

FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Análisis de la dinámica de un sistema de tratamiento de agua por métodos químicos, microbiológicos y genéticos

Q.F. Mauricia Corona



**Facultad de Química – UDELAR
MAESTRÍA EN QUÍMICA**



Análisis de la dinámica de un sistema de tratamiento de agua por métodos químicos, microbiológicos y genéticos

Q.F. Mauricio Corona

Directora de tesis:

Dra. Matilde Soubes

Tribunal:

Dr. Javier Menes

Dra. Ana Acevedo

Dr. Nelson Dibello

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Matilde, por todo el camino que hemos recorrido, por su apoyo incondicional y su orientación para la realización de este trabajo.

A todos los integrantes del equipo del Centro de Hemodiálisis del Hospital Evangélico, sin quienes este trabajo no hubiera sido posible. Quiero agradecer especialmente al Dr. Nelson Dibello y a la Dra. Wibmer, por su disposición y a Ernesto y Antonio por su apoyo durante todos los muestreos.

A la ANII por el apoyo financiero de gran parte de esta investigación.

A Pedeciba Química.

A los miembros del tribunal: Dr. Javier Menes, Dra. Ana Acevedo y Dr. Nelson Dibello.

A mis compañeros de micro, por todo lo que hemos compartido durante estos años y por el cariño que siempre me brindaron. A todos muchas gracias. Y en especial a Silvana y a Gaby, por todas las mañanas compartidas, por alentarme siempre en esta etapa final y sobretodo por brindarme su amistad.

A Analía, por ayudarme con el Real time, por tu apoyo, tu disposición y enseñanzas, gracias.

A Javier, por sus enseñanzas y aportes con la microscopía de fluorescencia.

A mis compañeras de la comisión y a Ana María, por su apoyo desde allá, siempre.

A mis padres, a mis hermanos Juan y Quiquí, a mi abuela, mis tíos y mis primas, por el cariño y contención que siempre me han dado; especialmente quiero agradecer a mi madre y a mi hermana por estar siempre para apoyarme y por su ayuda incondicional como abuela y como tía, sin ustedes esto no habría sido posible.

A mis amores, Edu y Juli, por estar siempre, por todo el apoyo, confianza y amor incondicional.

A todas aquellas personas que contribuyeron de alguna forma en este trabajo.

GRACIAS!

RESUMEN

El agua purificada se obtiene por aplicación de diferentes procesos unitarios (físicos y químicos) que se combinan en serie, de forma de obtener las características deseadas.

Además del sistema de obtención de agua, el almacenamiento debe hacerse de forma controlada, y el estancamiento debe ser el menor posible. Es por eso que en general se incluye también en el sistema un circuito de recirculación, con algún método de desinfección como ozono o radiación UV.

Más allá de la gran cantidad de estudios realizados sobre la calidad microbiológica del agua, aún quedan varias preguntas por responder. Parte de estas preguntas no han sido respondidas por las deficiencias de los métodos clásicos de cultivo, y también por dificultades en la aplicación de métodos alternativos de análisis.

A los efectos de la realización del siguiente trabajo se seleccionó como modelo un sistema de obtención de agua de un centro de diálisis, que es similar al de obtención de agua purificada para uso farmacéutico y que está regulada por Farmacopeas.

La primera parte del trabajo consistió en el estudio de la situación del sistema mediante la utilización de métodos clásicos de cultivo, se estudiaron las bacterias presentes en el sistema de agua así como también la situación de todos los puntos involucrados en el proceso de hemodiálisis (dializador, líquido de diálisis y concentrados para hemodiálisis) cuando ocurrieron chuchos en pacientes (episodios de presunta endotoxemia) durante la diálisis.

La novedad de la propuesta es que se emplearon simultáneamente métodos clásicos de cultivo, siguiendo las normativas establecidas por organismos nacionales e internacionales, junto con otros métodos de análisis como son técnicas moleculares y citometría de flujo.

Se espera mejorar la sensibilidad de los métodos de detección por métodos de concentración, y PCR en tiempo real de microorganismos de importancia clínica como *Stenotrophomonas maltophilia*.

Con los resultados obtenidos fue posible responder a preguntas tales como:

- 1) ¿En qué medida se subestiman los microorganismos cultivables cuando se emplea PCA o TSA en lugar de R2A en un sistema de tratamiento de agua particular?
- 2) ¿Tienen los microorganismos aislados del agua de entrada y salida del monitor después de producido un chuco en un paciente durante la diálisis, una capacidad de liberación de endotoxinas mayor que otros microorganismos aislados del sistema en otras oportunidades?
- 3) ¿Son eficientes los procesos de desinfección establecidos para el sistema de agua? ¿Y los sistemas empleados para la conservación de los dializadores?

