

QUAN LA CIÈNCIA FÒSSIL VIVENT

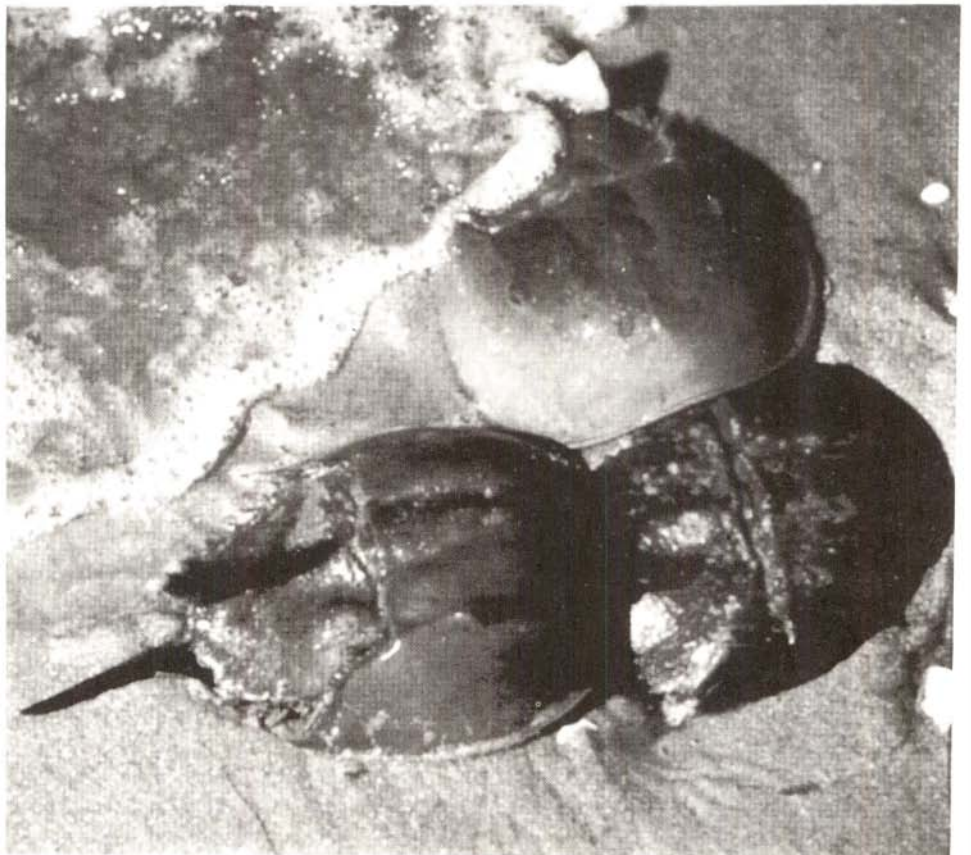
per Tom Mikkelsen

12 (644/Volum 2/novembre 1982

ciència 21)

Aquesta és la història, com veurem ben aviat, d'uns veritables "fòssils vivents", els *Limulus*, que fa desenes de milions d'anys poblaven els fons marins del nostre planeta i dels quals encara resten algunes poblacions vivents que corren el perill d'extingir-se pel fet de l'acció de la ciència. L'autor d'aquest article ens explica, des d'una perspectiva ben pragmàtica, les raons per evitar que els científics es facin responsables de l'extinció d'un dels més antics habitants del planeta... i dels més vitals per a l'home.

Tom Mikkelsen és un investigador danès que treballa en el camp de la filogenètica i la immunologia comparada. Va participar fa poc en una expedició submarina al golf de Mèxic per estudiar els *Limulus* en el seu propi medi natural. Actualment Mikkelsen desenvolupa les seves recerques en el laboratori d'endotoxines de la clínica universitària de malalties infeccioses de Copenhagen (Dinamarca). El seu article va ser publicat a la revista "Impact" (Unesco, París) i ha estat traduït per la microbiòloga catalana Francesca Corcoy.



INTRODUCCIÓ



Els microfòssils del tipus *Clostridium* datats en 3400 milions d'anys, descoberts en els dipòsits de l'Oñverwacht a l'Àfrica del Sud, són probablement les primeres manifestacions de la vida, tal com nosaltres la definim, sobre el nostre planeta. Des de la seva aparició, aquests procariotes sempre han donat prova de mobilitat i d'ubiquitat i, a través de tota la història de l'evolució, han estat indispensables totes les formes de vida superiors que han seguit, encara que representin potencialment un perill mortal per a elles. Han envaït i colonitzat tots els nínxols ecològics imaginables de terra ferma, des de l'emersió del Pangea i, a l'alba del Paleozoic, fa uns 600 milions d'anys, les aigües poc profundes de Panthalassa i de Tetis eren un brou diluït de procariotes,

amb una trama significativa de bacteries Gramnegatives, tal com són les aigües costaneres dels oceans d'avui dia.

A fi de protegir-se dels efectes potencialment nefastos dels lipopolisacàrids de les bacteries —més coneguts amb el nom d'"endotoxines"—, un aràcnid marí del Paleozoic, el *Limulus polyphemus*, o "cranc" en ferradura amb la cua en forma

d'espasa, ha perfeccionat un sistema de defensa intracel·lular molt sensible i molt específic.

Aquest principi —anomenat test límul—, descrit per primera vegada per F. Bang el 1956, ha estat adoptat pels investigadors en ciències biomèdiques a través del món com el test biològic *in vitro* més sensible per detectar l'endotoxina. De manera

POSA EN PERILL UN ÚTIL PER A L'HOME

El limul, una espècie actual del gènere Limulus

ciència 21

novembre 1982 / Volum 2/645 13

corrent, és possible detectar en líquids concentracions d'endotoxines inferiors al nanogram en menys d'una hora. Tot i així, malgrat els esforços portats a terme en el món, el sistema d'acció molecular del test limul continua essent un enigma del Paleozoic per a la ciència del Cenozoic.

