

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS**

**EL TEST DE LIMULUS EN LA DETECCION DE
ENDOTOXINAS GRAMNEGATIVAS EN ALIMENTOS**

GIOVANNI HORACIO NELSON AZURDIA

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

Las endotoxinas son sustancias que se encuentran intracelularmente en muchas bacterias gramnegativas, especialmente en bacilos entéricos, que al ser liberadas estas sustancias de la célula bacteriana o por lisis - de la misma, tienen la variedad de causar efectos fisiopatológicos en el hombre.

El interés principal de esta investigación, se basó en el uso de una nueva prueba diagnóstica para la detección de estas endotoxinas gramnegativas, como lo es el test de lisado de los amebocitos de *Limulus*. Para la cual se tomó como muestra, los alimentos obtenidos de las ventas públicas cercanas a el hospital General (San Juan de Dios) Roosevelt y la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Al realizar el estudio, se tomaron 50 muestras, realizando el procesamiento de éstas, en el laboratorio de la Dirección General de Servicios de Salud Pública, donde se efectuó primariamente un estudio bacteriológico completo, para detectar la presencia de bacterias gramnegativas, y así posteriormente aplicar la prueba de *Limulus* para determinar su sensibilidad a la presencia de endotoxinas.

El estudio fue realizado durante los meses de noviembre 83 a febrero de 1984.

DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

La presente investigación, se realizó en el laboratorio de la Dirección General de Servicios de Salud Pública, entre los meses de noviembre 83 a febrero de -- 1984. Tomándose como base 50 muestras de alimentos obtenidos de ventas públicas cercanas a el hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la Universidad de - San Carlos de Guatemala.

A pesar de que se cuenta con lineamientos generales, mediante el uso de procedimientos sanitarios, para evitar la contaminación en los alimentos, aún en nuestro medio se observa la alta frecuencia de enfermedades transmisibles causadas por microorganismos entéricos patógenos, principalmente gramnegativos.

Con el presente trabajo se trató de evaluar la -- efectividad de un nuevo método de laboratorio, como lo es el test de lisado de los amebocitos de Limulus, siendo una prueba que se utiliza para detectar la presencia de endotoxinas en los productos biológicos y parentéricos, así como en los materiales básicos a partir de los cuales se preparan esos productos, y que además es una prueba específica, sencilla, rápida y la más sensible - que existe para detectar estas endotoxinas. (4)

REVISION BIBLIOGRAFICA

En el año de 1902 Loeb, fué el primero en hablar de la relación entre los linfocitos sanguíneos y los procesos inflamatorios en el cangrejo *Limulus Polyphemus*, sin embargo no fué hasta 1964 que Levin y Bong mostraron que la sangre del *Limulus Polyphemus* se coagula en presencia de endotoxinas bacterianas gramnegativas. Más tarde, ellos reportaron que la porción sensible a la endotoxina se encontraba en el amebocito y no en la fracción líquida de la sangre. Estas publicaciones conjuntamente con otras hechas por Rojas Corona et. al, Fine y Reinhold son las responsables primarias del creciente interés en la utilización de la prueba LAL para detectar endotoxinas en los materiales básicos que se utilizan en la preparación de las soluciones parentéricas y biológicas.

El uso de esta prueba recibió un empuje adicional cuando Cooper et. al. determinaron su superioridad en comparación con la prueba USP del conejo tan ampliamente utilizada, y por lo mismo, Cooper etc. al; cuando reportaron el uso de la prueba LAL para detectar endotoxinas en los productos radiofarmacéuticos y biológicos. En otro estudio, Fine et. al. presentaron que el calcio, hemoglobina, trombina, fase larga de especie de bacterias grampositivas, estreptolisinas, estreptoquinasa, estreptodornasa y toxinas de *Clostridium tetani*, también fueron negativos al test LAL. Por lo tanto la positividad del LAL es considerada específica a la presencia de endotoxinas de bacterias gramnegativas. (4,5, 10,14).