- 4) ¿Existen microorganismos presentes en forma crónica en el sistema de agua? ¿Están distribuidos en todo el sistema o pueden asociarse a un sector en particular (biofilm)?
- 5) ¿Es posible usar metodologías alternativas para un diagnóstico rápido en casos de emergencia (no rutina) como citometría de flujo o PCR en tiempo real?

INDICE DE CONTENIDOS

	<u>Página</u>
Introducción general	1
Objetivos	15
Estrategia de investigación y metodología	17
Capítulo 1	
Resumen	20
Introducción	21
Materiales y métodos	27
Muestreo y acondicionamiento de las muestras	27
Monitoreo inicial del sistema	27
Evaluación de los procesos de sanitización de rutina	30
Población asociada al sistema en biofilms de calerías	30
Resultados y discusión	31
Monitoreo inicial del sistema	31
Evaluación de los procesos de sanitización de rutina	36
Población asociada al sistema en biofilms de calerías	37
Capítulo 2	
Resumen	41
Introducción	42
Materiales y métodos	46
Estudio de las muestras relacionadas con episodios de chucho	46
Estudio de la liberación de pirógenos por efecto de radiación UV	47
Presencia de pirógenos en los distintos puntos del sistema	49
Evaluación de la actividad de solución de conservación en dializadores	49
Resultados y discusión	55
Estudio de las muestras relacionadas con episodios de chucho	55
Estudio de la liberación de pirógenos por efecto de radiación UV	57
Presencia de pirógenos en los distintos puntos del sistema	59
Evaluación de la actividad de solución de conservación en dializadores	61
Capítulo 3	
Resumen	66
Introducción	67
Materiales y métodos	81
Diseño y puesta a punto de los métodos de concentración de agua	81
Citometría de flujo	83
Microscopía de fluorescencia	89

PCR en tiempo real	91
Resultados y discusión	95
Diseño y puesta a punto de los métodos de concentración de agua	95
Citometría de flujo	97
Microscopía de fluorescencia	103
PCR en tiempo real	104
Conclusiones y Perspectivas	111
Anexos	117
Referencias bibliográficas	129

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAMI	Association for Advanced of Medical Instrumentation
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CLSM	Microscopía de Escaneo Láser Confocal
Ct	Threshold cycle
EP	European Pharmacopeia
FNR	Fondo Nacional de Recursos
FRET	Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia
FSC	Forward Scattered Light
INSDC	Internacional Nucleotide Sequence Database Collaboration
IP	Ioduro de Propidio
ISO	International Organization for Standardization
LAL	Limulus Amebocyte Lisate
LD	Líquido de Diálisis
LPS	Lipopolisacáridos
LRW	LAL Reagent Water
MC	MacConkey Agar
MHD	Monitor de hemodiálisis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
R2A	Reasoner 2 agar
RDP	Ribosomal Database Project
SMA	Standard Methods Agar
SSC	Side Scattered Light
TGEA	Agar Triptona Glucosa Extracto de Levadura
TSA	Tryptic Soy Agar
Tm	Melting temperature
TO	Thiazole Orange
UE	Unidades de Endotoxinas
Ufc	Unidades formadoras de colonias
USP	United States Pharmacopeia

INTRODUCCIÓN GENERAL

El agua purificada para distintos usos ya sea farmacéuticos, médicos, o electrónicos, se obtiene por aplicación de diferentes procesos unitarios que se combinan en serie, de forma de obtener las características deseadas.

Dichos procesos incluyen entre otros: intercambio iónico, adsorción (carbón activado), filtración, ósmosis reversa, tratamientos químicos (cloro, ozono, peróxidos, bisulfito de sodio), irradiación (U.V.) y destilación.