Mini-glossari

- Quelicerats: aràcnids que tenen dos apèndixs al voltant de la boca per mastegar i per agafar (com l'aranya).
- Cisternografia: es fa servir en radiologia per examinar les cisternes (o cavitats) cerebrals.
- Clostridium*: gènere de bacils.
- Gramnegatiu: grup de bacteries que no es coloren per la tinció Gram. La coloració es deu a la presència d'una nucleoproteïna.
- Leucopoesi: formació de leucòcits.
- Necrosi: canvis que es produeixen en un teixit després de la mort d'algunes cèl·lules.
- Procariota: organisme unicel·lular sense nucli.
- Pirogen: que produeix febre.
- Sèpsia: contaminació per les bacteries.
- Sistema reticulo-endotelial: cèl·lules que es troben a la medulla espinal, a la melsa, al fetge, etc. i que netegen la sang de bacteries i d'altres matèries.

ELS HÀBITATS DELS "CRANCS" EN FERRADURA HAN ESTAT IDENTIFICATS

Els limuls constitueixen una subramificació o una classe d'artròpodes quelicerats molt pròxima als escorpioníds. El representant fòssil més vell —*Eolimulus*— data probablement del Cambrià. La figura 1 presenta de manera simplificada les principals transformacions i tendències evo-

lucives que han portat a les quatre espècies vivents de limuls.

Es pensa que durant l'era mesozoica, la concentració més important de limuls es trobava a les aigües europees, però que a l'alba de l'era cenozoica, fa uns 65 milions d'anys, els limuls es varen dispersar, alguns traslladant-se cap a l'oest i d'altres migrant cap a l'est.

Lorus i Margery Milne afirmen, en el seu petit i interessant llibre *The crab that crawled out of the past*, que no hi ha limuls a la costa oest d'Amèrica i que tampoc no n'hi ha cap a les riberes d'Amèrica del Sud, d'Àfrica, d'Europa o d'Àustràlia. Avui dia, tots els científics que s'hi dediquen —menys probablement l'autor— estan d'acord que aquestes costes ja no constitueixen l'hàbitat natural del limul. El desembre del 1981 i el gener del 1982, vaig emprendre una expedició submarina a les profunditats de l'oceà Atlàntic a l'altura de la costa oest de l'Àfrica a la recerca d'un nínxol ecològic de limuls que no s'hagués localitzat fins ara.

Actualment, només hi ha en el món dues regions on es tingui la certesa de trobar limuls. En primer lloc, al llarg de la costa est d'Amèrica del Nord, des de Nova Escòcia fins a Florida Keys, així com a les vores del golf de Mèxic, i el límit sud el constitueix la província de Yucatán; en segon lloc, a les aigües del sud-est asiàtic. La primera regió és habitada per *Limulus polyphemus*, el limul d'Amèrica; la segona per tres espècies diferents —*Tachypleus gigas*: costa del golf de Bengala, Tailandia, Malàisia, Indonèsia, part septentrional de l'illa de Borneo i, probablement, l'estret de Torres (entre Nova Guinea i Austràlia); *Tachypleus tridentatus* o "cranc rei xinès": litoral nord de l'illa de Borneo, Vietnam, Xina, sud del Japó, Filipines; *Carcinoscorpius rotundicauda*, anomenat localment "cranc rei de l'estuari": costa oriental de l'Índia i, probablement, a cada costat de la península Malàisia fins al golf de Siam, nord de l'illa de Borneo, Filipines i les illes Mo-

INFORMACIONS ECOLÒGIQUES

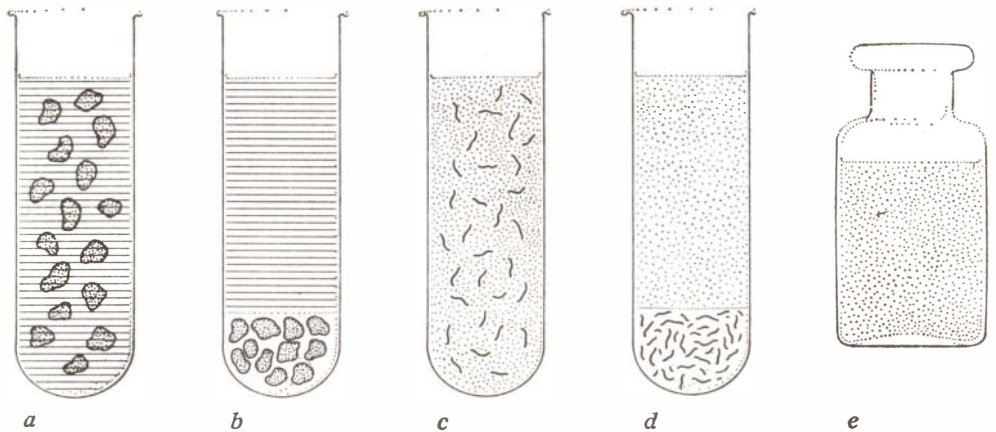
Les il·lustracions 3 i 4 són fotografies de *Limulus polyphemus* (Xiphosura). Les femelles quan han arribat al seu ple desenvolupament són força més grans que els mascles madurs. El Raffles Museum informa que han trobat una femella de *T. tridentatus* d'una llargada de 745 mm. Els ous, les larves, els joves i els adults de totes les espècies tenen una remarcable robustesa i es poden trobar vius a grans distàncies. Els adults poden sobreviure durant setmanes fora de l'aigua, fins i tot sense aliment, sempre que les seves làmines branquials es mantinguin lleugerament humides.

