

Utilidad de la prueba del *Limulus* en el diagnóstico de endotoxemia

DR. JUAN J. DÍAZ MIRANDA *

DR. JOSÉ L. BRAVO LLAMOSAS *

DR. JAVIER RAMÍREZ ACOSTA *

INTRODUCCION

LA determinación de endotoxinas circulantes, ha sido un problema común en la práctica médica, especialmente en aquellas circunstancias en las que el diagnóstico de endotoxemia, apenas se sospecha o se encuentra dudoso. El contar con un método rápido, sencillo y confiable, se hace imprescindible tanto para la confirmación del diagnóstico, como para la oportuna instalación del tratamiento, antes de que el paciente progrese hacia las etapas consideradas como irreversibles del estado de choque, además de la gran utilidad que representaría en su manejo, el conocer los títulos de endotoxina, su tiempo de aparición y las variaciones que éstas sustancias sufren dentro del organismo, permitiendo además, realizar consideraciones pronósticas, de la respuesta del enfermo al tratamiento instituido.

La propiedad del "*Limulus polyphemus*" fósil viviente perteneciente al género *Xi-*

phosureae, de presentar coagulación intravascular generalizada cuando los gérmenes Gram negativos o sus endotoxinas penetran dentro de su torrente circulatorio, ha sido propuesta recientemente como el mejor método de laboratorio para determinar estos lipopolisacáridos en el plasma de pacientes en choque séptico. La prueba tiene como base, la formación de un estado de "gel" cuando se ponen en contacto cantidades tan pequeñas como 1 ng. de endotoxina y un lisado, obtenido a partir del único tipo de células sanguíneas de dicho animal denominadas "amebocitos".^{1,2,3,4,5,6,7,8,9} Esta reacción por su naturaleza enzimática, es dependiente del pH y de la temperatura.¹⁰

El objeto del presente estudio es reportar las modificaciones realizadas a la técnica original de Levin y Bang y los resultados obtenidos con las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares, conocidos como cangrejos balloneta, (Fig. 1 y 2) fueron colecta-

* Unidad de Cuidados Intensivos,
Instituto Nacional de la Nutrición.

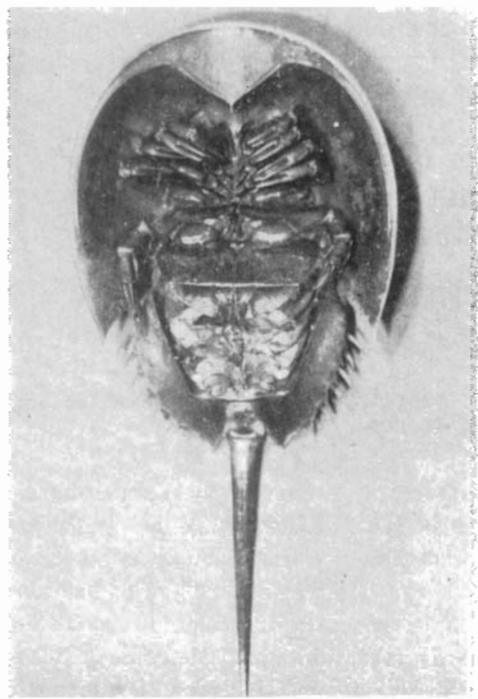


FIG. 1.—Vista dorsal del "Limulus Polyphemus" en la que se aprecia la unión del segmento cefálico (Prosoma) con el torácico (Opistosoma).