El agua purificada según la farmacopea norteamericana podría obtenerse de acuerdo a un esquema como el que sigue (figura 1):

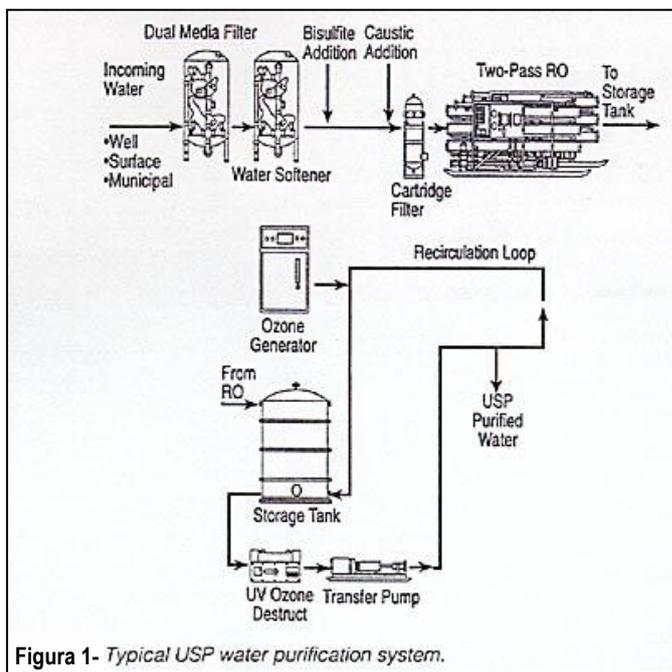


Figura 1- Typical USP water purification system.

Además del sistema de obtención de agua, el almacenamiento debe hacerse de forma controlada, y el estancamiento debe ser el menor posible. Es por eso que en general se incluye también en el sistema un circuito de recirculación, con algún método de desinfección como ozono o radiación ultravioleta tal como se observa en la figura 1.

Más allá de la gran cantidad de estudios realizados sobre la calidad microbiológica del agua, aún quedan varias interrogantes por responder. Parte de estas interrogantes no han sido respondidas por las deficiencias de los métodos clásicos de cultivo, y también por la no utilización de métodos alternativos de análisis.

El modelo elegido para la realización de este trabajo es el sistema de obtención de agua de un centro de diálisis, similar al de obtención de agua purificada para uso farmacéutico y que está regulado por Farmacopeas.

Principios de la hemodiálisis y obtención de agua para hemodiálisis

La hemodiálisis es una técnica de depuración extracorpórea indicada en el tratamiento de pacientes con insuficiencia renal crónica. En el Uruguay el número de pacientes que ingresa anualmente a tratamiento sustitutivo de función renal se ha mantenido estable desde 1995; el último informe establece que el número de pacientes incidentes en el último período registrado (2006-2008) fue de 450 (Sociedad Uruguaya de Nefrología, Fondo Nacional de Recursos, 2008).

La hemodiálisis consiste en la eliminación de los productos de desecho y exceso de agua del organismo, por medio de una membrana semipermeable a través de la cual se realiza el intercambio desde la sangre hacia un líquido dializante. En otras palabras, suple parcialmente las funciones renales de excretar agua y solutos y de regular el equilibrio ácido-base y electrolítico.

El primer “riñón artificial” con aplicación clínica fue diseñado por Kolff en 1930 y desde ese entonces la industria de la fabricación de esta tecnología ha evolucionado admirablemente, diseñando equipos sofisticados, que permiten realizar la preparación del líquido dializante, el control computarizado de todos los parámetros, la ultrafiltración, entre otras funciones; otorgando mayor seguridad y confianza a los pacientes que requieren de este tratamiento.

El principio de la hemodiálisis implica dos principios físico-químicos: el transporte difusivo y el transporte convectivo o ultrafiltración. El primero se trata de un transporte pasivo que ocurre por diferencia de concentraciones de solutos de bajo peso molecular en ambos lados de la membrana. El segundo principio, se trata de un transporte activo generado por efecto de una presión la cual puede ser hidrostática (generada por acción de una bomba situada en el circuito) u osmótica, que va a provocar la transferencia del disolvente (principalmente) y solutos.

❖ *Dializador:*

En el dializador se realiza el intercambio entre plasma y el líquido de diálisis (LD). Los dializadores más usados actualmente son los de capilares, diseñado por Stewart en 1964 (figura 2). Consiste en un filtro de forma cilíndrica constituido por dos compartimientos bien diferenciados separados por una membrana semipermeable. Uno de los compartimientos está formado internamente por una gran cantidad de finísimos capilares o fibras huecas por donde se hace circular la sangre. La pared de dichos capilares es la membrana dializante. El otro compartimiento es el que queda entre estas fibras huecas y las paredes del dializador, y es por donde se hace circular el líquido de diálisis (figura 3). Los dos flujos se conectan de manera que corran en contracorriente con el fin de maximizar la diferencia de concentración de los productos de desecho entre la sangre y el dializado en todos los puntos del filtro dializador. El tamaño de poro de la membrana es tal que sólo pasan iones y moléculas de bajo peso molecular (como urea), sin que se pierdan proteínas y elementos formes de la sangre.