LA PRUEBA LAL

La prueba LAL, es la más sensible que existe para detectar las endotoxinas. Es un procedimiento "in vitro" en donde se utiliza el lisado que se prepara con los amebocitos del cangrejo (Horseshoe-Crab), *Limulus Polyphemus*.

La prueba es sencilla, específica, rápida y poco costosa si se le compara con la prueba USP del conejo, para determinar pirógenos y es a lo menos, unas diez veces más sensible que la prueba del conejo. (4)

Se recomienda la utilización de un control positivo, el pyrotrol positivo control, y de un control negativo, el pyrotrol negativo control. También se recomienda que cuando se esté probando un producto por primera vez con LAL Pyrotest, dicho producto y el agua debe estar completamente libre de pirógenos. Brevemente la prueba LAL consiste en añadir 0.1 ml. de pyrotest, y 0.1 ml. de la solución problema, mezclándose suavemente, se incuba en un baño de María a 37° C. durante una hora sin tocarlos para nada. Se invierten los viales a 180° individualmente y se observan a ver si forma un gel que permanece intacto y el cual indica la presencia de sustancias pirógenas en la solución problema. (4)

LAS ENDOTOXINAS

Se encuentran las endotoxinas en las bacterias gramnegativas y se presentan en microorganismo patógenos y no patógenos, los síntomas observados al inyectar estas substancias en animales de laboratorio incluyen: fiebre, diarrea, parálisis de los miembros, trastorno del metabolismo de los hidratos de carbono y degeneración de los vasos sanguíneos las endotoxinas produ-

cen los mismos síntomas generales, sin importar la especie de microorganismo de que provengan. Las endotoxinas se diferencian claramente de las exotoxinas ya que se encuentran intracelularmente en muchas bacterias gramnegativas, especialmente en los bacilos entéricos, son termoestables a la ebullición en solución neutra, pero son destruidas por hidrólisis ácida débil, no son digeridas por enzimas proteolíticas. Parecen ser componentes estructurales de la célula bacteriana, representan el antígeno O y se encuentran cuando menos en su mayor parte, en la membrana celular de la bacteria. (1,2,3,7).

La bacteria gramnegativa produce una única envoltura de tres capas, esta consiste en una membrana externa cubriendo una delgada capa de péptidoglicano, la cual puede estar separada por un espacio periplasmático del interior de la membrana citoplasmática. La membrana externa contiene características lipopolisacáridas de la bacteria gramnegativa, también contiene una barrera la cual le confiere resistencia a muchos antibióticos, químicos y detergentes. La membrana externa está compuesta de lipopolisacáridos, proteínas la cual juntamente incluye cerca de un 80% de su envoltura. Las endotoxinas tienen propiedades lipopolisacáridas que son debidas a la porción glucolípida llamada "Lípido A". (8,11)

Entre las alteraciones producidas por las endotoxinas, se observan los siguientes signos como prominencia ya sea clínica o experimentalmente: fiebre leucopenia, hipotensión, perfusión alterada de órganos, activación de C-3 y de la cascada del complemento, efecto sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, fenómeno de Shwartzman, fallecimiento como resultado de disfunción masiva de órganos, otras propiedades, se conoce un efecto abortivo de los LPS, lo cual talvés explique es

te fenómeno que se observa en los seres humanos, en período de gestación que adquieren una infección por gram negativos. Es interesante señalar que se ha observado que las endotoxinas poseen un efecto necrótico hemorrágico sobre los tumores malignos, propiedad que sin embargo no ha sido aprovechada en terapéutica. (9,12)

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

- 50 ventas públicas ubicadas a los alrededores de el hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la USAC.
- Muestras de alimentos de las ventas públicas ya mencionadas.

RECURSOS

- El laboratorio de la Dirección General de Servicios de Salud Pública.