Tots els limuls dipositen els seus ous en el llot a alta mar entre la plenamar i la baixamar. Són necessàries de dues a cinc setmanes per a l'eclosió dels ous de l'espècie més estudiada, *Limulus polyphemus*; les larves marxen de la platja en plenamar i es queden habitualment a les aigües poc profundes. S'alimenten de petits organismes que viuen al fang en els indrets plens de llot. Els joves limuls tenen sis mudes durant el seu primer any i, després, una sola per any. A cada muda, l'animal en creixement augmenta les seves dimensions lineals al voltant d'un 25%. La cuirassa dels joves limuls és fràgil i transparent; a cada muda successiva es va tornant més fosca i gruixuda. En raó d'aquesta fragilitat els joves limuls són la presa dels grans ocells de mar.

LES ENDOTOXINES IMMOBILITZADES PEL GEL

Nombroses preguntes han estat formulades a aquest "fòssil vivent" i algunes de les respostes tenen un gran interès científic. Molts dels nostres coneixements actuals sobre els mecanismes fisiològics fo-

Fig. 2. Producció de lisat d'amebòcits de limuls. a) La sang completa (l'hemolimfa-blau-hemocianina- i els amebòcits-vermells- densament plens de grànuls) es extreta directament de l'animal i posada en tubs de centrifuga de sílica i aprotgens; se centrifuga a baixa velocitat per evitar un trencament prematur de les cèl·lules que són extremament fràgils. b) Hi ha una sedimentació dels amebòcits intactes i l'hemolimfa, desembarassada de les seves cèl·lules, es decanta i congela per a un ús posterior en un altre context. El culot d'amebòcits s'homogenitza mecànicament. c) L'homogenitat es transfereix a tubs de centrifuga i es dilueix amb aigua (habitualment 1:3). d) Després d'una centrifugació a alta velocitat les restes cel·lulars són sedimentades i l'agent de coagulació alliberat per la ruptura dels amebòcits, es troba en estat lliure en el sobrenedant. e) Finalment, el sobrenedant (lisat d'amebòcits del limul) es trasllada a flascons i ja està a punt per fer-se servir.



namentals de la visió han estat obtinguts per l'estudi de respostes elèctriques dels òrgans visuals de *Limulus polyphemus*. Una pregunta formulada inicialment per F. Bang el 1956 ha conduït al test limulus per detectar les endotoxines de les bacteries gramnegatives.²

L'amebòcit, cèl·lula el·líptica d'unes 12 x 18 µ, és l'únic tipus de cèl·lula que circula a la sang blava (a causa de la presència d'hemocianina) o hemolimfa, del *Limulus polyphemus*. És una cèl·lula nucleada en la qual el citoplasma està densament ple de grans grànuls refringents que contenen tots els factors que contribueixen al mecanisme original de la coagulació sanguínia del limul.

Després d'una estimulació *in vivo* o *in vitro* per molt petites quantitats d'endotoxines, en estat lliure i dispersat o sota una forma associada a les parets intactes de bacteries gramnegatives, es produeix una agregació ràpida dels amebòcits, acompanyada de canvis marcats en la forma cel·lular i de la formació de prolongacions que s'estenen d'una cèl·lula a l'altra. De seguida hi ha una degranulació o lisi dels amebòcits de l'agregat, que allibera no solament les proteïnes de la coagulació (els coagulògens), sinó també tots els altres factors necessaris per a la formació subsegüent del gel o coàgul, que immobilitza i engloteix ràpidament les endotoxines. Un amebòcit intacte no pot ser penetrat per l'endotoxina i una hemolimfa que no tingui cèl·lules no es coagula i no és necessària per a la coagulació.

EL PROCÉS

CONTINUA OSCUR

El procés cel·lular de la degranulació dels amebòcits continua essent obscur, però es comença, a poc a poc, a tenir una primera idea de la reacció de la coagulació activada per l'endotoxina. Primerament, un enzim de pre-coagulació és activat per l'endotoxina; aquest enzim actua sobre la proteïna de la coagulació (el coagulogen)

provocant una proteolisi limitada; hi ha tot seguit polimerització i formació d'un gel compost de llargues fibril·les que aparentment s'entrecruen. Totes les espècies de xifosurs tenen un coagulogen que té més o menys el mateix pes molecular, entre 23.000 i 27.000.

Aquest sistema de coagulació d'origen intracel·lular ha estat d'una importància vital per al limul des de fa centenes de milions d'anys i, gràcies als treballs d'aclariment fets en aquest terreny pels doctors Levin i Bang sobre aquest principi, s'ha posat a punt en el curs dels deu o quinze últims anys una eina d'una gran importància científica i clínica. D'altres invertebrats marins tenen cèl·lules sanguínies que reaccionen sota l'acció d'endotoxines de bacteries gramnegatives, però el limul continuarà essent probablement únic donat que l'hemolimfa és fàcilment accessible i que el seu volum és important (fins a 300 ml).³

Alguns científics japonesos han preparat lisats d'amebòcits, a partir de *T. tridentatus*, i han demostrat que aquestes lisis poden servir per detectar l'endotoxina, al mateix nivell quantitatiu que el *L. polyphemus*.⁴ Això no obstant, és clar que les tres espècies del sud-est asiàtic són diferents a nivell cel·lular i intracel·lular i que la separació filogenètica es va produir segurament fa alguns milions d'anys. L'hemolimfa de *Tachypleus*, per exemple, conté dos tipus d'amebòcits portadors cadascun de tres tipus de grànuls, mentre que l'hemolimfa de *Limulus* no enclou més que un sol tipus cel·lular que té grànuls homogenis.⁵ S'espera molt de l'elucidació d'aquest fet així com d'altres diferències filogenètiques entre les espècies.

