UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

"DETECCION DE ENDOTOXINAS EN SANGRE DE PACIENTES CON SOSPECHA DE SEPSIS MEDIANTE EL TEST DE LIMULUS"

(Estudio prospectivo de 51 de casos de Pediatría del Hospital Roosevelt 1984).

TESIS

Presentada a la Junta Directiva de la
Facultad de Ciencias Médicas de la
Universidad de San Carlos de Guatemala

POR

FREDY CRUZ AVILA

En el Acto de Investidura de

MEDICO Y CIRUJANO

INDICE

I. INTRODUCCION

II. DEFINICIONES

III. JUSTIFICACIONES

IV. OBJETIVOS

V. REVISION BIBLIOGRAFICA

VI. MATERIALES Y METODOS

VII. PROCEDIMIENTO

VIII. RESULTADOS

IX. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

XI. RESUMEN

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

INTRODUCCION

El principal objetivo de ésta investigación fué detectar endotoxinas en sangre de pacientes con sospecha de sepsis, mediante el lisado de los amebocitos de Limulus, en el departamento de pediatría del Hospital Roosevelt, durante el período comprendido entre los meses de Febrero a Mayo de 1984.

Al ser procesadas las muestras sanguíneas, se comprobó mediante el test de Limulus la existencia de procesos infecciosos que causaron endotoxemia. La prueba de Limulus demostró la susceptibilidad, con la rápida presencia del gel, en 90 minutos, en respuesta a los casos positivos para endotoxinas de gérmenes Gram negativos.

Se requirió para su procesamiento de los laboratorios de la sección de bacteriología del Hospital Roosevelt y de laboratorios de la Dirección General de Servicios de Salud.

DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

En Guatemala, la mortalidad infantil es muy elevada. En el año 1970 a nuestro país le correspondió la tasa de mortalidad infantil más alta de América Latina, con un porcentaje de 72.3% de 1000 nacidos vivos (15).

Algunas de las cifras de mortalidad reportada por las diversas fuentes de información no concuerdan. La dirección General de Estadística reporta que en el año de 1980 hubo 516 defunciones por causa de sepsis. La Organización Mundial de la Salud y la Dirección General de Servicios de Salud Pública para el mismo año reportan 213 defunciones. Otro estudio de investigación de Electivo, Titulado "Análisis de las tasas y causa de Mortalidad de pacientes atendidos en servicios internos del Hospital General "San Juan de Dios" (Estudi retrospectivo revisión de (1972 a 1979) reporta en 7 año un total de 969 fallecidos por septicemia o sea 138 anu les.

Revisando el libro de ingresos y egresos de la sa la de Cuidados Intensivos de Pediatría del Hospital Ro sevelt, en el año investigado 1982 a 1983 (Septiembre 8 a Agosto 83) reporta que de 191 ingresos de sepsis fall cieron 143; en base de ésta información debemos de considerar que: Si solo una sala del Hospital Rooseve reporta éstas cifras; al tomar en cuenta todos los Ho pitales de la República se estimarían cifras mayores.

JUSTIFICACIONES

Ls septicemia en la edad pediátrica es un problema frecuente. En la sala de pediatría de Cuidados Intensivos del Hospital Roosevelt en el período de Septiembre de 1982 a Agosto de 1983 ingresaron con diagnóstico de sepsis o sospecha de la misma 191 pacientes, la cuál nos parece es imperativo el diagnóstico temprano de la septicemia; ya que la mortalidad está relacionada con la rapidez en que se hace el diagnóstico y se inicia el tratamiento.

Existen pruebas de laboratorios las cuales desafortunadamente requieren considerable tiempo para su lectura. Razón por lo que se hace necesario utilizar otras pruebas que acorten el tiempo de diagnóstico, para tener un inicio de una farmacoterapia rápida y adecuada especialmente cuando la sepsis es debida a bacterias Gram-negativas.

El test de Limulus representa rapidez, acortamiento de tiempo diagnóstico, cuantificación de endotoxinas en sangre, y es la prueba más susceptible hasta hoy para la detección de endotoxinas producidas por gérmenes Gram-negativos.

Procesar un hemocultivo lleva de 7 a 14 días; para el test de Limulus se necesita únicamente 2 horas; - por lo tanto, si un técnico de laboratorio devenga Q.1.50 por hora es obvio que el test de Limulus resulta ser - más rápido. Esta situación es de gran importancia y de mucha utilidad especialmente en Hospitales grandes en donde son procesadas innumerables cantidades de muestras diariamente.

OBJETIVOS

Generales:

a) Establecer una correlación de laboratorio con hallazgos clínicos en pacientes con septicemia, empleando el test de Limulus.