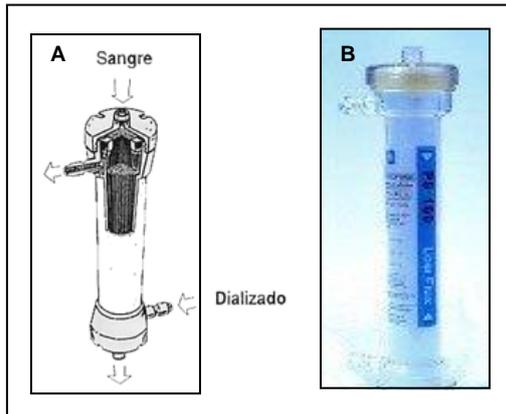


Figura 2- Dializadores.

- A. Representación de un corte de dializador
B. Fotografía de un dializador real.

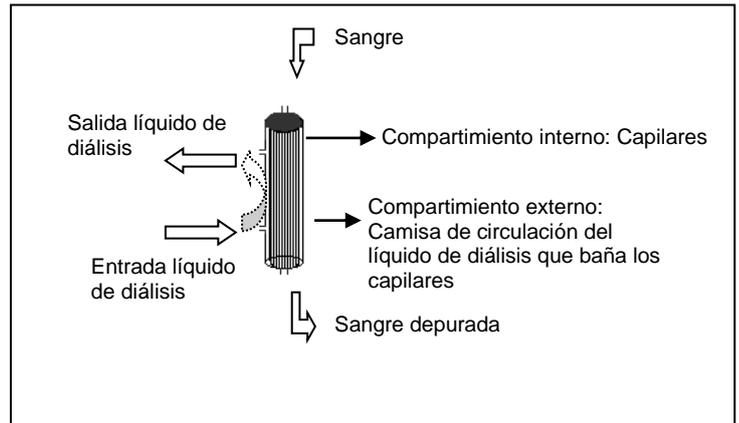


Figura 3- Representación esquemática de dializador y su funcionamiento.

Este tipo de dializador tiene gran superficie dializante (1,3 – 2,1 m²) en un volumen relativamente pequeño. Tiene un mínimo volumen de cebado (cantidad de sangre empleada para cebar el circuito de circulación extracorpórea al iniciar la diálisis), baja resistencia al flujo sanguíneo y excelente control de la ultrafiltración. La mayor desventaja es la formación de coágulos en el interior de los capilares.

❖ *Reutilización del dializador:*

A pesar de tratarse de una práctica inusual en Europa, la reutilización del dializador es una práctica usual en América. Una ventaja potencial en este procedimiento es que aumenta la biocompatibilidad debido a la capa proteica que tapiza la membrana en su primer uso, previniendo la activación del complemento y sus consecuencias. Se han reportado estudios evaluando el material que constituye los dializadores por el ensayo de LAL y los resultados confirman que los dializadores nuevos dan más reacciones positivas que las fibras de reuso, a pesar de que esta propiedad no siempre se correlaciona con una respuesta biológica (Pearson F.C. et al., 1984). Sin embargo la reutilización de dializadores presenta importantes desventajas: pérdida de eficacia depurativa y de la capacidad de ultrafiltración, capacidad potencial de contaminación y riesgo de transmisión de agentes infecciosos.

En el Uruguay el reuso del dializador es una práctica habitual desde el año 1991 en todos los centros de hemodiálisis del país. En el año 2008 el promedio de reuso de dializadores fue de 24 veces (Sociedad Uruguaya de Nefrología, Fondo Nacional de Recursos, 2008); de aquí surge la importancia de contar con métodos seguros de desinfección y conservación de los dializadores.

❖ *Concentrados para diálisis:*

- Concentrado ácido:

Es una solución ácida de sales concentradas, que puede contener dextrosa. Cuando se diluye con agua purificada y con el concentrado de bicarbonato se produce el líquido de diálisis.

- Concentrado de bicarbonato:

Es una solución concentrada de bicarbonato sódico, que cuando se diluye con agua purificada y con el concentrado ácido se obtiene el líquido de diálisis. Algunos concentrados con bicarbonato también contienen cloruro de sodio.