LES ENTODOXINES

DEFENSEN LES

BACTERIES

Les endotoxines (lipopolisacàrids, LPS) produïdes per les bacteries gramnegatives són macromolècules compostes per un

polisacàrid, un lípid i pèptids més petits. Són part integrant de la membrana exterior de les bacteries gramnegatives on, no solament ajuden al transport selectiu de substàncies dins de la cèl·lula, sinó que també participen en la defensa de la bactèria. Una part important de les 10¹⁴ bacteries que viuen al nostre tracte gastrointestinal són gramnegatives i enclouen les famílies (espècies) *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* i *Rotens mirabilis*. Una sola bactèria conté al voltant de 10⁻¹⁴ grams d'endotoxina, que equival a un 1% del seu propi pes. Es poden trobar les endotoxines, sia en estat lliure, dispersades, sia després de la seva alliberació al medi ambient després de la mort o de la lisi de la cèl·lula.⁶ Les endotoxines resisteixen notablement bé la majoria dels detergents d'ús corrent, així com la calor. Només són inactivades al cap de sis hores a 170° C.

Normalment, nosaltres tenim una simbiosi benèfica i vital amb la nostra flora bacteriana gramnegativa. Aquest feliç equilibri és controlat, principalment, per mecanismes de regulació desencadenats pel fetge, com la desintoxicació, conjugació i aclariment de la sang. Totes aquestes mesures afavoreixen l'absorció pel sistema venós de bacteries i d'endotoxines del tub digestiu. A més, un cert fenomen de tolerància permetrà als nostres sistemes de vigilància de detectar ràpidament tota fuga de lipopolisacàrids dins de la circulació sanguínia.

Quan, per una raó o per una altra, aquests diversos mecanismes de defensa no funcionen normalment, les endotoxines poden tenir sobre un hoste mamífer un cert nombre d'efectes fisiològics i patològics (i sovint hi ha un lligam entre ells), com per exemple en el cervell, sobre el sistema de regulació de la temperatura, sobre les diferents poblacions cel·lulars de la sang, sobre els sistemes hormonals, sobre el metabolisme i sobre els sistemes de vigilància immunològica. Aquests efectes poden portar, a la fi, a una coagulació intravascular disseminada, a una hipotensió, a un col·lapse cardiovascular i no és estrany que també portin

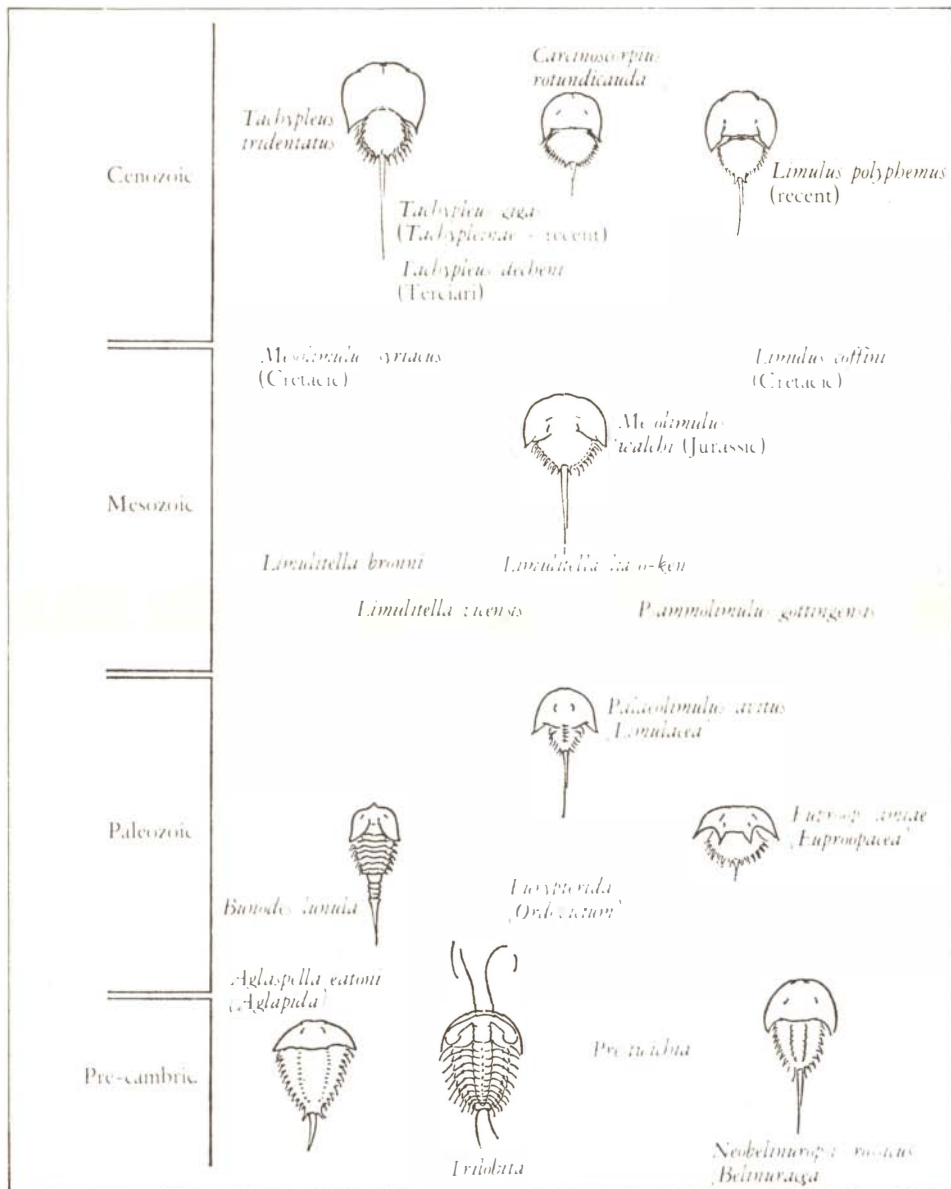


Fig. 1. Fases evolutives que condueixen a les espècies vivents de limulus

a la mort.