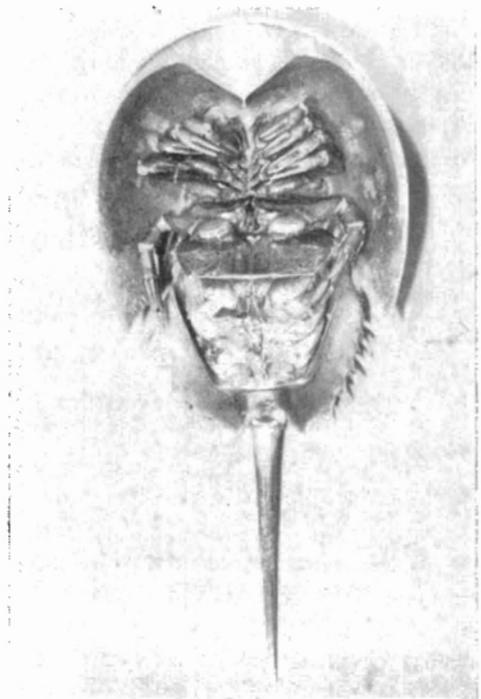


FIG. 2.—Vista ventral. Los 6 pares de patas en el Prosoma y el aparato respiratorio en el Opistosoma.

das en las costas del Estado de Campeche en diversas épocas del año. Se sangraron un total de 68 ejemplares para la obtención del lisado; el tamaño varió de 40 a 50 cm., el sexo no fue tomado en consideración, prefiriéndose ejemplares jóvenes a los muy grandes y viejos, supuestamente más contaminados de acuerdo a la técnica reportada por Levin y Bang con algunas modificaciones.

El material de vidrio fue siliconizado con silicones concentrados "Siliclad Clay y Adams" y esterilizado a 160°C durante 60 minutos:

Descripción de la Técnica.—La unión de los segmentos cefálicos y torácico sobre la

superficie dorsal del animal se aseca con alcohol de 70° prefiriéndose este método al de flameo directo ya que éste, puede precipitar localmente la coagulación y afectar la pureza del lisado. El seno longitudinal dorsal se canaliza insertando un "Angiocath" No. 16 (figura 3) siguiendo una dirección de atrás hacia adelante, de arriba hacia abajo y a una profundidad de aproximadamente 1 cm. La sangre se recolecta por escurrimiento (figura 4), en tubos de Pyrex de 15 cc. conteniendo 7.5 ml. de solución NEM-H, compuesta por N-etilmaleimida al 0.125% disuelta en solución salina al 0.3% y 10 unidades de heparina por mililitro. El pH originalmente ácido de esta solución

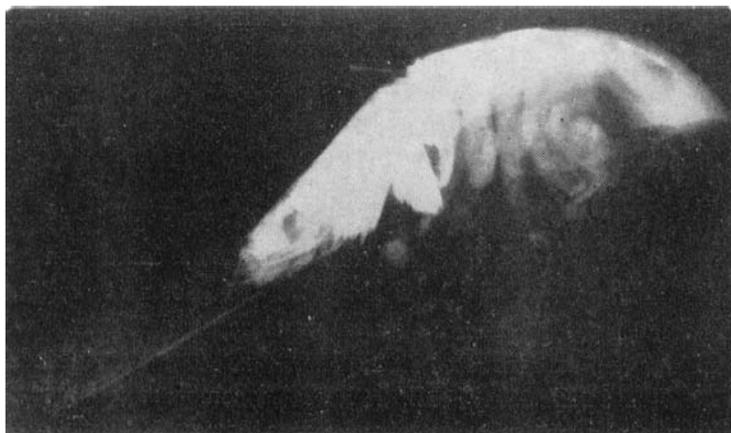


FIG. 3.—Distribución del medio de contraste en el sistema circulatorio y el aparato respiratorio.