❖ *Líquido de diálisis (LD):*

Se trata de una solución electrolítica preparada extemporáneamente por el monitor de hemodiálisis (MHD) a partir de agua purificada y solutos proporcionados en forma de concentrados electrolíticos. Una sesión normal de hemodiálisis dura aproximadamente 4 horas y se utilizan entre 90 y 140 litros de líquido de diálisis.

La composición del LD así formado es prácticamente isotónica y tiene una composición electrolítica parecida al plasma. La calidad y pureza del LD es uno de los principales requisitos de la técnica de hemodiálisis. De hecho, la presencia de contaminantes en el LD expone al paciente a un riesgo de acumular sustancias tóxicas, dando lugar a complicaciones tanto agudas como crónicas. La pureza y calidad del LD es la consecuencia de una compleja cadena de procesos en la que cualquier error tiene un gran impacto en el producto final. Es por tanto necesario cuidar todos los elementos y pasos necesarios para la producción del LD. Las condiciones de preparación, distribución y almacenamiento deben estar diseñadas para minimizar el riesgo de contaminación química y microbiológica. La norma ISO 11663 "Quality of dialysis fluid for haemodialysis and related therapies" establece requerimientos para la contaminación microbiana en fluidos de hemodiálisis: el recuento de microorganismos viables totales debe ser inferior a 100 ufc/mL y la concentración de endotoxinas menor a 0.5 UE/mL (ISO 11663:2009).

❖ *Monitor:*

La máquina llamada monitor (figura 4) es la que hace la dilución a partir de concentrados de sales (aproximadamente al 4% [v:v]). Las diferencias de sus concentraciones se establecen de acuerdo a los gradientes necesarios para lograr los balances adecuados de cada sustancia, en función de las necesidades del paciente. El sistema se compone de dos circuitos (figura 5): uno sanguíneo y otro de líquido de diálisis o hidráulico. En el circuito sanguíneo, la sangre es impulsada por una bomba desde el acceso vascular del paciente hasta el filtro (línea arterial), retornando al paciente luego de sufrir la depuración (línea venosa). En el circuito hidráulico se produce la mezcla de agua tratada y un concentrado de electrolitos formándose el baño o líquido de diálisis. Este líquido es controlado de manera constante por el monitor en composición, temperatura, flujo, presiones y paso accidental de sangre.