L'HOME ÉS SENSIBLE A LES ENDOTOXINES

Durant molts anys, l'extrema sensibilitat de l'home a les propietats pirògenes de les endotoxines ha estat considerada com l'efecte clàssic dels LPS. Entre altres efectes, es poden citar les modificacions del sistema hematopoietic, canvis en els mecanismes fibrinolitic i de coagulació, (i) una reactivitat augmentada a l'adrenalina. Les endotoxines també poden produir una lesió placentària que pot provocar una reabsorció del fetus o un part prematur. Altres efectes característics de les endotoxines són les modificacions de l'activitat del sistema reticulo-endotelial i els canvis metabòlics. Dit això, convé de totes maneres remarcar que les endotoxines no es comporten exclusivament com enemigues de l'home i d'altres mamífers, sinó que també es poden comportar com amigues. Quantitats petites de LPS poden provocar una estimulació benèfica de les nostres defenses immunològiques, estimular una leucopoesi al moll de l'os i augmentar la nostra resistència inespecífica a diversos agents patògens. Aquesta resistència aug-

mentada afecta gran varietat de bacteries, fongs, paràsits i virus. Quant a aquests últims, l'augment de la resistència serà deguda a l'estimulació per les endotoxines de la producció de l'interferó probablement per la mediació de la fracció de la molècula LPS anomenada lípid A. Les endotoxines poden servir d'adjuvants, causar una necrosi o una regressió de tumors malignes.⁷ Quan en el cas de les endotoxines parlem de petites dosis, s'ha d'entendre que una dosi que no arribi als 10 nanograms d'endotoxina per quilogram de pes corporal en injecció intravenosa a un home adult i en bona salut pot provocar una elevació d'1,9° C la seva temperatura corporal. Entre les reaccions típiques a també petites dosis de LPS, figuren igualment una granulocitosi, esgarriances, mal de cap, tremolors, dolors musculars, desgana, nàusees i vòmits.

EL TEST LÍMULUS DETECTA LES ENDOTOXINES

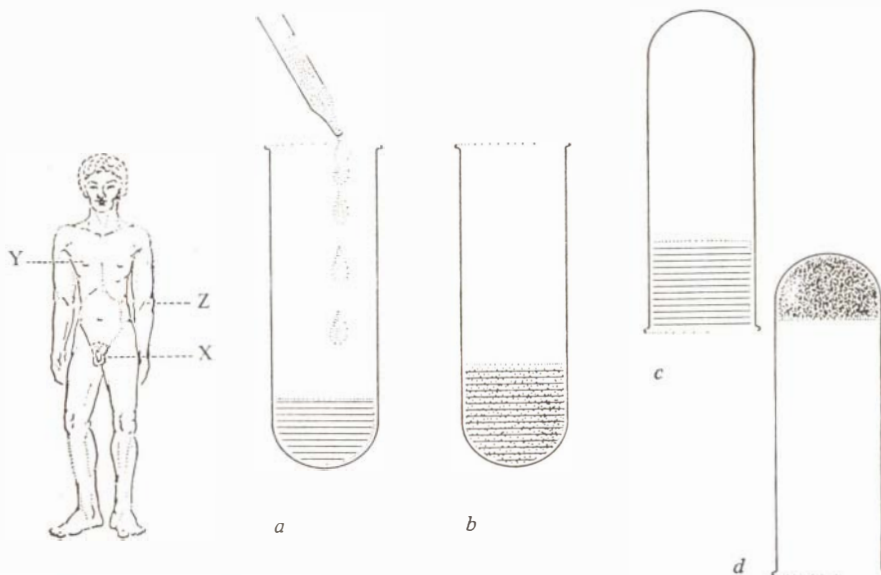
Nombrosos mètodes han estat utilitzats per a la detecció d'endotoxines. Una febre provocada en el conill ha estat i és-

l'examen complementari que es fa servir més, però el test limulus ofereix grans possibilitats com a mètode de recanvi. També s'ha determinat la morbiditat o l'efecte mortal en altres criatures vives, a fi d'avaluar els efectes biològics de les endotoxines. La mort d'embrions d'ocells, l'avortament, lesions inflamato-ries cutànies i la necrosi de sarcomes en els rosegadors s'han fet servir en les diverses anàlisis de l'activitat biològica de l'endotoxina. Així i tot, totes aquestes anàlisis són tributàries d'animals vius o d'òrgans vius d'animals i són susceptibles de nombroses dificultats i inexactituds.⁸

Actualment, de tots els tests *in vitro* d'endotoxines que hi ha disponibles, el test limulus està generalment reconegut com el més sensible. La preparació de lisats a partir d'amebòcits del limulus pot presentar alguna dificultat, perquè exigeix rigorosament la utilització d'aparells i una manipulació aprotègica durant tot el procés (fig. 2). Però, el test limulus per si mateix és senzill i relativament fàcil d'aprendre, i, deixant de costat la necessitat constant d'una manipulació aprotègica, no és necessari cap equipament complex (fig. 3). La reacció final és la gelificació del lisat líquid, normalment transparent i sense color. És molt fàcil definir i detectar un test positiu; a més, el test limulus és reproducible. A temperatura ambient, el lisat és estable durant algunes setmanes, i a -20°C es pot conservar durant anys sense que perdi la seva sensibilitat. Fent servir el test limulus es pot detectar una dosi d'endotoxina tan mínima com 10⁻¹⁵ gr en una mostra líquida tan reduïda com 0,1 ml.