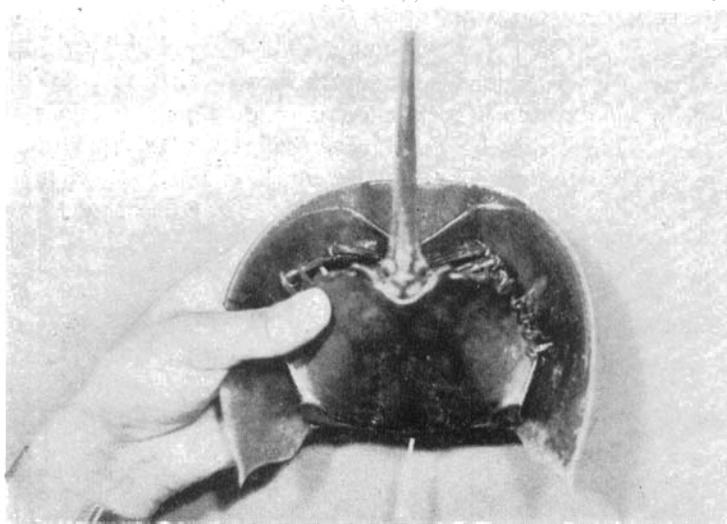


FIG. 4.—Punción del seno longitudinal dorsal y recolección de la sangre a través del catéter de Teflón.

fue llevado a 7.35 ± 0.5 con trishidroximetilaminometano (IRIS buffer); las variaciones del pH de esta solución, obligan a prepararla el mismo día del sangrado. Antes de ponerla en contacto con los amebocitos se esteriliza en filtros miliporo de 0.2

milimicras y se incuba a 36°C durante 20 minutos.

La sangre del *Limulus* y la solución NEM-II se mezclan suavemente y se centrifugan a 450 rpm. durante 20 min. para separar los amebocitos; (1 a 1.5 c.c. de

estas células para cada tubo) la hemolinfa, que es el sobrenadante azul por la presencia de hemocianina, es retirada por decantación y las células sanguíneas se lavan tres veces con solución salina al 3%, esterilizada y llevada al mismo pH de la solución NEM-H con el mismo método. Al final del último lavado, se agregan 20 c.c. de agua destilada y libre de pirógenos para cada 5 c.c. de amebocitos separados, para obtener la ruptura de los mismos en un lapso mínimo de 12 hr., a 4°C. Los detritus celulares se retiran mediante centrifugación a 1,500 rpm. durante 10 min. El sobrenadante transparente considerado como reactivo fue almacenado en cuarto frío a temperatura constante de 4°C. conservando su actividad por un mínimo de 8 semanas. La efectividad se comprobó con concentraciones conocidas de endotoxina de *E. coli* "Difco" disuelta en solución salina a manera de testigo como se presenta en el Cuadro 1.

Preparación del plasma de los pacientes: Las muestras sanguíneas de los pacientes, se obtienen a través de un catéter central para asegurar una buena recolección de endotoxina proveniente de todos los territorios corporales y antes de que los diferentes órganos encargados de su inactivación dentro del organismo, como son el pulmón, el hígado, el bazo, los riñones, etc., pudiesen influir en el resultado. Para cada prueba, se emplean 2 c.c. de sangre usando 50 UxMI. de heparina como anticoagulante. El plasma se obtuvo por centrifugación a 3,000 rpm. durante 10 min. separándose para cada prueba 1 c.c. en tubos de 10 x 75 mm. Las proteínas plasmáticas se retiraron con ácido acético 0.2 M (0.1 ml); el pH original, se recuperó con fosfato dibásico de potasio después de haber separado las proteínas mediante centrifugación a 5,000 rpm. durante 15 min.