Específicos:

1. Utilizar el test de Limulus como diagnóstico rápido de sepsis a Gram-negativos.

2. Establecer las limitantes y los beneficios de la prueba para ser usada rutinariamente en el esquema de diagnóstico.

Septicemia:

La septicemia es una de las afecciones más comúnmente asociadas con el síndrome de coagulación intravascular diseminada. Clásicamente, la septicemia es debida a microorganismos Gram-negativos como ocurre en la meningococcemia, pero el síndrome puede presentarse en infecciones por microorganismos Gram-positivos, Virus, Hongos, Plasmódios e incluso mononucleosis infecciosa. En trabajos experimentales en animales, se encontró que la coagulación intravascular inducida por endotoxinas se evita mediante la producción previa de granulocitopenia con nitrógeno mostaza. (14)

La coagulación intravascular puede ser producida por infusión de extractos de leucocitos provenientes de animales tratados con endotoxinas. Se cree que los leucocitos pueden participar en la coagulación intravascular que acompaña a ciertos casos de sepsis; el shock anafilático frecuentemente se acompaña de coagulación intravascular. (14)

Septicemia neonatal:

Deberá sospecharse sepsis en los neonatos de madres que han presentado picos febriles, membranas prolongadamente rotas, amnioitis o cualquier sospecha de enfermedad infecciosa, y en todo caso de enfermedad obscura en niños pequeños deberá tomarse cultivos bacterianos y virales apropiados. (Sangre nasofaringe, orina, excremento y LCR). La infección puede penetrar

al torrente circulatorio desde una variedad de sitios; puede ser causado por un sinnúmero de organismos patógenos cuya localización puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo. (14)

Síntomas:

1. Anorexia, poco aumento de peso, letargo e inquietud.
2. Es frecuente la inestabilidad de la temperatura, siendo más frecuente la hipotermia que la fiebre; las manifestaciones gastrointestinales o del sistema respiratorio o nervioso central, pueden ser prominentes. El sufrimiento respiratorio en las enfermedades por Estreptococo beta hemolítico del grupo B puede tener aparición temprana y no diferenciarse del síndrome respiratorio idiopático. (14)

Signos:

Con frecuencia se presenta hepatomegalia, esplenomegalia, palidez, cianosis e ictericia, especialmente en las primeras 24 horas. Es frecuente la hemorragia con erupciones petequiales, no es infrecuente una meningitis o cualquier otra infección focal asociada. (14)

SHOCK ENDOTOXICO:

Endotoxemia o shock séptico, es un estado caracterizado por inadecuada perfusión tisular, asociado con endotoxemia o con bacteremia debido a organismos Gram-negativos; también ha sido asociado con enfermedades debido a bacterias Gram-positivas, Virus, Rickettsia y Hongos. (7)
La incidencia de shock séptico en la población pediátrica es desconocida (7).

En los casos patológicos de pacientes que sufren shock fallecen el 98%; y 11 de 36 (31 por ciento) de pacientes con septicemia desarrollan shock (7).

Se encontró hiperglicemia e hipoinsulinemia en Cinocéfalos (mono grande Africa "baboons") en 15 minutos después de inyectarles organismos de E. coli; por ésta inhibición de secresión de insulina en el suero, podría ocurrir una hipoglicemia debido a la inhibición de gluconeogénesis, con vaciamiento de las reservas de glicógeno. (7)

Al inyectar en ventrículo lateral endotoxina de E. coli en perros en 15 a 30 minutos produce hiperventilación, y en 2 horas baja la frecuencia cardíaca, la presión arterial y el gasto cardíaco (7).

FISIOPATOLOGIA:

La fisiología del shock endotóxico es muy complejo y podría ser el mejor paso de entrada de efectos biológicos de endotoxina (7).

Las endotoxinas bacterianas están compuestas principalmente de lípidos y polisacáridos, éstos son -- componentes importantes de las capas del exterior de la pared celular de bacterias Gram-negativas.
Los lípidos son probablemente los más responsables de los efectos de endotoxina: El antígeno "O" de bacilo Gram-negativo está relacionado y en parte el componente polisacárido.
Cuando se administra por vía intravenosa pequeñas cantidades de endotoxina en adultos normales les produce fiebre en 90 a 120 minutos que persiste por 3 o 4 horas. (7)

Después de la infución de endotoxinas en animales y humanos se ha demostrado leucocitosis, leucopenia y trombocitopenia; la endotoxina ocasiona liberación de plaquetas, factor III y activa el factor XII, los dos factores desencadenan el síndrome de coagulación intravascular diseminada (CID) (7).

La endotoxina es responsable por las anormalidades de la coagulación en el síndrome de CID. También se notan bajas concentraciones de C3. (7).

DEFINICIONES

SEPSIS:

Son pacientes con sintomatología clínica de una septicemia pero que no se ha aislado el germen en sangre.

SOSPECHA DE SEPSIS O SEPTICEMIA CLINICA:

Son pacientes que desarrollan alguna sintomatología de septicemia que también pueden ser secundarias a otras entidades clínicas como: deshidratación, meningitis en neo-natos e infecciones urinarias.