El test limulus és útil per a aplicacions mèdiques. Des de la seva adopció, el test limulus ha estat utilitzat amb èxit per detectar i determinar la quantitat de LPS en nombrosos contextos dins una gran varietat de disciplines mèdiques. S'ha fet servir per estudiar la sang de malalts en què es sospitava una sèpsia per gramnegatiu i per a l'estudi de xocs i d'endotoxèmies experimentals en animals de laboratori. El test ha estat utilitzat per determinar

Fig. 3. Aplicacions del lisat de limul en el diagnostic. El laboratori rep una o unes quantes mostres líquides d'un malalt infectat (X: orina, Y: líquid cefalo-raquidi, o Z: sang -les mostres poden ser també de líquid sinovial, amniòtic o ascític, vacunes, llet, aigua, etc.) a) 0,1 ml. de la mostra de prova s'hi afegeixen 0,1 ml. del lisat de limul i es barreja mecànicament. b) El tub d'assaig s'incuba 4 h a 37 °C i es remena. c) La barreja no ha canviat: és clara, més aviat líquida i relleisca per la paret del tub. La mostra no està infectada o contaminada per bacteries gramnegatives i/o per endotoxines de la paret cel·lular. d) un coagul ferm i opac s'ha format i ha quedat adherit al fons del tub d'assaig posat de cap per avall: la mostra està infectada o contaminada per bacteries gramnegatives i/o per endotoxines. El test limulus és de gran importància en el cas d'absència de cel·lules bacterianes vives i quan les endotoxines lliures no poden ser colorades i "atrapades" per un microscopi ordinari. Actualment es disposa de mètodes més perfeccionats per determinar la quantitat exacta d'endotoxines.



les concentracions d'endotoxines en el líquid cefalo-raquidi (LCR) de malalts que tenen una meningitis per bacteries gramnegatives. S'ha constatat que el test era positiu en les primeres mostres de LCR de tots els 86 malalts sotmesos al test amb una meningitis per gramnegatius i que era uniformement negatiu en els 146 pacients que tenien diverses malalties infeccioses i no infeccioses.⁹ En els pacients amb una meningitis per bacteries gramnegatives, la dosi d'endotoxines de les primeres mostres de LCR variava entre 4 i 2.000 ng/ml. El test limulus és a la vegada més sensible i més específic que l'examen per coloració de Gram. El test limulus també està menys exposat a error d'interpretació que els mètodes que impliquen l'ús del microscopi.¹⁰

El test limulus ha demostrat la presència de bacteriòfags i d'endotoxines en quatre vacunes antivirals vives (contra la poliomièlitis, el xarampió, les galteres i la rosa) i en preparacions comercials de sèrum de vedell. S'ha trobat l'equivalent de 1.000 ng d'endotoxina per mil·lilitre en algunes vacunes de boví i s'ha recomanat el test limulus com a indicador sensible i específic d'una contaminació preexistent per bacteries gramnegatives de sèrums animals o d'altres components utilitzats en algun estadi del cultiu cel·lular en la preparació d'una vacuna vírica.¹¹

PRODUCTES FARMACÈUTICS SOTMESOS AL TEST

El test limulus va demostrar que és molt sensible en un cas on productes radiofarmacèutics varen provocar en pacients una meningitis asèptica; els lots dels productes es varen revelar tots contaminats per endotoxines quan varen ser sotmesos al test limulus i varen mostrar un efecte pirogen negatiu quan se'ls va fer objecte de test en conills segons el mètode americà practicat en farmàcia.¹² Estudis quantitius han demostrat que hi ha una

relació entre les meningitis asèptiques i nivells d'endotoxines d'1 a 100 ng per injecció de productes per cisternografia.¹³ Alguns agents quimioteràpics contra el càncer tenen una gran incidència d'efectes indesitjables i es sospita que les endotoxines hi tenen alguna cosa a veure. Així, les principals reaccions desfavorables a una teràpia per L-Asparaginasa són febre, nàusees, vòmits i modificacions hematològiques. Aquestes reaccions es deuen en part a una contaminació per endotoxines.¹⁴ En un estudi recent sobre nou preparacions d'un agent antitumoral, s'han constatat reaccions positives al test limulus en set d'aquestes preparacions.¹⁵ Per altra banda, s'ha fet servir el test limulus per avaluar la contaminació bacteriana en les manipulacions de productes sanguinis per detectar les endotoxines en els líquids utilitzats en hemodiàlisi^{16, 17} i per detectar també les endotoxines en el líquid amniòtic humà.¹⁸

ENDOTOXINES TROBADA EN ELS PRODUCTES LACTIS

En fi, el test limulus és cada vegada més reconegut en el camp de la higiene de l'alimentació, de la medicina del treball i de la higiene del medi ambient.

El 1980, varem fer servir el test limulus per revelar la presència d'endotoxines dins la llet i els productes lactis danesos.¹⁹ Per terme mitjà, la llet envasada conté menys d'1 ng/ml de LPS. La dosi en LPS de la llet fresca comercialitzada és igualment baixa, però arriba a 50 ng/ml després d'una conservació d'una setmana a 5°C. Igualment s'han trobat quantitats molt dèbils de LPS en el formatge i en la mantega. Les anàlisis del formatge han permès constatar una dosi mitjana de LPS de 50 ng/g. Les quantitats de LPS trobades en la llet en pols són significativament més elevades, les mitjanes són de 11.000 ng/g. Hem pogut així deduir que el test limulus és un mètode ràpid, fiable

i útil per establir la qualitat higiènica de la llet i d'altres productes lactis comercialitzats, així com la infecció per bacteries gramnegatives que s'acumulen durant la producció de la llet i el tractament fins a arribar al seu estat final.

S'ha trobat una dosi mitjana d'endotoxines de 30 a 130 ng/ml en mostres de llet que vénen de Nova Orleans.²⁰ La dosi d'endotoxines augmenta 16 vegades quan la llet es guarda a temperatura ambient durant 24 hores i en el mateix temps hi ha proliferació bacteriana. Al contrari, no hem trobat cap alteració per endotoxines quan les mostres han estat refrigerades. S'ha deduït que la presència d'endotoxines en les mostres de llet comercial i l'augment de la seva dosi en endotoxines, que es posa de manifest quan es deixa la llet a temperatura ambient, són potser factors que contribueixen a la síndrome de la mort sobtada del lactant.