Instrumental utilizado en laboratorio:

- Cajas de petri con medios de cultivos de: tergitol 7, selenito y manitol sal.
- Tubos de ensayo de 10 x 75 mm. con medios de identificación bioquímica: kligler, LIA (lisina hierro agar), citrato, malonato y MIO (movilidad-indol-orнитina) y otros según necesidad.
- Pyrotest (Lisado de los amebocitos de Limulus)
 - 1 vial, pyrotest, 50 viales.
 - 5 viales, pyrotrol positivo control 100ng/ml.
 - 5 viales, pyrotrol negativo control.
- Tubos de ensayo apirógenos, de 20 a 25 ml. de volumen para preparar las diluciones de endotoxina.

- Agua apirógena para preparar las diluciones adicionales.
- Tubos de ensayo apirógenos de 10 x 75 mm. para llevar a cabo la prueba.
- Pipetas apirógenas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml. para efectuar la prueba reconstruyendo el pyrotest, el pyrotrol positivo control y las diluciones necesarias.
- Horno de aire caliente con capacidad calorífica de 250° para apirogenar la cristalería.
 - Agitador tipo vortex.
 - Baño de María ajustable a 37°C.
 - Parafilm.

METODOLOGIA

La metodología consistió en tomar por muestreo aleatorio 50 alimentos que se obtuvieron de 50 ventas públicas ubicadas en los alrededores de el Hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la USAC. Todas las muestras fueron procesadas en el laboratorio de la Dirección General de Servicios de Salud Pública, donde se realizó lo siguiente:

Proceso bacteriológico:

Todas las muestras fueron sembradas en los cultivos de: tergitol 7 selenito, manitol y de las cuales se identificaron una variedad de colonias, y las sospechosas de ser gramnegativas se sembraron nuevamente en me-

dios de identificación bioquímica: kligler, lisina, citrato, urea malonato y MIO (movilidad-indol-ornitina).

Técnica empleada para el test de limulus:

- Se estandarizaron todos lo pH de las muestras.
- Se preparó el pyrotrol positivo control, agregándole 4 ml. de agua apirógena, el pyrotest LAL. con 5,2 ml. de pyrotrol negativo control (agua apirógena).
- Seguidamente en la tabla I se indica como se prepararon y efectuaron las diluciones del pyrotrol positivo control, para estandarizar la sensibilidad del pyrotest; para determinar la compatibilidad con los productos de la prueba y probar los mismos. (ver tabla I).

TABLA I

PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL PYROTEST, 50 TEST, Y PARA DETERMINAR LA COMPATIBILIDAD DEL PYROTEST CON LOS PRODUCTOS A PROBARSE

Tubo	Al reconstruir un vial de pyrotrol positivo control con 4 ml. de agua apirógena se obtiene	volumen ml. agua apirógena para añadir a la columna I	concentración final de la dotoxina.	endotoxina que se añade para la prueba del test.	pyrotrol que se debe añadir	Resultado del gel con la endotoxina Difco sen. 0.0625 ng/ml.
1	25 ng/ml	-	25	0.1	0.1	+
2	1 ml, 25 ng/ml	9 ml	2.5	0.1	0.1	+
3	4 ml, 2.5 ng/ml	6 ml	1.0	0.1	0.1	+
4	5 ml, 1.0 ng/ml	5 ml	0.65	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 (4)

Compatibilidad del pyrotest (LAL):

Para determinar la compatibilidad del pyrotest, repiten las mismas diluciones explicadas anteriormente pero utilizando la muestra a estudiarse en lugar del pyrotrol positivo control. (4)

Explicación de la tabla I:

- Para determinar la sensibilidad del pyrotest, 50 test, se removieron los sellos de aluminio y los tapones de goma, utilizando fórceps estériles, todo esto después de que los viales alcanzaron la temperatura ambiente.
- Se añade asépticamente 5.2 ml. de pyrotrol negativo control al pyrotest, 50 viales (LAL).
- En tubos de 10 x 75 mm. se añade 0.1 ml. en cada tubo, de pyrotrol positivo control preparado con agua apirógena empezando en la concentración de 0.016 hasta la 2.5 ng/ml.
- Se añade a un tubo adicional, 0.1 ml. de agua apirógena.
- Finalmente se añade 0.1 ml. de lisado reconstruido a todos los tubos.
- Se agita suavemente a todos los tubos hasta obtener una muestra homogénea.
- Se cubren todos los tubos con parafilm, y se colocan en la gradilla, en el baño de María a 37°C.
- Se dejan que permanezcan allí en el baño de María por 1 hora sin tocarlos, pasada la hora se invierten a 180°, uno a la vez y se observa la presencia de un gel que permanezca intacto.