RIESGO DE SEPSIS:

Se establece por medio de un protocolo específico para recién nacidos en cuyo historial clínico manifiesten condiciones maternas del parto y del post-parto inmediato que puedan resultar en el desarrollo de septicemia.

SEPTICEMIA:

Son pacientes con sintomatología clínica y germen aislado en cultivos de sangre.

BACTEREMIA:

Es cuando se detecta el germen en sangre y no hay sintomatología clínica.

ENDOTOXEMIA:

Es la presencia de endotoxinas bacterianas en sangre.

* A continuación se presentarán algunos reportes con respecto a diferencias por Septicemia de América Latina.

CUADRO 11-3

NUMERO DE DEFUNCIONES (CIE, 9o. REVISION) POR CAUSAS ESPECIFICAS, CON TASAS BRUTAS Y AJUSTADAS POR EDAD, POR 100,000 HABITANTES

POR SEPTICEMIA

SEPTICEMIA EN GUATEMALA - 1979		
Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
444	6.3	5.9
SEPTICEMIA EN GUATEMALA 1980		
Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
213	2.9	2.8
SEPTICEMIA EN BARBADOS 1979		
Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
16	6.4	3.4
SEPTICEMIA EN BARBADOS 1980		
Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
6	2.4	1.1
SEPTICEMIA EN CHILE 1980		
Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
638	5.7	5.7

Fuente: Organización Panamericana de la salud,
de datos: las condiciones de la salud en las América.

SEPTICEMIA EN HONDURAS 1979

Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
121	3.4	3.4

SEPTICEMIA EN PANAMA 1980

Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
54	2.9	2.9

SEPTICEMIA EN PUERTO RICO 1979

Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
139	4.1	3.8

SEPTICEMIA EN BRASIL 1979

Número	Tasa bruta	Tasa ajustada por edad
6503	6.6	6.8

Fuente de datos: Organización Panamericana de la salud, las condiciones de la salud en las Américas.

GENERALIDADES DEL METODO LAL:

Para la investigación de septicemia varios métodos han sido utilizados, el Hemocultivo como tradicional, con el inconveniente de la información tardía del germen. Actualmente se conoce el test LAL descrito por Levin y Bang y posteriormente por Rojas-Corona y otros en 1964; éste método ya utilizado en países desarrollados para detección de endotoxinas bacterinas ha demostrado ser sensitivo, práctico, confiable y relativamente barato. (9, 16, 6, 21).

Un estudio efectuado en 98 pacientes con sospecha de septicemia a Gram-negativos se encontró que el 17% presentaban endotoxemia; hubo una buena correlación entre los test reactivos para la endotoxina y la existencia de bacteremia organismo Gram-negativos. (9)

Estudios previos con el test de Limulus han demostrado su utilidad para detectar endotoxinas a Gram-negativos, ya que al estudiarlo en pacientes con infecciones a Gram-positivos se encontró no útil (9).
En estudios controlados se ha establecido que el LAL puede detectar endotoxinas en sangre con un rango de 0.005 a 0.0005 ng/ml nanogramos/mililitros (9).

También se ha demostrado que el LAL tiene valor pronóstico en pacientes con sepsis a Gram-negativos. (10)
En un estudio se encontró que la mortalidad fué 2 veces mayor en pacientes en quienes se detectó endotoxemia por el test de Limulus, que en aquellos en quienes únicamente presentaron bacteremia, correlacionándose también a casos con SCIV en el grupo de pacientes con

LAL positivos; pues se encontraron valores disminuidos de fibrinógeno y complemento (10).

METODO:

La reacción es capaz de detectar pequeñas cantidades como 0.0005 nanogramos por mililitro de endotoxina del plasma o suero humano. (8, 18)
La gelación del lisado de amebocito de Limulus (the horseshoe crab), es un sensitivo indicador de la presencia de variedad de endotoxinas. El lisado del amebocito es estable, la reacción entre lisado y endotoxinas es fácil para medir su producción; El promedio entre la reacción y el lisado de amebocito y de endotoxina depende de las altas concentraciones de endotoxina (8, 18).

Existe otro test de Thomas (17) que detecta endotoxina circulante, pero su mayor limitante y desventaja ante el LAL es que no detecta menos de 1 ng (nanogramos) por ml. de plasma, y por el tiempo, equipo y personal que es requerido para largas escalas de ensayo en la clínica (17).
El test de Limulus da resultados estables en 90 minutos. Este hecho con modificaciones de Limulus hizo posible la obtención fiable y determinaciones cuantitativas de endotoxina en plasma de humanos. Datos adicionales han demostrado que el test es específico para endotoxinas, no detecta toxinas por lo que no da falsos positivos. (17)

El lisado obtenido del amebocito Limulus polipheus de el cangrejo hembra de forma de herradura adquiere la forma del gel o gelatinoso después de la adición de la endotoxina bacteriana.
En contraste a las bacterias Gram-negativas, los microorganismos viables Gram-positivos no causan gelación del lisado, ocasionalmente el peptidoglucano aislado de las paredes celulares de varios organismos Gram-positivos pueden inducir la reacción, sin embargo, la actividad del peptidoglucano es de 1,000 a 400,000 veces menor que la del lipopolisacárido de Escherichia coli (endotoxina). Después de la exposición a la lisozima, el peptidoglucano no produce una gelación más larga del lisado del amebocito (21).