Realización de la prueba: Se ponen 0.2 ml. de la muestra problema en con-

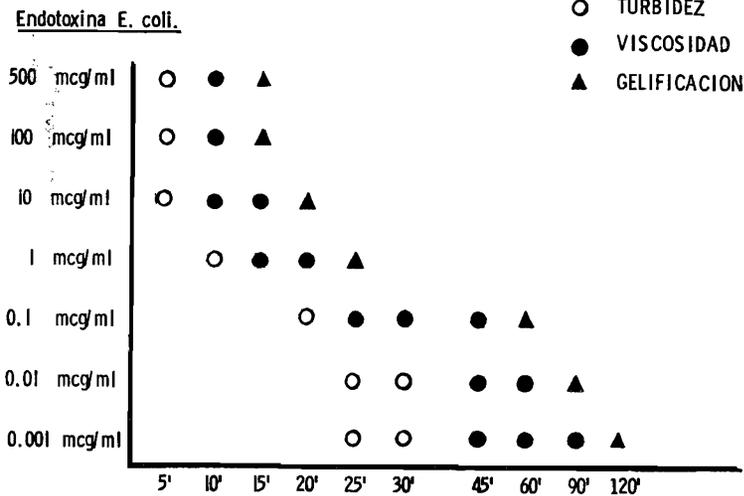


TABLA I

Relación promedio de aparición de turbidez, viscosidad y gelificación con concentraciones conocidas de endotoxina de *E. coli* disuelta en solución salina.

tacto con una cantidad similar del lisado de amebocitos del *Limulus* en tubos de 10 x 75 mm., se incuban a 37°C y se realizan observaciones periódicas cada 5 minutos la primera media hora y cada 15 minutos posteriormente por un tiempo máximo de 4 hrs., para determinar el tiempo de aparición de los cambios en los reactivos, mismos que se suceden en el orden siguiente: 1.—Aparición de turbidez, 2.—Aparición o aumento en la viscosidad y 3.—Formación del estado del "gel", relacionándose en forma aproximada el tiempo de aparición de dichos cambios con las concentraciones conocidas de endotoxina, sin embargo, la apreciación de la reacción para fines prácticos se muestra en el Cuadro II.

FLOCULACION:

(Negativa)

Si el lisado desarrolla discretas zonas nebulosas sin ninguna cohesión entre ellas.

TURBIDEZ

(Positividad de +)

Si la transparencia, discretamente azul del lisado, tiende a la opacificación uniforme sin ningún cambio en la densidad de los componentes.

VISCOSIDAD

(Positividad ++)

Cuando aparece o se incrementa la viscosidad de los componentes, con agrupaciones granulares a las paredes del tubo inclinándolo a 45°.

GELIFICACION

(Positividad +++)

Cuando la formación del "gel" a partir de los reactivos, impide su caída al girar los tubos a 180°.

CUADRO II.

Los pacientes en quienes se realizó la prueba, fueron divididos en dos grupos; el

primero de ellos estuvo formado por 30 pacientes en los que no existía evidencia clínica de que padecieran algún proceso infeccioso y fue tomado como grupo control en el estudio.

El segundo grupo, estuvo formado por 46 pacientes con proceso infeccioso severo y fuerte sospecha clínica de padecer endotoxemia a los que además de la prueba, les fueron practicados cultivos diversos a fin de establecer el germen causal. En este segundo grupo, la prueba fue realizada cada 24 hrs., en los casos quirúrgicos y, en periodos que comprendieron el pre, trans y postoperatorio en los que la intervención quirúrgica fue parte esencial del tratamiento.

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a la presencia o ausencia total del estado de choque comprobándose éste por su estado clínico y hemodinámico.

RESULTADOS

De las 30 pacientes sin evidencia de procesos infecciosos considerados controles, sólo en uno de ellos la prueba fue positiva lo que constituye el 3.3% de falsas positivas (Cuadro III).

Los pacientes infectados se dividieron en 2 subgrupos: Los que desarrollaron estado de choque (14 pacientes), todos tuvieron endotoxemia positiva ++ y +++. En 11, los cultivos desarrollaron gérmenes Gram negativos, en tres casos el cultivo no desarrolló ningún germen. De los 22 pacientes restantes que constituyeron el segundo subgrupo, en 14 la determinación de endotoxinas fue negativa a pesar de haberse encontrado en 7, gérmenes Gram negativos. En 8 casos la reacción fue positiva ++ a +++,

