtuvieron un total de 32 casos positivos (4 femeninos y 28 masculinos), resultando 68 casos negativos. En tanto que los resultados obtenidos por los métodos presuntivos de Gram y Limulus fueron los siguientes: Gram 58 casos positivos (6 femeninos y 52 masculinos) y Limulus 41 casos positivos (femeninos 6 y masculinos 35).

En relación a los 32 casos detectados por cultivo de Thayer-Martin, el frote de Gram fue positivo en 27 - casos de estos, o sea el 84.34%. En tanto que el test de Limulus diagnosticó de estos 32 casos solo 21 o sea el 65.62%

En cuanto a los casos falsos positivos el frote de Gram dió un total de 31 (45.58%) en relación a los 68 - casos negativos comprobados y el Test LAL dió un total de 20 casos (29.41%).

Los presentes resultados con respecto a esta prueba de LAL son inferiores a los obtenidos en estudios - realizados anteriormente (11) y esto puede deberse a - que es la primera vez que se utiliza el mismo en nuestro medio, y además por su costo alto no se pudo efectuar - la prueba en duplicado; como recomiendan hacerlo (3). - Por lo tanto se recomienda efectuar en el futuro estudios similares a este solo que empleando mayor cantidad de material LAL y al obtener los resultados compararlos con el presente y así detectar su real eficacia en el diagnóstico temprano de la enfermedad gonorréica, siempre siguiendo la metodología empleada en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bahuer, J. D. *Clinical laboratory methods*. 8th. ed. St. Louis, Mosby, 1974. 947 p. (pp. 670-72).
2. Barlow, D., et al. Gonorrhea in women, clinical and laboratory aspects. *Lancet* 1978, Apr. 8; 1(806): 761-64.
3. Difco Laboratories. *Limulus amoebocyte lysate, LAL methodology* Detroit, 1982. 8 p.
4. Dobose, D. A., et al. Comparison of plasma extractions techniques in preparation of samples for endotoxin testing by the Limulus amoebocyte lysate test. *J Clin Microbiol* 1980, Jan; 11(1):68-72.
5. Gross, S. *Manual de medicina interna* Barcelona Rev. verté, 1979 t.1. (pp. 670-72).
6. Guckian, J. Diagnóstico y tratamiento de la gonorrrea. *Medicina Contemporanea* 1979, Jun; (7):21.
7. Jewetz, E. y J. Melnick. *Manual de microbiología médica*. 6a. ed. México, Manual Moderno, 1975, 631p. (pp. 215-514).
8. King, M. *Técnicas de laboratorio para el técnico rural*. México, Calvé, 1979. 30 p. (p.11.6).
9. Lendell, E. y W. McCauley. *Zoología*. México, Interamericana, 1967. 713 p. (pp. 171-246).
10. Nachum, R. y E. Shambrom. Rapid detection of gram negative bacteriuria by Limulus amoebocyte lysate assay *J Clin Microbiol* 1981, Jan; 13(1): 158-62.

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS

DE LA SALUD

(C I C S)

CONFORME:

Dr. JORGE R. VELA GALINDO
ASESOR.

Dr. Jorge Rolando Vela Galindo
Médico y Cirujano
Colegiado No. 4074

Dra. Elma E. Villatoro L.
ASESOR.

SATISFECHO

Dr. César L. González C.
REVISOR.

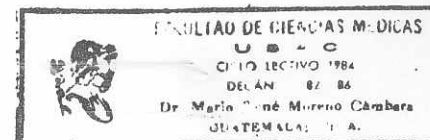
APROBADO:

DIRECTOR DEL CICS

IMPRIMASE:

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

Guatemala, 27 de abril de 1984



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