OTRAS APLICACIONES DEL METODO:

El equipo parenteral de los fluidos intravenosos puede contaminarse con bacterias Gram-negativos durante su uso y resultar una situación amenazante para la vida del paciente; el ensayo in vitro de Limulus para la endotoxina fué usado en dos pacientes a quienes los fluídos parenterales habían contaminado con Pseudomona seruginosa (21, 6).
Este test permite también una rápida detección de los fluídos intravenosos contaminados y demostrar endotoxemia en sueros, leche y agua.

Este método es el más susceptible conocido a la fecha para la detección de endotoxinas y puede ser aplicado fácilmente a la muestra de la solución parenteral. Ambas endotoxinas asociadas con las paredes intactas de las bacterias Gram-negativas viables y solubilizadas de endotoxina "libre" puede ser estudiada por el ensayo de Limulus que detecta la presencia de fluídos contaminados. (6, 3, 20, 9, 17)

CONCENTRACIONES:

+++ = Gelación sólida (Lo + reactivo)
++ = Gelación leve o incompleta (dudoso)
+ = Incremento de la opacidad o viscosidad (contaminación).
- = (No reactivo) (21).

FACTORES QUE PUEDEN ALTERAR LA PRUEBA:

Altas concentraciones de Calcio, Penicilina semi-sintética, Tetraciclinas, Dexametasona, Trombina, Trombo plastina, Polirriboinosímico, Polirribositidilico (Poli I) (Poli C), Poli U), (Poli A), Ribonucleasa y el Clorofor mo.
(Todas las anteriores pueden alterar el test de Limulus y dar resultados reactivos) (4).

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES:

Reactivos del test de Limulus; y 51 muestras sanguíneas de pacientes pediátricos ingresados al Hospital Roosevelt.

METODOLOGIA:

A) El presente estudio está constituido por 51 pacientes consecutivos de recien ingreso con sospecha de sepsis, a la sala de Cuidados Intensivos y otros servicios del departamento de pediatría del Hospital Roosevelt y que previo su ingreso no recibieron ningún tratamiento contraindicado para el estudio, de lo contrario fueron descartados.

B) Se consideraron pacientes con sospecha de sepsis aquellos que presentaron varias de las siguientes características: Anorexia, poco aumento de peso, letargo e inquietud, inestabilidad térmica (hipotermia - hipertermia), dificultad respiratoria, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez, cianosis e ictericia, hemorragia con erupciones petequiales.

C) Se consideró paciente no septico a cualquier otro caso que excluyó todos los signos anteriores.

D) Se realizaron las pruebas de laboratorio, para confirmación o descartar el diagnóstico de sepsis tales como: Hemocultivo, Frote periférico, Hemogra

ma, Líquido cefalorraquídeo, Coprocultivo, Urocultivo.

E) Para procesar el test de Limulus se requirió de 4 ml. de suero de cada paciente; dichos pacientes no necesariamente deberían estar febriles.

F) Los especímenes se obtuvieron al mismo tiempo que se venipuncionó al niño por otros estudios que para su buen manejo le fueron indispensables.

G) La muestra de sangre solamente se obtuvo cuando no existían otros exámenes de mayor prioridad para el manejo clínico (limitado por la cantidad de sangre a colectar).

INFORMACION TECNICA("DIFCO") PARA LA INVESTIGACION SE UTILIZA: (3)

1 vial de pirotest (endotoxina)
5 viales de pirotrol (control positivo) ng/ml.
5 viales de pirotrol (control negativo)
* Tubos de ensayo estériles con volumen de 15 a 20 ml. para diluciones de endotoxina.
* Agua esterilizada para preparar diluciones adicionales de endotoxina.
* Tubos de ensayo apirógenos de 10 x 75 mm para la prueba.
* Pipetas estériles de 1.0 y 10.0 ml. para realizar el pirotest, el pirotest positivo control, para preparar las diluciones de endotoxina y llevarlas a cabo.
* HCL 0.1 N y NaOH 0.1 N, apirogenoso para que el PH sea ajustado (en las muestras)
* Un agitador tipo vortex
* Un baño de agua serológico a 37° C.
* Parafilm
* Horno de aire caliente con capacidad calorífica de 250° C. para apirogenar la cristalería. (3)

PROCEDIMIENTO:

1. Se hizo asepsia en el punto de la venipuntura con una solución preparada a base de yodo y alcohol al 0.05%.

2. Se extrajo la sangre con una jeringa plástica estéril libre de pirógenos, conteniendo heparina (75 U. por ml. de sangre).