- El punto final es la dilución más alta que permanece con un gel firme, la sensibilidad del pyrotest está habitualmente entre 0.032 y 0.25 con la endotoxina E. Coli del pyrotrol positivo control de Difco (4)

TABLA II

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

Mezcla de la prueba # de viales 50 test

Muestra 0.1 ml.

Pyrotest 50 vials 0.1 ml.

Explicación de la tabla II:

- Se dejó que todas las muestras alcanzaran la temperatura ambiente.
- Se añadió 0.1 ml. de cada muestra a los tubos de 10 x 75 mm. hasta completar las 50 muestras.
- Se añadió 0.1 ml. de pyrotest (LAL) ya reconstruido a las 50 muestras mezclándose suavemente, y se cubrieron con parafilm, para luego incubarlos en el baño de María a 37°C. por una hora sin tocarlos, pasada la hora, se invirtieron todos los tubos a 180° observándose la formación de geles firmes. (4)

RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se observó que hay un alto índice de contaminación en los alimentos vendidos en la calle, esto se atribuye principalmente a que: a) Las ventas públicas no cuentan con las medidas higiénicas sanitarias. b) Los alimentos la mayor parte del tiempo están expuestos a contaminación. c) Los alimentos siempre son manipulados sin previa limpieza adecuada de manos, considerando de manera importante los tres parámetros anteriores para lograr una mayor positividad a los cultivos de estos alimentos.

ESTANDARIZACION DE LA SENSIBILIDAD Y LA COMPATIBILIDAD DEL PYROTEST,
AL REALIZARSE LA PRUEBA CON LOS ALIMENTOS.
GUATEMALA NOVIEMBRE 83 A FEBRERO DE 1984

Tubo	Pyrotrol positivo control reconstruido con 4 ml. de agua apirógena	volumen (ml) agua apirógena para las diluciones de la columna 1.	concentración final de endotoxina ng/ml.	volumen (ml) endotoxina que se añadió para la prueba.	volumen (ml) pyrotest que se añadió (LAL)	resultado de la prueba del gel con endotoxina 0.25 Difco sen.	result. de la prueba del gel con endot. de la muestra (sen.) 0.032 ng/ml.
1	25 ng/ml	-	25	0.1	0.1	+	+
2	1 ml, 25 ng/ml	9 ml	2.5	0.1	0.1	+	+
3	4 ml, 2.5 ng/ml	6 ml	1.0	0.1	0.1	+	+
4	5 ml, 1.0 ng/ml	5 ml	0.5	0.1	0.1	+	+
5	5 ml, 0.5 ng/ml	5 ml	0.25	0.1	0.1	+	+
6	5 ml, 0.25 ng/ml	5 ml	0.125	0.1	0.1	+	+
7	5 ml, 0.125 ng/ml	5 ml	0.0625	0.1	0.1	+	+
8	5 ml, 0.0625 ng/ml	5 ml	0.032	0.1	0.1	+	+
9	5 ml, 0.032 ng/ml	5 ml	0.016	0.1	0.1	+	+
10	agua apirógena	-	-	0.1	0.1	-	-

Fuente: La prueba fué realizada en el laboratorio de la D.G.S.S. Obteniéndose las muestras de las ventas públicas cercanas a el hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la USAC.