En un estudi fet amb llet de vaques normals i amb llet de vaques que tenien una mastitis clínica, el test limulus ha demostrat ser molt específic i molt sensible per detectar les endotoxines i també ha fet pensar en la possibilitat de fer servir el test per vigilar l'eficàcia d'un tractament antibiòtic així com per ajudar el veterinari en el seu diagnòstic d'una mastitis per coliformes en la vaca.²¹

LA INHALACIÓ D'AEROSOLS CONTAMINATS PER MICROORGANISMES ÉS NOCIVA

Es reconeix cada vegada més que les lesions pulmonars, febre, tos, dispnea i un malestar general poden resultar de la inhalació de pols i d'aerosols contaminats per microorganismes. Les bacteries gramnegatives i les endotoxines ocupen el primer lloc entre els contaminants microbians de la pols orgànica i d'aerosols i



Un limul fòssil (*Mesolimulus sulcatus*) de fa uns cent quaranta milions d'anys

(Origen of species. *British Museum (Natural History) London and the Press Syndicate of the University of Cambridge*, 1981. Edició catalana, *Diputació de Barcelona*, 1982.)

novembre 1982 V. 49 (2) 649 17

700 milions per mil·lilitre.^{21, 26} Els organismes més importants i que es poden desenvolupar millor en les emulsions d'oli per a la fabricació i en els lubricants sintètics o a base d'oli mineral són bacteries gramnegatives. Les operacions per a la fabricació dels metalls comporten sovint la formació d'una boira estable, i, pels efectes d'aerosol deguts a les operacions de fabricació dels metalls, la contaminació es pot estendre a les parets, al terra, a l'equip i als operadors. En el meu estudi preliminar fet sobre 14 tipus diferents d'olis industrials, vaig trobar sovint concentracions d'endotoxines per sobre de 100 ng/ml, cosa que demostra bé els perills que representen per a la salut les gotetes d'oli actiu com a portadors d'una gran varietat de bacteries i de lipopolisacàrids.

LA POBLACIÓ DE LIMULUS POLYPHEMUS EN PERILL

tenen relació amb aquests símptomes. Es dedueix d'estudis anteriors sobre la bisinosi i altres febres degudes a substàncies vegetals o a aerosols que les bacteries gramnegatives i les endotoxines (pirògenes) han estat la preocupació de la medicina del treball des del 1784.

Estudis més recents han demostrat que les malalties imputables a la inhalació de pols vegetals contaminades per microorganismes en la indústria tèxtil apareixen sovint sota forma de petites epidèmies i mostren una simptomatologia més aviat uniforme amb accés de tos, febre, dispnea, mal de cap, dolors difusos i malestar general; s'ha arribat a la conclusió que aquests principals símptomes s'assemblen sorprenentment als efectes de les endotoxines.²¹

Els aerosols que contenen dosis d'endotoxines compatibles amb els nivells trobats normalment en el medi ambient po-

den causar la mateixa alteració pulmonar que fortes dosis letals d'endotoxines subministrades per via intravenosa.²³ En una investigació a Suècia de les reaccions de treballadors exposats a aigües usades en diferents fàbriques de tractament d'aquestes aigües, es van trobar dosis de més de 100 ng per dia, o sigui superiors al nivell requerit per a l'aparició de símptomes mèdics. El grau d'endotoxines trobat en les aigües usades tractades, que es fan servir de vegades per a la irrigació o per a la neteja, són del voltant de 50 ng/ml; s'ha indicat que, si una quantitat equivalent a 1 ml. era inhalada en algunes hores la dosi d'endotoxina requerida per provocar febre seria superada almenys cinc vegades.²⁴

Els fluids de treball dels metalls utilitzats industrialment contenen normalment d'1 a 60 milions de microbis per mil·lilitre i s'hi han trobat xifres tan elevades com

La importància que tenen els amebòcits dels xifosurs per a la recerca biomèdica, mundialment reconeguda, ens demostra que tenim necessitat d'un coneixement més profund de les quatre espècies vivents, perquè, en tant que recurs natural, puguin ser objecte d'una gestió acurada. El nombre de limuls capturats per a la preparació de lisats d'amebòcits ha augmentat considerablement en el curs dels últims anys; el 1978 en va ser proposada una reglamentació en l'U.S. Federal Register. Subratllant el risc potencial d'exhauriment, es demana als productors de lisats de limuls que garanteixin que aquesta producció no tindrà efectes nefastos sobre la població existent de limuls i que els limuls siguin retornats vius al seu hàbitat natural després d'una sola extracció de sang. Quan el "cranc" en ferradura japonès va ser declarat una espècie en perill i aparentment en via d'ex-

tinció a causa dels treballs d'asseccament i de la pol·lució es va establir al Japó l'associació per a la conservació del límulo.²⁷

EL CULTIU EN EL LABORATORI

El cultiu d'amebòcits en el laboratori ofereix un mitjà d'evitar l'exhauriment dels límuls. Amb aquest cultiu, podríem no solament abstenir-nos de la captura d'aquests animals i de treure'ls sang, sinó que potser aniríem cap a una normalització de la producció i reduiríem la variabilitat dels lisats segons els lots o les estacions. Els assaigs han intentat obtenir lisats actius d'amebòcits de límuls a partir de cèl·lules, però, en presència de concentracions de 1000 ng d'endotoxines, els lisats d'amebòcits obtinguts només han donat resultats lleugerament positius. La cria de límuls en viviers és una altra manera de protegir-los. Els tests que s'han fet a Israel han demostrat que la cria en viviers dels límuls és un mètode practicable.

Els límuls poden igualment servir com a donadors de sang. D'un gran nombre de límuls agafats en el golf de Mèxic als quals es va extreure al voltant d'un 1/5 del volum total de sang, només se'n varen morir set, aparentment com a resultat de l'extracció de sang, algunes hores després d'haver estat tornats a l'aigua. Els lisats així obtinguts varen ser excel·lents. En resum, tenim necessitat d'una visió general més precisa que la que tenim actualment sobre el nombre real i la distribució geogràfica de totes les espècies de límuls. És per això que hem fet plans per a expedicions submarines de gran envergadura en el golf de Mèxic, a la costa nord-est d'Amèrica del Sud i pel litoral del sud-est asiàtic. Seria una tragèdia si els científics —entre tots— fóssim els responsables de l'extinció d'un dels més vells habitants del planeta Terra.