3. Se separó el plasma mediante centrifugación.

4. Las muestras se analizaron inmediatamente, o caso de no poderlas procesar se almacenaron a 4°C.- sin límite de tiempo.

5. El plasma fué extraído con cloroformo por 1 hora para retener la toxina.

6. La emulsión se centrifugó por 12 minutos a 1100 revoluciones por minuto y removido con pipeta de Pasteur el sobrenadante.

7. Se utilizó una micropipeta para medir 0.075 mililitros de ésta mezcla a la cuál se le añadió 0.075 mililitros del lisado del amebocito e incubándolo a - 37°C. por 1 hora.

8. Luego éstos tubos de vidrio se guardaron a temperatura del medio ambiente y se inspeccionaron.

9. La presencia de viscosidad y coagulación se interpretó como la existencia de la endotoxina.

10. La floculación se consideró como resultado negativo.

TABLA 1

PARA LA ESTANDARIZACION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DEL PYROTEST, 50 TEST, Y PARA DETERMINAR LA COMPATIBILIDAD DEL PYROTEST CON LAS MUESTRAS A PROBARSE.

Tubos.	Al reconstruir una vía de pyrotrol positivo control - con 4 ml. de agua apirógena se obtiene.	volumen ml. agua apirógena para añadir a la columna 1.	concentración final de endotoxina.	endotoxina que se añade para la prueba del test.	pyrotest que se debe añadir	Resultado del gel con la endotoxina Difco sen - 0.0625 nl/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.	0.65	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.	6 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	-

Referencia: Difco Laboratorios. Lisado de los amebocitos de Limulus Información técnica No. 761 (3).

Cuadro No. 1

Comparación de casos confirmados con la susceptibilidad del Test de Limulus en pacientes evaluados con sospecha de sepsis en la sala de pediatría del Hospital Roosvelt.

Probabilidad del test de Limulus en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	%del total de pacientes	No. de casos de LAL positivos y %
0 - 6m	42	82.35	31 (83.79 %)
6m 1d - 12m	6	11.76	4 (10.9 %)
12m 1d - 19m	3	5.89	2 (5.41 %)
Total	51	100%	37 (100%)

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala, Febrero 84 a mayo 1984.

Cuadro No. 2

Comparación de casos confirmados por "Hemocultivo y test de Limulus" de pacientes evaluados con sospecha - de sepsis en la sala de pediatría del Hospital Roosevelt.

Probabilidad del Hemocultivo en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	Total de casos Hemocultivo positivos
0 - 6m	42	5
6m 1d - 12m	6	1
12m 1 d - 19m	3	1
Total	51	7

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero a Mayo 1984.

Cuadro No. 3

Comparación de casos confirmados por "Coprocultivo y test de Limulus" de pacientes evaluados con sospecha de sepsis en la sala de pediatría del Hospital Roosevelt.

Probabilidad del Coprocultivo en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	Total de casos coprocultivo positivos
0 - 6m	42	3
6m 1 d - 12m	6	2
12m 1d - 19m	3	0
Total	51	5

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero 84 a Mayo 1984.

Cuadro No. 4

Comparación de casos confirmados por "Líquido cefalorraquideo y test de Limulus" de pacientes evaluados con sospecha de sepsis en la sala de pediatría del Hospital Roosevelt.

Probabilidad del Líquido cefalorraquídeo en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	Total de casos LCR. positivos
0 - 6m	42	3
6m 1d - 12m	6	1
12m 1d - 19m	3	0
Total	51	4

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero 84 a Mayo 1984.

Cuadro No. 5

Comparación de casos apoyados por "Frote periférico y test de Limulus" de pacientes evaluados con sospecha de sepsis en la sala de pediatría del Hospital Roosevelt.

Probabilidad del Frote periférico en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	Total de casos patológicos de F.P. y %
0 - 6m	42	28 (93.34 %)
6m 1 d - 12m	6	1 (3.33 %)
12m 1 d - 19m	3	1 (3.33 %)
Total	51	30 (100 %)

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero 84 a Mayo 1984.

Cuadro No. 6

Comparación de casos confirmados por "Urocultivo y test de Limulus" de pacientes evaluados con sospecha de sepsis en la sala de pediatría del Hospital Roosevelt.

Probabilidad del Urocultivo en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	Total de casos Urocultivos patológicos
0 - 6m	42	9
6m 1 d - 12m	6	1
12m 1 d - 19m	3	3
Total	51	13

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero 84 a Mayo 1984.

Cuadro No. 7

Comparación de casos apoyados por "Hemograma y test de Limulus" de pacientes evaluados con sospecha de sepsis en la sala de padiatría del Hospital Roosevelt.

Probabilidad del Hemograma en pacientes con septicemia clínica

Edad	No. de pacientes con septicemia clínica	No. de casos de Hemograma * patológicos y %
0 - 6m	42	28 (82.36 %)
6m 1d - 12m	6	2 (5.88 %)
12m 1d - 19m	3	4 (11.76 %)
Total	51	34 (100 %)

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero 84 a Mayo 1984.