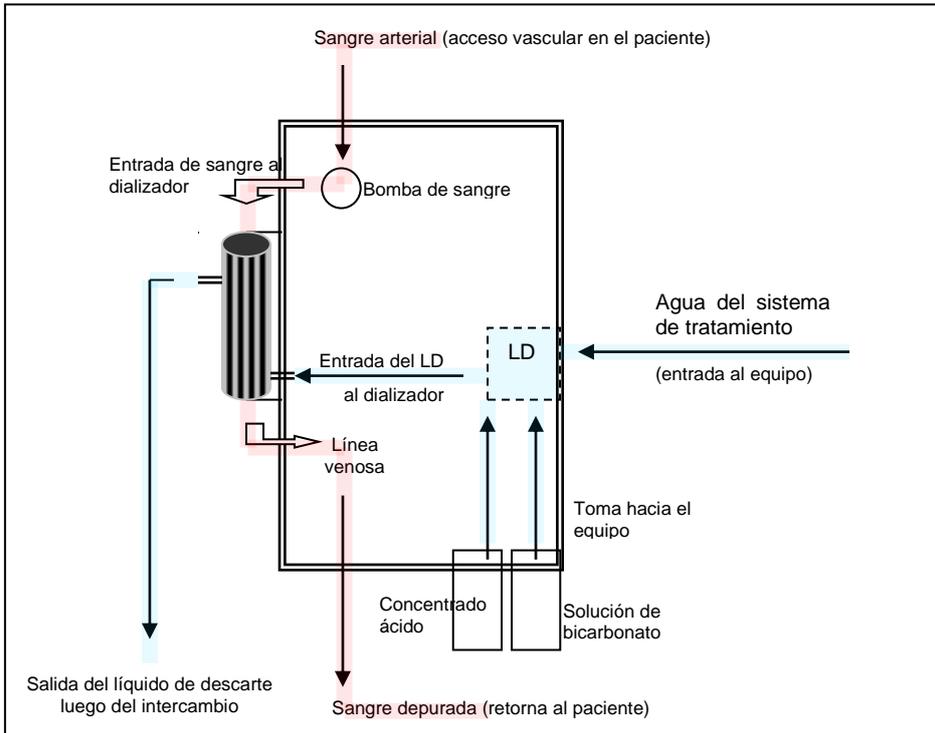


Figura 4- Representación esquemática de un monitor

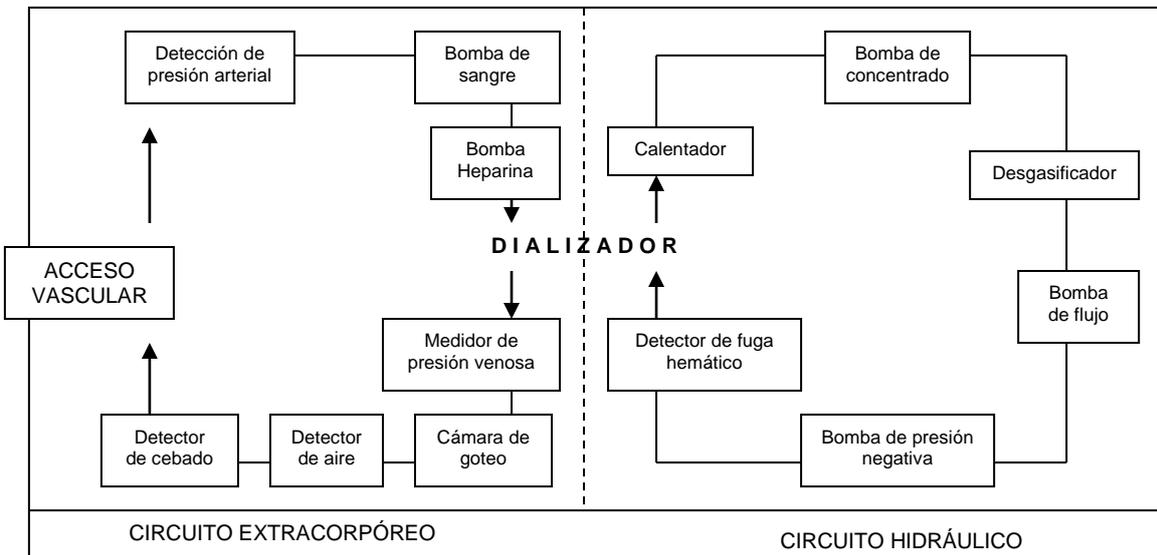


Figura 5- Diagrama de circuitos.

Por lo que antecede el principal insumo de un centro de diálisis es el agua purificada que no es estéril, que se utiliza en grandes cantidades y cuya falla tanto química como microbiológica es la causa de graves trastornos para los pacientes y que pueden incluso producirles la muerte. Es por esta razón que las unidades de hemodiálisis requieren agua de calidad adecuada.

La estrategia para proteger al paciente es la prevención, para lo cual existen guías y normativas que establecen lineamientos a seguir para mantener este tipo de sistemas bajo control.

En nuestro país el organismo encargado de este seguimiento es el Fondo Nacional de Recursos (FNR), de acuerdo a la "Normativa de Cobertura", vigente desde julio de 2006. (Sociedad Uruguaya de Nefrología, Fondo Nacional de Recursos, 2008).

Control de calidad del agua para hemodiálisis

Cada sesión de diálisis emplea aproximadamente unos 120 litros de agua. Todas aquellas sustancias de bajo peso molecular presentes en el agua tienen acceso directo al torrente sanguíneo del paciente como si fueran administradas por vía intravenosa.

El agua de hemodiálisis supone más del 96% del líquido de diálisis que se pone en contacto con el paciente a través del dializador, en una cantidad entre 90 y 140 litros por sesión aproximadamente. Algunos contaminantes del agua se pueden transferir al paciente y acumularse en grandes cantidades. A esto habría que sumar el hecho de que la insuficiencia renal le impide eliminar los contaminantes acumulados, pudiéndole ocasionar al paciente una intoxicación. Al ser el agua el principal componente del LD y el menos estandarizable es uno de los que precisa un mayor control en su producción. Por tal razón, la pureza química y microbiológica del agua de hemodiálisis debe monitorizarse regularmente.

➤ Principales contaminantes:

El agua que se utiliza para la producción del líquido de hemodiálisis contiene cantidades variables de contaminantes: partículas tanto minerales como coloides, sustancias en disolución y microorganismos con sus productos de degradación como es el caso de las endotoxinas.