Los resultados obtenidos en el laboratorio, al determinar la sensibilidad y la compatibilidad del pyrotest, (LAL), después de efectuarse las diluciones correspondientes según indica el cuadro # 1, para ambas pruebas se observó que la formación del gel para la prueba hecha con la endotoxina E. coli, pyrotrol positivo control, estuvo presente entre las concentraciones de 0.0625 y 0.25 ng/ml, mientras que la prueba realizada con la endotoxina de una Shigella flexneri, diagnosticada por cultivo de las muestras a probarse, estuvo entre 0.032 y 0.25 ng/ml. De acuerdo a estos resultados de la prueba de Limulus si funcionó, y no hubo inhibición de la misma estando compatible con la muestra a probarse.

CUADRO # 2

RESULTADOS OBTENIDOS DE CULTIVOS EN 50 MUESTRAS DE ALIMENTOS, EN COMPARACION CON LA SENSIBILIDAD DEL TEST DE LIMULUS. GUATEMALA NOVIEMBRE 83 A FEBRERO DE 1984.

PRUEBAS DX	CULTIVOS		TEST LAL	
	No. Casos	%	No. Casos	%
POSITIVOS	38	76%	35	70%
NEGATIVOS	12	24%	15	30%
TOTALES	50	100%	50	100%

Fuente: Alimentos obtenidos de ventas públicas cercanas a el hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la USAC.

De acuerdo a los resultados de este cuadro # 5, observamos que los cultivos presentaron una positividad de un 76% de las 50 pruebas efectuadas, así mismo el test LAL dió resultados positivos a un 70% de las pruebas, por lo que se ve una diferencia de un 6% entre las dos pruebas a favor de los cultivos.

CUADRO # 3

DIAGNOSTICO DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS EN ALIMENTOS, POR CULTIVOS, EN COMPARACION CON LA SENSIBILIDAD DEL TEST DE LIMULUS, GUATEMALA NOVIEMBRE 83 A FEBRERO DE 1984.

VENTA PUBLICA	ALIMENTO	#	PRUEBA LAL	DIAGNOSTICO
Ambulante	Carne molida	2	+	Klebsiella sp.
Ambulante	Enchilada	3	2	1 Shigella flexneri E. coli Enterobacter aglomerans.
Ambulante	Caldo frijol	1	1	0 Enterobacter aglomerans.
Ambulante	Atoles	5	3	2 E. coli Enterobacter aglomerans. Enterobacter cloacae
Ambulante	Chirmol	3	2	1 Klebsiella sp. Enterobacter cloacae
Ambulante	Guacamole	2	2	0 Enterobacter aglomerans Enterobacter cloacae

Fuente: Alimentos obtenidos de ventas públicas cercanas al Hospital General (San Juan de Dios).

Se puede observar que de las 16 muestras de alimentos obtenidas de estas ventas públicas, 13 (81.25%) tuvieron crecimiento bacteriano, en comparación con la prueba del test de limulus que 11 (68.75%) muestras fueron positivas. Así mismo se observó que la relación de los resultados de ambas pruebas fue la siguiente: de los casos positivos para las dos pruebas fueron 11, casos negativos en las dos 3, y casos con crecimiento bacteriana y reacción LAL negativa 2, observándose en ninguno cultivos negativos y prueba LAL positiva.

CUADRO # 4

DIAGNOSTICO DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS EN ALIMENTOS POR CULTIVOS,
EN COMPARACION CON EL TEST DE LIMULUS.
GUATEMALA NOVIEMBRE 83 A FEBRERO DE 1984

VENTA PUBLICA	ALIMENTO	No.	PRUEBA LAL		DIAGNOSTICO
			+	-	
-Ambulante	Atol	1	1	0	Negativo
-Ambulante	Chirmol	3	1	2	Enterobacter aglomerans Citrobacter freudi
-Ambulante	Recado carne	4	3	1	E. coli Enterobacter cloacae
-Ambulante	Picado rábano	2	2	0	Enterobacter aglomerans Citrobacter freudi
-Ambulante	Caldo frijol	1	1	0	Enterobacter cloacae
-Ambulante	Chuchito	1	1	0	Enterobacter aglomerans
-Ambulante	Guacamole	1	1	0	Citrobacter freudi
-Ambulante	Caldo res	2	2	0	Enterobacter cloacae Citrobacter freudi
-Ambulante	Longaniza	1	0	1	Enterobacter aglomerans Negativo

Fuente: Alimentos obtenidos de las ventas públicas cercanas al H. Roosevelt.