* Hemograma positivo los que tuvieron desviación a la izquierda.

Resultados de pruebas de laboratorios en pacientes con septicemia clínica

Edad	LAL +		Hemocultivos +	Coprocultivos +	LCR +	F.P. +		Urocultivos +	Hemogramas +	
	No.	%	No.	No.	No.	No.	%	No.	No.	%
0 - 6m	31	83.78	5	3	3	28	93.34	9	28	82.36
6m 1d-12m	4	10.9	1	2	1	1	3.33	1	2	5.88
12m 1d-19m	2	5.41	1	0	0	1	3.33	3	4	11.76
Total	37	100%	7	5	4	30	100%	13	34	100%

Fuente: Boleta de recolección de datos Guatemala Febrero 84 a Mayo 1984.

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Fueron estudiados un total de 51 pacientes; manejados con impresión clínica de sepsis, en los diferentes servicios del departamento de pediatría del Hospital Roosevelt.

Siendo éstos comprendidos entre las edades de: 0 a 19 meses; de los cuales fueron: 32 pacientes masculinos; y 19 femeninos. De acuerdo a los casos confirmados de sepsis la incidencia es mayor entre las edades de 0 a 6 meses.
Los resultados del total de pacientes estudiados fueron los siguientes: 37 pacientes con respuesta reactiva al test de Limulus; y 14 no reactivos a endotoxinas.

A todos los pacientes estudiados se les efectuaron los exámenes de laboratorio siguientes: Hemograma - completo, Frote periférico, Hemocultivo, Líquido cefalorraquídeo, Coprocultivo y Urocultivo.

Es importante señalar que casi todos los exámenes de laboratorios patológicos si concuerdan con el test de Limulus reactivos a endotoxinas. Al analizar los hemocultivos encontramos únicamente 7 positivos, confirmándose el diagnóstico de sepsis, siendo en su mayoría gérmenes Gram-negativos dentro de los que se aislaron: Pseudomonas aeruginosa 3; Klebsiella pneumoniae 2; - Enterobacter freundi 1; y únicamente un caso para Staphyloccus aureus Siendo éste no reactivo al test de Limulus. Lo cuál nos confirma que el test es útil para la detección de endotoxinas de bacterias Gram-negativas - solamente.

Consideramos que la mayoría de pacientes con hemocultivos negativos se debió posiblemente a la poca virulencia del germen o bien factor técnico del procesamiento del hemocultivo, y para los casos del Líquido cefalorraquídeo, Urocultivo y Coprocultivo no necesariamente tenían que estar positivos ya que la mayoría de niños por arriba del período neonatal localizan las infecciones sin que éstas se diseminen a diferentes tejidos.

Es importante resaltar que de los 37 test de Limulus reactivos la inmensa mayoría fueron detectados en pacientes de 0 a 6 meses de edad (31 casos para un total del 83%), fenómeno que nos indica que entre más pequeño es el paciente más susceptible es infectarse especialmente con germen Gram-negativos. Así podemos ver también que a mayor edad hubo menor reactividad al test de Limulus.

De todas las pruebas de laboratorios efectuadas como ayuda diagnóstica a sepsis el que mostró mayor correlación con el test de Limulus fué el Frote periférico encontrándose un total de 30 casos con datos como granulación tóxica vacualización de segmentados, Burr Cells, y desviación a la izquierda.

Al analizar los cuadros 4, 5, y 6 que corresponden a Urocultivo, Coprocultivo, y Líquido cefalorraquídeo vemos que la mayor parte de casos positivos corresponden a los Urocultivos encontrándose 9 positivos para un 26% del total; mientras que el Coprocultivo y el Líquido cefalorraquídeo apenas un 6 y 7 % respectivamente positivos, concluyéndose para éste estudio que el foco de infección primario más frecuente para septicemia fueron las vías urinarias.

Es también importante señalar que la positividad de los exámenes anteriormente descritos se encontró en niños menores de 6 meses y que no hubo una relación directa entre éstos laboratorios.
En los pacientes estudiados presentaron un hemograma con desviación a la izquierda, 34 casos de los cuales 17 fueron reactivos al test de Limulus.

Resultados obtenidos:

Test de Limulus:	37 patológicos y 14 negativos
Hemocultivos:	7 patológicos y 44 negativos
Hemograma:	34 patológicos y 17 normales
Frote Periférico:	30 patológicos y 21 normales
Líquido cefalorraquídeo: ..	4 patologícos y 47 normales
Urocultivos:	13 patológicos y 38 negativos
Coprocultivos:	5 patológicos y 46 negativos

De los 51 pacientes que entraron al estudio fallecieron 13 (25.4%) con diagnóstico de sepsis.
Es de hacer notar que la mayor mortalidad, se encontró en pacientes con test de Limulus positivos con un 100%; lo que nos confirmó que la endotoxemia es de peor pronóstico que en aquellos pacientes que solo tienen bacteremia. Es posible suponer que los 14 pacientes con test de Limulus negativo únicamente presentaron bacteremia transitoria (que no pudimos demostrarla por el hemocultivo) y no endotoxemia, porque no todos los pacientes con septicemia a Gram-negativos desarrollan endotoxemia. El test de Limulus no ocasiona falsos negativos ya que todos los pacientes con hemocultivos positivos a gérmenes Gram-negativos mostraron reactividad al LAL.