Es difícil precisar dónde se debe establecer el punto de corte en los niveles de sustancias potencialmente tóxicas en el LD. La AAMI (Association for the Advancement of Medical Instrumentation) fijó sus niveles límite en función de la toxicidad de las sustancias (ANSI/AAMI, RD52:2004). En una primera categoría se incluyeron aquellos solutos que son añadidos en el LD, como el Na, Ca, Mg y K y estos fueron fijados en niveles que no modifiquen la concentración final establecida para el LD; en la segunda categoría se incluyeron las sustancias reguladas por las normas del agua potable, como el arsénico, cadmio, plomo, etc., fijando su límite en un 10% del que establece dicha normativa; y la tercera involucra las sustancias con especial importancia en la intoxicación de los pacientes en diálisis, como las cloraminas o el aluminio, limitando su nivel en función de los valores bajos referidos como tóxicos en la literatura (ANSI/AAMI, 2004).

Existen valores recomendados por los organismos nacionales y regionales que establecen límites químicos y límites microbiológicos y además establecen los niveles de acción respectivos.

Actualmente las dos principales causas de preocupación en cuanto a la contaminación por elementos tóxicos son la presencia de cloro y aluminio en el agua de hemodiálisis (Pérez-García R. and Rodríguez Benítez P., 2000).

El cloro, debido a su gran capacidad oxidante, se añade al agua potable como desinfectante. La cloración del agua se lleva a cabo mediante la adición de cloraminas, compuestos de cloro y amoníaco que pueden encontrarse en forma de monocloraminas, dicloraminas o tricloraminas (NH_2Cl , NHCl_2 y NCl_3). El paso de pequeñas cantidades de cloraminas a la sangre puede condicionar importantes efectos oxidantes siendo el más importante la hemólisis, pero se ha descrito además que con niveles muy bajos aparecería resistencia a la acción de la eritropoyetina que se administra a los pacientes en hemodiálisis. Para prevenir estas complicaciones es necesario la eliminación completa de las cloraminas.

La cloraminas son productos difíciles de medir, por lo que se suele recurrir a estimarlas como la diferencia entre el cloro total y libre, mediante la reacción con DFD N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD), método que resulta poco sensible.

El principal método de eliminación lo constituyen los filtros de carbón activado. El carbón actúa sobre el cloro mediante dos tipos de reacciones: la primera es de tipo físico, eliminando el cloro por adsorción, la segunda es de tipo químico y actúa como catalizador. Otro mecanismo utilizado para la eliminación residual de cloro y de sus compuestos combinados (cloraminas) es el empleo de bisulfito de sodio o metabisulfito de sodio, por tratarse de un excelente agente reductor.

Otro de los temas complejos del líquido de diálisis lo constituye su contenido de aluminio. Éste puede encontrarse en el agua como ión, asociado a sales o bien en forma coloidal, unido a materia orgánica. La intoxicación con aluminio se asocia a osteomalacia, anemia y encefalopatías. El método más eficaz para su eliminación del agua es la ósmosis inversa (Pérez García R. et al., 2004).

En cuanto a la contaminación microbiológica, la mayor parte de las bacterias detectadas en el agua de diálisis corresponden a bacilos Gram negativos, generalmente no fermentadores de glucosa. Utilizando sistemas de identificación diseñados para bacterias de interés clínico los géneros más frecuentemente encontrados son *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacter*, *Moraxella*. Los hongos no son raros en el agua de diálisis aunque su cantidad es más baja que las bacterias. Los hongos más frecuentemente aislados son *Candida parapsilosis* y hongos filamentosos dematiáceos (Sociedad Española de Nefrología, 2006).

Los concentrados, especialmente el de bicarbonato, son medios que se colonizan con bacterias con especial facilidad. Las unidades con circuitos de distribución de este concentrado deben prestar especial atención a su control. El control bacteriológico de los concentrados para diálisis es especialmente difícil de estandarizar ya que los microorganismos que se reproducen en este medio han desarrollado mecanismos de adaptación que dificultan su detección en cultivo. La sensibilidad de la

detección de estas bacterias puede también mejorarse fabricando medios pobres en nutrientes a los que se añaden distintas concentraciones de bicarbonato (Pérez García R. et al., 2004).

Además, hay que tener en cuenta que la contaminación bacteriana es el origen de las endotoxinas y otras sustancias con capacidad pirogénica. Actualmente se conoce que aunque no siempre aparecen reacciones a pirógenos muchos de los pacientes están expuestos a endotoxinas que condicionan una situación inflamatoria crónica, que repercute a la larga en diversos aspectos clínicos de los pacientes (Pérez García R. et al., 1999; Schiff H. et al., 2001). Muchas veces el estímulo se produce con la exposición acumulada durante la sesión de hemodiálisis y además se potencia por otros estímulos coadyuvantes, como pueden ser el complemento, activado por la membrana del dializador. Se ha reportado que se puede observar estimulación de los monocitos con niveles plasmáticos de endotoxinas tan bajos como 0,05 ng/ml (Baurmeister U. et al., 1989).