Según este cuadro #4, de las 16 muestras obtenidas de alimentos de las ventas públicas carcanas al hospital Roosevelt, 12 (75%) fueron positivas al cultivo, presentando crecimiento bacteriano, que en comparación con la prueba LAL también, 12 (75%) dieron positividad.

Al relacionar los resultados de este cuadro, hubo un número de casos positivos para ambas pruebas de 11, casos con crecimiento bacteriano y prueba LAL positiva.

Este último caso que solo fue positivo para la prueba LAL, se piensa que el alimento fue recalentado, destruyéndose así la bacteria pero no la endotoxina, siendo esta detectada por la prueba LAL ya que es muy sensible.

CUADRO # 5

DIAGNOSTICO DE BACTERIAS GRAMNEGATIVAS EN ALIMENTOS POR CULTIVOS, EN COMPARACION CON LA SENSIBILIDAD DEL TEST DE LIMULUS
GUATEMALA NOVIEMBRE 83 A FEBRERO DE 1984

VENTA PUBLICA	ALIMENTO	No.	PRUEBA LAL	DIAGNOSTICO	
			+		
Caseta	Guacamole	5	5	0	E. coli Enterobacter agglomerans Shigella flexneri Klebsiella ozaenae
Caseta	Caldo de res	5	3	2	E. coli Enterobacter hafniae Citrobacter freudi
Caseta	Recado carne	3	0	3	Negativos
Caseta	Caldo frijol	2	2	0	E. coli Enterobacter cloacae Enterobacter agglomerans
Caseta	Enchilada	2	2	0	Enterobacter hafniae E. coli
Caseta	Mixta	1	0	1	Enterobacter agglomerans

Según el cuadro 5, se observa que del grupo de 18 alimentos obtenidos de ventas carcanas a la USAC, dieron una positividad a los cultivos de 13 (72.22%) muestras de las cuales fueron sensibles al test LAL un número de 12 (66.67%) muestras, al establecer la relación de los resultados de ambas pruebas, casos positivos para las dos fueron 12, sin crecimiento bacteriano y prueba LAL negativa 5, con cultivo positivos y prueba LAL no sensible 1, que se cree que fue por habersele estabilizado el pH con hidróxido de sodio, (5) puede inhibirse la prueba.

CUADRO # 6

CORRELACION DEL TEST LAL, CON LOS HALLAZGOS EN LOS CULTIVOS. GUATEMALA NOVIEMBRE 83 A FEBRERO 1984

MICROORGANISMOS	CULTIVOS No. Casos	PRUEBA LAL	
		+	-
Enterobacter aglomerans	15	11	4
cloacae	10	9	1
hafniae	2	2	0
E. coli	9	9	0
Citrobacter freudi	5	4	1
Klebsiella sp.	4	4	0
Shigella flexneri	2	2	0
Negativos	12		15

Fuente: Muestras obtenidas de las ventas públicas cercanas al Hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la USAC.