CONCLUSIONES

1. Se confirmó mediante el test de Limulus un alto índice de diagnósticos de pacientes con septicemia en diferentes servicios de pediatría del Hospital Roosevelt.

2. Este estudio demostró que el método es rápido, sensillo, prometedor, barato y confiable; observándose la característica gelación en los casos - con respuesta en un período de 90 minutos.

3. Se considera que para laboratorio diagnóstico el test de Limulus, que se había propuesto con anterioridad estadísticamente tiene resultados significativamente útiles, teniendo ventajas sobre los cultivos. Siendo su única desventaja la no identificación del germen.

RECOMENDACIONES

1. Este método debería utilizarse en todos aquellos casos de pacientes que tienen sospecha de sepsis especialmente en recién nacidos que en su gran mayoría se debe a bacterias Gram-negativos.

2. Se recomienda que su uso sea como apoyo al criterio clínico de septicemia y de ésta manera poder instaurar un tratamiento temprano y óptimo a los pequeños niños que presentan septicemia.

3. Comparado con otros medios diagnóstico de más costo que se usan en el Hospital Roosevelt, el test de Limulus resulta ser más accesible y por ende debiera extenderse su empleo.

RESUMEN

Fué realizada la investigación para detectar endotoxinas en sangre de pacientes con sospecha de sepsis mediante el test de Limulus.

El estudio consistió en el examen de un total de 51 muestras sanguíneas de pacientes pediátricos pertenecientes al Hospital Roosevelt, además se obtuvieron otras pruebas de ayuda diagnóstica para ser comparadas al test de Limulus.

Al ser procesadas las muestras sanguíneas en bacteriología los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios para la prueba: 37 pacientes (72.5%) reactivos; y 14 (27%) no reactivos para endotoxinas; pudiéndose observar un índice alto de pacientes con diagnóstico de septicemia confirmado por éste método.

Estudio prospectivo realizado durante 3 meses consecutivos de Febrero a Mayo de 1984.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Carrillo, J.N. **Síndrome de coagulación intravascular.** Tesis (Médico y Cirujano-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1979. 35p.

2. Dahinden, C. **et al.** Granulocyte activation by endotoxin. **J Immunol** 1983 Feb; 130(2):857-862

3. Difco Laboratories. Limulus amebocyte, LAL metodology. Detroit, Michigan, 1982. 8p.

4. Elin, R. J. **et al.** Nonspecificity of the Limulus amebocyte lysate test: positive reactions with polynucleotides and proteins. **J Infect Dis** - 1973 Sep; 128(3):349-352

5. Flores, J. de J. **El hemocultivo.** Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1979. - 46p.

6. Jorgensen, H.J. **et al.** Rapid detection of contaminated intravenous fluids using the Limulus in vitro endotoxin assay. **Appl Microbiol** 1973 Oct; 26(4):521-524

7. Kaplan, S.L. Endotoxin shock. **Texbook of pediatric** infectious diseases. Philadelphia, Saunders, 1981. pp. 507-511

8. Levin, J. **et al.** Detection of endotoxin in human-blood and demostration of an inhibitotor. J - **Lab Clin Med** 1970 Jun; 75(6):903-910

9. Levin, J. **et al.** Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to gram-negative - bacteria. **N Engl J Med** 1970 Dec 10; 283(24): 1313-1316

10. Levin, J. **et al.** Gram-negative sepsis: detection of endotoxemia with the Limulus test. **Ann intern Med** 1972 Jan; 76(1):1-7

11. Nandan, R. **et al.** An improved in vitro pyrogen test: to detect picograms of endotoxin contamination in intravenous fluids using Limulus amoebocyte lysate. **J Lab Clin Med** 1977 Apr; 89(4):910-918

12. Noordwijk, J.V. **et al.** Comparison of the Limulus amebocyte lysate (LAL) test with the rabbit test: false positives and false negatives. **Dev Biol St** 1977 Jan; 34(1):39-43

13. Nelson, G.H. **El test de limulus en la detección de endotoxinas gram-negativas en alimentos.** Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1984. 36 p.