	ENDOTOXEMIA		CULTIVOS			MORTALIDAD	
			Gram. Neg.	Gram Posit.	Negativos No realizados		
GRUPO I	Negativa	29				0%	
Control 30 casos.	Positiva	0				0%	
	Positiva++	0				0%	
	Positiva+++	1				0%	
GRUPO II							
Estudio 36 casos							
(A) Sin choque séptico 22 casos	Negativa	14	7		5	2	0%
	Positiva+	0					
	Positiva++	5	3		1	1	0%
	Positiva+++	3	1	1	1		0%
(B) Con choque séptico 14 casos	Negativa	0					
	Positiva+	0					
	Positiva++	4	3		1		50%
	Positiva+++	10	7		2	1	100%

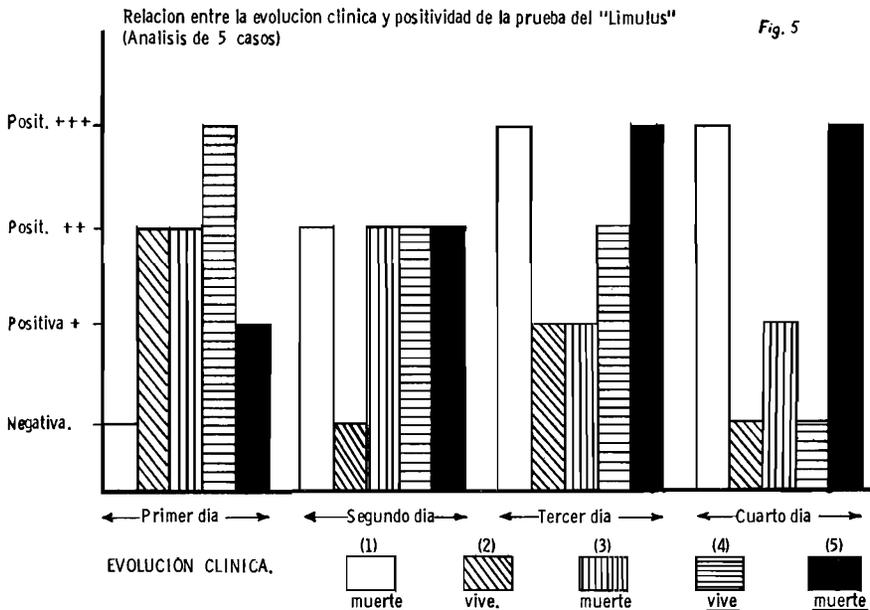
CUADRO III.

habiéndose demostrado Gram negativos en 4 pacientes y Gram positivos en uno (Cuadro III).

En 5 casos con choque séptico se hicieron determinación de endotoxinas cada 24

hrs., durante 4 días. Los resultados se muestran en la figura 5, en la que se relaciona el nivel de endotoxemia y la evolución clínica.

De las observaciones más importantes del



presente estudio, fue la relación existente entre positividad decreciente de la reacción y la mejoría clínica y hemodinámica de los pacientes, contrariamente con el empeoramiento observado en aquellos en los que la positividad de la reacción o permanecía estática o aumentaba en forma progresiva. Es posible que esta prueba, puede tener utilidad pronóstica en la valoración de la evolución clínica del paciente al tratamiento instituido.

DISCUSIÓN

La determinación de endotoxinas por la prueba del *Limulus polyphemus*, es de utilidad en la clínica, por su rapidez, bajo costo y especificidad.^{8,9,10,11,12,13,14,15,16} Sin embargo la dificultad para apreciar a simple vista los cambios presentes en los reactivos, limita obviamente su aplicación. Una buena estandarización de la apreciación de la reacción así como de la preparación y conservación del lisado deben llevarse a cabo, para evitar discrepancias acerca de debida utilidad.^{17,18,19}

Hasta el momento hemos utilizado la valoración cualitativa, por la dificultad de encontrar un método adecuado para hacer mediciones cuantitativas. Recientemente se ha estado empleando un agregómetro plaquetario para obtener registros gráficos de la reacción con lo que sin duda disminuirán los errores de la apreciación visual;²⁰ en lo particular, ensayamos la espectrofotometría para medirla, sin embargo, la movilización excesiva de los tubos, la falta de una temperatura constante así como la mayor cantidad del lisado necesaria, limitan su aplicación práctica.