Del grupo de microorganismos diagnosticados en las 50 muestras, se observa que de 27 casos positivos para Enterobacter, por cultivo fueron 15 de aglomerans, 10 de cloacae 2 para hafniae, siendo de estos positivos a la prueba LAL 11 para aglomerans, 9 para cloacae y los 2 de hafniae. De los otros microorganismos, Citrobacter freudi, Klebsiella sp. Shigella flexneri, fueron positivos en relación a los cultivos.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el grupo de muestras estudiadas, nos dió un alto índice de positividad diagnóstica, en los cultivos de un 76% y para el test de limulus de un 70%. Esto indica que existe un alto grado de contaminación en los alimentos por endotoxinas de bacterias gramnegativas, vendidos en la calle, atribuyéndose principalmente a que estas ventas públicas no cuentan con las medidas higiénicas sanitarias, y tampoco un control sistémico de portadores, y la mayoría no tienen la tarjeta de sanidad, que los requisitos para obtenerla son: tener una tarjeta reciente de RX de pulmones, el VDRL y el examen físico al obtenerla en el centro de salud. Pero posteriormente ya no se efectúa una vigilancia y control de las medidas higiénicas de las ventas donde se expenden estos alimentos, lo que hace que aumenten las enfermedades transmitidas por estas bacterias gramnegativas.

De acuerdo a otro estudio realizado en el hospital Roosevelt, sobre los microorganismos aislados en los cultivos efectuados en los alimentos distribuidos en este hospital, se observó que evidenciaban contaminación fecal, tanto para patógenos entéricos como microorganismos entéricos corrientes como E. coli, se aislaron en los alimentos. (13)

Según un estudio realizado en los Estados Unidos, sobre las enfermedades transmitidas por los alimentos, afirmó que la notificación de enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua empezó hace más de medio siglo, cuando las autoridades de salud estatales y locales, preocupadas ante la alta morbilidad y mortalidad por fiebre tifoidea y diarrea infantil, recomendaron que se investigaran. El informe de 1979 pudo confirmar

la etiología. En 69% de los brotes y el 92.3% de los casos confirmados estaban implicados agentes patógenos bacterianos entre ellos: Salmonella, Estafilococo aureus y Enterobacter cloacae. Entre los vehículos transmisores de los microorganismos, el más frecuente resultó ser la carne de res, y el agente patógeno más corriente asociado a ella fue el Clostridium perfringens, el jamón que estuvo asociado con Estafilococo, y la carne de cerdo con Trichinella spiralis.

En el informe de 1981 figuraron por primera vez como agente patógenos transmitidos por alimentos, el Enterobacter cloacae y el Estreptococo (Grupo G), finalmente afirman que convendría realizar trabajos más completos de caracterización de estos y otros posibles agentes patógenos transmitidos por alimentos. (6)

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios similares con el test de limulus en otras áreas del país, para establecer comparaciones entre ellas.
2. Incrementar el uso del test de limulus en nuestro medio como prueba diagnóstica de ayuda, a detectar la presencia de las endotoxinas de estas bacterias, así como a nivel hospitalario.
3. Que por medio de los procedimientos sanitarios, se efectúe una mejor vigilancia y control en lo que respecta a las condiciones higiénicas de las ventas públicas en general, para evitar así la contaminación de los alimentos, disminuyendo la transmisión de las enfermedades producidas por estos microorganismo entéricos patógenos.
4. Que por medio del ministerio de Salud, se haga hincapié en que todos los vendedores públicos posean la tarjeta de sanidad, ya que la mayor parte no cuenta con ella.
5. Que como requisito indispensable para otorgar la tarjeta de sanidad, el vendedor presente resultado de coprocultivo negativo.

CONCLUSIONES

1. Existe un alto índice de contaminación en los alimentos de las ventas públicas (76%).
2. La prueba del test de limulus es una prueba que detectó la presencia de endotoxinas, con una relación respecto a los cultivos de el 92.10%.
3. La prueba del test de limulus presentó 35 (70%) - muestras positivas con formación de gel.
4. La bacteriología demostró que 38 (76%) muestras positivas con crecimiento exclusivo de microorganismos gramnegativos.
5. Los microorganismos detectados por los cultivos - fueron: Enterobacter agglomerans, cloacae y hafniae, Citrobacter freudi, Klebsiella sp. y Shigella - flexneri.
6. El pyrotest LAL es factible de realizarse en nuestro medio.

RESUMEN

En la presente investigación, se determinó la sensibilidad del test de Limulus, en la detección de las endotoxinas de las bacterias gramnegativas en alimentos, que son principalmente patógenas en el hombre.