14. Nossel, H.L. Trastornos congénitos de los factores de la coagulación sanguínea. **En: Medicina interna de Harrison** 5a. ed. México, **Prensa médica,** 1979 tomo II (2052-2053)

15. Organización Panamericana de la Salud. Las condiciones de la salud en las Américas 1977-1980. Washington, 1982. (pp.207-212, 215, 347-348, 383) (Publicación científica No. 421)

16. Pieroni, E.R. **et al.** A simple method for the -- quantitation of submicrogram amounts of bacterial endotoxin **Pro Soc Exp Biol Med** 1970-Oct; 133(3):790-794

17. Reinhold, B.R. **et al.** A techinique for quantitative measurement of endotoxin in human plasma. **Proc Soc Biol Med** 1971 May; 137(1): 334-340

18. Rojas, R.R. **et al.** The Limulus coagulation test for endotoxin a comparation with other assay methods. **Proc Soc Exp Biol Med** 1969 Nov; 132(2):599-601

19. Vasquez, E. **Choque endotoxico post aborto.** Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1982

20. Vogel, N.S. **et al.** Endotoxin induced T linphocyte proliferation. **J Immunol** 1983 Apr; 130 (4):1774-1779

21. Wildfeuer, A. **et al.** Investigations on the especificity of the Limulus test for the detection of endotoxin. **Appl Microbiol** 1974 Nov; 28(5): 867-871

22. Yin, E.T. Endotoxin, thrombin, and the limulus-amebocyte lysate test. **J Lab Clin Med** 1975 Sep; 86(3):430-434

Vo Bo

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

ANEXOS

CRITERIO DE SEPSIS

(HOSPITAL ROOSEVELT)

* Parámetros y puntaje:		Puntos
1.	Infección materna reciente (diarrea, infección urinaria, I.R.S., etc.)----------	1 Pts.
2.	Fiebre materna.----------	3 "
3.	Manipuleo (tactos vaginales, comadrona).	2 "
4.	Ruptura prolongada de membranas (mayor de 24 horas)	2 "
5.	Líquido amniótico fétido.----------	3 "
6.	Parto de condiciones sépticas (calle, ambulancia, etc.)----------	2 "
7.	Trabajo de parto prolongado (primigesta más de 24 horas, multípara más de 12 horas.)----------	1 "
8.	Premadurez o bajo peso.----------	2 "
9.	Reanimación.----------	2 "
10.	Meconio en traquea.----------	2 "

b). Conducta:

1. Observación. ---------- 0 - 3 Pts.

2. Observación y cultivo de (sangre y LCR)---------- 4 - 6 "

3. Observación, cultivo y tratamiento. --- 7 - ↑ "

4. Los parámetros deben correlacionarse con la clínica, en especial cuando el puntaje es bajo para el recién nacido que luce enfermo.

CRITERIOS DE SEPSIS

(HOSPITAL GENERAL "SAN JUAN DE DIOS")

Recién nacidos:

1. Ruptura prematura de membranas > de 24 horas de evolución.
2. Infección materna documentada.
3. Fiebre materna con amioitis.
4. Nacidos en casa sin historia documentada.
5. Diarrea.
6. Infección en cualquier sistema.
7. Leucopenia.
8. ↑ Velocidad de sedimentación.
9. Apnea.
10. Problemas neurológicos.

Menores de 2 meses:

- Diarrea
- Hipotermia
- Hipoglicemia

- Infección interna (pulmonar, urinario etc.)
- Disminución de la succión.
- Hipoactividad (se asocian factores y causas)

Hasta 3 años de edad:

Que sean DPE

1. Factores de riesgo

A) Déficit peso, Edad ≥ 40%

B) Déficit peso, Talla ≥ 35%

C) Leucopenia o Leucocitosis

D) Hipotensión o fiebre

E) Taquicardia o bradicardia

F) Ictericia

G) Lesiones ulcerativas, externas en piel

H) Infección en cualquier interna (asociar factores de riesgo).

SE PRESENTARA UNA LISTA DE PRECIOS COMPARATIVOS ENTRE EL TEST DE LIMULUS EN RELACION A OTROS CULTIVOS A NIVEL DE TANTO LABORATORIOS PRIVADOS COMO DE UNA INSTITUCION PUBLICA COMO LO ES EL HOSPITAL ROOSEVELT.

COSTOS DE LABORATORIOS

Instituciones	Privado	público
Hemocultivos:	Q.7.00	Q.3.85
Coprocultivo:	4.50	4.51
Urocultivo:	4.50	3.85
Hemograma:	5.00	
Frote periférico:	4.00	
Líquido cefalorraquídeo:	7.00	
Test de Limulus:	4.10	

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS

DE LA SALUD

(C I C S)

RME:

Dr. Luis F. Meneses
ASESOR

Dr. César Agreda.
ASESOR

SATISFECHO:

Dr. César Lemel González C.
REVISOR

ADO:

DIRECTOR DEL CICS

IMPRIMASE:

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

Guatemala, 8 de Octubre de 1984

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
U S A C
CICLO LECTIVO 1984
DECANO 82 - 86
Dr. Mario René Moreno Cámbara
GUATEMALA, C. A.

onceptos expresados en este trabajo
esponsabilidad únicamente del Autor.
amento de Tesis, Artículo 44).