Por los resultados obtenidos con los pa-

cientes estudiados, la determinación de endotoxinas es un examen de laboratorio que ha demostrado tener bastante especificidad para detectar cantidades pequeñas de endotoxinas en el suero de pacientes, el porcentaje de reacciones "falsas positivas" es bajo. Por otro lado no en todos los pacientes con infecciones por gérmenes Gram negativos se encontrará la reacción positiva, ya que se sabe que las endotoxinas pueden no ser liberadas a la circulación en forma constante,⁸ si no que, en determinadas circunstancias, como durante la manipulación de áreas infectadas, existe una liberación masiva y por lo tanto, es más fácil detectarlas, por lo que el momento en que se toma la muestra es de gran importancia. En los pacientes en choque séptico la cantidad de endotoxinas en la circulación es muy alta, lo que explica la positividad en todos ellos; no es de extrañar el encontrar cultivos negativos en esos casos, ya que por regla general los pacientes han recibido distintos esquemas antibióticos antes de caer en el estado de choque, lo que inhibe el crecimiento de los gérmenes en los medios de cultivo.

Algunos autores utilizan plasma rico en plaquetas para aumentar la positividad de la reacción²⁰, ya que se les atribuye a estos elementos sanguíneos la particularidad de "acarrear" a las endotoxinas para su eliminación dentro del sistema reticulo endotelial. En lo particular preferimos el empleo de plasma libre de elementos celulares ya que supuestamente la endotoxina libre es la responsable de la mayoría de las alteraciones presentes en el choque séptico.

El interés de presentar los resultados con esta prueba, a pesar de ser aún preliminares, estriba en el hecho de su utilidad

práctica, bajo costo, y que los *Limulus* se pueden obtener fácilmente en nuestro país. Además es necesario buscar métodos para hacer la reacción más específica y cuantificable lo que puede lograrse con mayor rapidez mientras más grupos de investigadores trabajan en ello.

RESUMEN

Con el fin de comprobar la utilidad práctica de la prueba del *Limulus* (LGT) propuesta por Levin y Bang para el diagnóstico de endotoxemia, se montó esta técnica en nuestro laboratorio aprovechando la disponibilidad de estos animales en nuestro territorio nacional. Fueron sangrados 68 ejemplares para la obtención del lisado y más de 300 pruebas fueron realizadas, comprobándose la efectividad de esta técnica para la identificación de cantidades extremadamente pequeñas de endotoxina tanto en solución salina como en el plasma humano. Se estudiaron dos grupos de pacientes; en el grupo considerado como con-

trol el porciento de pruebas falsas positivas fue del 3.3%, mientras que en el segundo, integrado por pacientes con procesos infecciosos severos, la endotoxemia fue demostrable mediante esta técnica en el 100% de los casos en los que el choque séptico estuvo presente. Se realizaron determinaciones seriadas cada 24 hrs. y en los periodos que comprendieron el pre, trans y post-operatorio en algunos casos con objeto de conocer las modificaciones de la reacción y el estado clínico del paciente; la persistencia de reacciones positivas asociada con una mala evolución clínica o una mortalidad elevada así como la notable mejoría clínica observada en aquellos casos en los que las positivities decrecían o se tornaban negativas, puede conferirle cierto valor pronóstico en la vigilancia y el manejo del paciente con choque endotóxico. Por otra parte, la dificultad para apreciar a simple vista los cambios en la reacción, limita obviamente su aplicación cuantitativa por lo que hasta el momento actual, la hemos tomado en sentido cualitativo en espera de un mejor método para su valoración.