Se efectuó un estudio prospectivo de 50 muestras - de alimentos procedentes de ventas públicas cercanas a el Hospital General (San Juan de Dios), Roosevelt y la USAC. A las 50 muestras se les efectuaron dos pruebas - diagnósticas; bacteriológica y el test de Limulus.

En el grupo de las 50 muestras estudiadas por bacteriología, presentó una positividad de 38 (76%) para bacterias gramnegativas y 35 (70%) fueron positivas al test de Limulus dando una correlación de certeza de un 92.10% para la prueba en sí.

De acuerdo a los resultados anteriores ambas pruebas mostraron un alto porcentaje de positividad indicando en general, un índice elevado de contaminación de los alimentos caseros expendidos en la calle.

El período del trabajo fué entre los meses de noviembre 83 a febrero de 1984.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Brock, T. *Biology of microorganism*. New Jersey, -
Prentice-Hall 1970. 574p. (pp.422-23)
2. Burrows, W. *Tratado de microbiología*. 2a. ed. Mé-
xico, Interamericana, 1974. 575p. (pp.348-49).
3. Carpenter, P. *Tratado de microbiología*. 2a. Ed. Mé-
xico, Interamericana, 1969. 432p. (pp.209-210)
4. Difco Laboratories. *Limulus amebocyte lysate, LAL
methodology*. Detroit, 1982. 8p.
5. Elin, J., et al. Nonspecificity of the Limulus ame-
bocyte lysate-positive reactions whit polynucleo-
tides and proteins. *J. Infect Dis* 1973, Sep; 129
(3):349-352
6. Enfermedades transmitidas por los alimentos en Es-
tados Unidos de America. *Bol Of Sanit Panam* 1982,
Mayo; 92(5):449-54
7. Frobisher, M., et al. *Microbiología patológica*. -
5a. ed. México Interamericana, 1965. 467p --
(pp.186-187)
8. Joklik, W., et al. *Microbiology*. 16 th. ed. New -
York, Appleton Century-Croft, 1976. 215p. --
(pp.95-106).
9. Jawetz, E. y J. Melnick. *Manual de microbiología -
médica*. 6a. ed. México, Manual Moderno, 1975.631p.
(pp.236-51)

10. Noordwijk, V., et al. Comparison of the Limulus - test for endotoxin whit the rabbit test for piro-- gens. *J Biol Stand* 1977 Oct; 34(3): 39-43.
11. Peleczar, M. J., et al. *Microbiología*. 2a. ed. Madrid, Castilla 1965. 565p. (pp.235-36)
12. Rodriguez, L. Mecanismo de patogenicidad de los - microorganismos. Washington, OEA, 1975. 60p. - (pp.24-26)
13. Triquez, R. *Infección hospitalaria*. Tesis (Médico y Cirujano) Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, 1977. 32p.
14. Wildfeuer, A., et al. Investigations on the speci- ficity of the Limulus test of detections of endoto- xin. *Appl Environ Microbiol* 1974, Nov; 28(5): - 867-71

no ho
Guatemala

Universidad de San Carlos de Guatemala
 FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
 OFCA - UNIDAD DE DOCUMENTACION

CONFORME:

César Agreda
 Dr. César Agreda Godínez
 ASESOR.

Elma Villatoro
 Dra. Elma Villatoro
 ASESOR

César Agreda Godínez
 MEDICO Y CIRUJANO
 Colegiado No. 2746

SATISFECHO:

César León
 Dr. César León
 REVISOR.

APROBADO:

[Signature]
 DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD

IMPRIMASE:

[Signature]
 Dr. Mario René Moreno
 DECANO
 FACULTAD DE CIENCIAS
 U S A C .

Guatemala, 8 de mayo



FACULTAD DE CIENCIAS
 U S A C
 CICLO LECTIVO 19
 DECANO 82-83
 Dr. Mario René Moreno
 GUATEMALA, G.

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