(T. Mikkelsen)

Materials de lectura

M. Stephens: *The incredible horseshoe crab*. "Sea Frontiers". Vol. 10, 1964, pàg. 130-138.

Notes

1. K. Sekiguchi i K. Nakamura, *Ecology of the extant horseshoe crabs*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 37-45.
2. J. Levin i F. B. Bang, *The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood*, Bull. Johns Hopkins' Hosp., n° 115, 1964, p. 265-274.
3. A. D. Pearson, M. W. Calder i P. D. Meers, *Assay of endotoxin*, "Lancet", 26 mai 1973, p. 1194 et 1195.
4. S. Nakamura, S. Iwanaga, T. Harada i M. Niwa, *A clottable protein (coagulogen) from ameobocyte lysate of Japanese horseshoe crab (Tachypleus tridentatus). Its isolation and biochemical properties*, "J. Biochem.", n° 80, 1976, p. 1011.
5. F. Shishikura i K. Sekiguchi, *Comparative studies on hemocytes and coagulogens of the Asian and American horseshoe crabs*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 185-201.
6. J. W. Shands Jr, *Endotoxin as a pathogenetic mediator of Gram-negative infection*, "Microbiology", n° 2, 1975, p. 330-335.
7. S. Kadis, G. Weinbaum et S. J. Ajl, *Microbial toxins*, vol. V, New York and Londres, Academic Press, 1971.
8. P. A. Tomasulo, *Correlation of Limulus Ameobocyte Lysate assay with accepted endotoxin assays*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 293-302.
9. N. S. Berman, S. E. Siegel, R. Nachum, A. Lipsey et J. Leedom, *Cerebrospinal fluid endotoxin concentrations in Gram-negative bacterial meningitis*, "J. Pediatrics", n° 88, 1976, p. 553-556.
10. J. H. Jorgensen i P. M. Jones, *Comparative evaluation of the limulus assay and the direct Gram stain for detection of significant bacteriuria*, "Amer. J. Clin. Pathol.", n° 63, 1974, p. 142-148.
11. E. E. M. Moody, M. D. Trousdale, J. H. Jorgensen i A. Shelokov, *Bacteriophages and endotoxin in licensed live-virus vaccines*, "J. Infect. Dis.", n° 131, 1975, p. 558-591.
12. B. Barnes i M. Fish, *Chemical meningitis as a complication of isotope cisternography*, "Neurology" (Minneapolis, Minn.), n° 22, 1972, p. 83-91.
13. J. F. Cooper, *Acceptance of the limulus test as an alternative pyrogen test for radiopharmaceuticals and intrathecal drugs*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 345-352.
14. H. F. Oettingen, P. A. Stephenson i M. K. Schwartz, *Toxicity of E. coli L-Asparaginase in man*, "Cancer", n° 25, 1970, p. 253.
15. D. Fumarola i E. Jirillo, *Endotoxin contamination of some commercial preparations used in*

- experimental research*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 379-385.
16. R. J. Elin, W. B. Lundberg i P. J. Schmidt, *Evaluation of bacterial contamination in blood processing*, "Transfusion", n° 15, 1975, p. 260-265.
 17. L. A. Carson, N. J. Petersen i M. S. Favero, *Use of the limulus ameobocyte lysate assay system for detection of bacterial endotoxin in fluids associated with hemodialysis procedures*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 453-464.
 18. J. W. Larsen i J. L. Seer, *Rapid detection of endotoxin in amniotic fluid by the limulus test*, "Gynecol. Invest.", n° 7, 1976, p. 73 et 74.
 19. A. A. Moller-Madsen, T. Mikkelsen i K. Hansen, *Gram-negativt bakterielt endotoxin (lipopolysaccharid) i mælk og mejeriprodukter*, "Statens Forsogsmejeri i Hillerød", n° 240, 1980, p. 5-16. (En danès amb un sumari en anglès.)
 20. N. R. DiLuzio i T. J. Friedmann, *Bacterial endotoxins in the environment*, "Nature", n° 244, 1973, p. 49-51.
 21. I. Hartmann, G. Ziv i A. Saran, *Application of the limulus ameobocyte lysate test to the detection of Gram-negative bacterial endotoxins in normal and mastitic milk*, "Res. in Vet. Sci.", n° 20, 1976, p. 342 et 343.
 22. B. Pernis, E. C. Vigliani, C. Cavagna i M. Finulli, *The role of bacterial endotoxins in occupational diseases caused by inhaling vegetable dusts*, "Brit. J. Indust. Med.", n° 18, 1961, p. 120-129.
 23. T. F. DeMaria i R. Burrell, *Effects of inhaled endotoxin-containing bacteria*, "Environ. Res.", n° 23, 1980, p. 87-97.
 24. R. Rylander i M. Lundholm, *Responses to wastewater exposure with reference to endotoxin*, dins: H. Pahren i W. Jakubowski (editors): *Wastewater aerosols and disease*, p. 90-98, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, 1980.
 25. E. O. Bennett, *The biology of metalworking fluids*, "J. Amer. Soc. Lubrication Engineers", n° 28, 1972, p. 237-247.
 26. M. D. Wort, G. I. Lloyd i J. Schofield, *Microbiological examination of six industrial soluble oil emulsion samples*, "Tribology Int.", febrer 1976, p. 35-37.
 27. K. Sekiguchi i K. Nakamura, *Ecology of the extant horseshoe crabs*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 37-45.
 28. F. C. Pearson i E. Woodland, *The in vitro cultivation of limulus ameobocytes*, "Progress Clin. Biol. Res.", n° 29, 1979, p. 93-102.
 29. T. Mikkelsen, *Pa dolkhalejagt i den Mexicanske Golf*, "Naturens Verden", n° 12, 1981, p. 393-403.