BIBLIOGRAFIA

1. Beng, F.B.; Levin, J.: "A description of cellular coagulation in the *Limulus* blood". Bull. John Hopkins Hosp. 115: 337, 1964.
2. Levin, J.; Bang, F.B.: "Clottable protein in *Limulus*: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin". Throm. Diath. Haemorrh. 19: 186, 1968.
3. Levin, J.; Bang, F.B.: "The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood". Bull. Johns Hopkins Hosp. 115: 265, 1964.
4. Rojas Corona, R.; Skarnes, R.; Tamakuna, S.: "The *Limulus* coagulation Test for endotoxin. A comparison with other assay methods". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132: 599, 1969.
5. Reinhold, R.B.; Fine, J.: "A technique for quantitative measurement for endotoxin in human plasma". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 334, 1971.
6. Levin, J.; Tomasulp, P.A.; Osser, R.S.: "Detection of endotoxin in human blood and demonstration of an inhibitor". J. Lab. Clin. Med. 75: 903, 1971.
7. Cooper, J.F.; Levin, J.; Wagner, H.N.: "Quantitative comparison of in-vitro and in-vivo methods for the detection of endotoxin". J. Lab. Clin. Med. 78: 138, 1971.
8. Levin, J.; Poore, T.E.; Young, N.S.: "Gram negative sepsis. Detection of endotoxemia with the *Limulus* test". Ann. Int. Med. 76: 1, 1972.
9. Levin, J.; Poore, T.E.; Zauber, N.P.; Osser,

- R.S.: "Detection of endotoxin in the blood of patients with sepsis due to Gram negative bacteria". *The New England J. Med.* 283: 1313, 1970.
10. Young, N.S.; Levin, J.; Prendergast, R.A.: "An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mediator". *J. Clin. Invest.* 51: 1790, 1972.
 11. Jorgensen, J.H.; Smith, R.: "Preparation, sensitivity and specificity of Limulus lysate for endotoxin assay". *Appl. Microbiol.* 26: 43, 1973.
 12. Ronald, Nachum; Allen, Lipsey; Stuart, E. Siegel: "Rapid detection of Gram negative bacterial meningitis by the Limulus lysate test". *New England J. Med.* 289: 931, 1973.
 13. Trippodo, N.C.; Jorgensen, J.H.; Priano, L.L.; Traber, D.L.: "Cerebrospinal fluid levels of endotoxin during endotoxemia". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143: 932, 1973.
 14. Feldman, S.; Pearson, T.A.: "The Limulus test and Gram negative bacillary sepsis". *Am. J. Dis. Child.* 128: 172, 1974.
 15. Cuevas, P.; De la Maza, L.; Gilbert, J.; Fine J.: "The lung lesion in four different types of shock in rabbits". *Arch. Surg.* 104: 319, 1972.
 16. Fossard, D.P.; Kakkar, V.V.; Elsey, P.E.: "Assessment of Limulus Test for detecting endotoxemia". *Br. Med. J.* 2: 465, 1974.
 17. Russel, J.; Stumacher, R.J.; Marilyn, J.; McCabe, W.: "Limitation of the usefulness of the Limulus assay for endotoxin". *The New Engl. J. Med.* 288: 1261, 1973.
 18. Ronald, J.E.; Wolff, S.M.: "Nonspecificity of the Limulus amoebocyte lysate test: Positive reactions with polynucleotids and proteins". *J. Inf. Dis.* 128: 349, 1973.
 19. Garibaldi, R.A.; Allman, G.W.; Lasren, D.H.; Smith, Ch.; Burke, J.P.: "Detection of endotoxemia by the Limulus test in patients with indwelling urinary catheters". *The J. Inf. Dis.* 128: 551, 1973.
 27. Das, J.; Schwartz, A.; Folkman, J.: "Clearance of endotoxin by plattles: Role in increasing the accuracy of the Limulus gelation test and in combating experimental endotoxemia". *Surgery* 74: 235, 1973.