La situación ideal sería conseguir un líquido de hemodiálisis ultra puro, que solo contenga agua y los componentes necesarios con un grado de pureza como el que se exige para las soluciones para infusión intravenosa. Conseguir un LD con una contaminación bacteriana baja implica que sea así la de sus tres componentes. Una parte fundamental de la biocompatibilidad de la hemodiálisis la constituye el líquido de diálisis y de ahí la importancia de su nivel de calidad (Pérez-García R. et al., 1995; Pectosa et al., 1995; De Francisco A. et al., 2001; Lonnemann G. et al., 1998).

➤ Límites microbiológicos

La tabla I muestra los valores recomendados para bacterias y para endotoxinas por los distintos organismos que oscilan entre 100 y 200 bacterias por mL y entre 0.25 y 2 UE (Unidades de Endotoxinas)/ mL de agua.

Tabla I- Límites permitidos para bacterias y endotoxinas en agua para hemodiálisis.

NORMA	BACTERIAS ufc/mL	ENDOTOXINAS UE/mL (UI)
Farmacopea Europea, EP (European Pharmacopoeia, 2010).	100	0.25
AAMI (USA), (ANSI/AAMI, RD52: 2004).	200	2.0
Asociación de Estándares Canadiense (Canadian Standards Association, 2003).	100	2.0
Farmacopea de estados Unidos USP 34 (United Status Pharmacopoeia, 2011).	100 Ausencia de <i>Ps. aeruginosa</i> / mL	1.0
Sociedad Italiana de nefrología (Italian Society of, N.,2005)	100	0,25
Fondo Nacional de recursos (Uruguay) (Recursos., F.N.d., 2007)	100 Ausencia de <i>Ps. aeruginosa</i> / 10mL	2.0
ISO 13959: 2009	100	0.5

Ufc: unidades formadoras de colonias UE unidades de endotoxinas.

Los valores numéricos para bacterias son similares en las diferentes guías o normas, pero en realidad si se consideran los métodos propuestos para su determinación pueden significar poblaciones bien diferentes.

Además de los límites se establecen las condiciones recomendadas las cuales se indican en la tabla II:

Tabla II- Medios de cultivo y condiciones de incubación para las determinaciones en agua de diálisis según diferentes organizaciones

NORMA	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia, 2010).	TSA	30 a 35 °C	3 - 5 días
AAMI (USA) (ANSI/AAMI, 52: 2004).	TSA	35 a 37 °C	48 horas
Asociación de Estándares Canadiense (Canadian Standards Association, 2003).	TSA, SMA, R2A	35 °C	48 horas
Farmacopea de Estados Unidos USP 34 (United States Pharmacopoeia, 2011)	TSA	30-35 °C	3 - 5 días
Sociedad Italiana de nefrología (Italian Society of N., 2005)	TGEA, R2A	20-23 °C	5 días
Fondo Nacional de recursos (Uruguay) (Recursos., F.N.d., 2007)	TSA, PCA	35 °C	60 - 72 horas
ISO 13959: 2009	TGEA, R2A	17 – 23°C	7 días

TSA: agar tripteína soya, PCA: agar para recuento en placa, TGEA: agar triptona glucosa extracto de levadura, R2A Reasoner 2 agar, SMA: Agar métodos estándar (similar a PCA).

La pregunta sobre cual es el medio y las condiciones de incubación apropiados no ha recibido respuesta consensuada, atribuyéndose en general a los medios ricas incapacidad para recuperar los microorganismos predominantes en el agua (Van der Linde K. et al., 1999)

Es importante por ello conocer el sistema de producción desde un punto de vista microbiológico en cada caso particular. Por otra parte dado que en todos los casos se utilizan agentes antimicrobianos, es posible que muchos de los microorganismos se encuentren dañados por lo que no se recuperan en tiempos de cultivo razonables, subestimándose así su número más allá del medio en el que se incuban.

Sistemas de tratamiento de agua

Como se mencionó anteriormente, entre los distintos elementos de la hemodiálisis uno de los más importantes es el referente a la calidad del agua que se utiliza para la producción del líquido de diálisis, el cual posteriormente realizará el intercambio de agua y solutos con la sangre.

No existe un sistema de tratamiento de agua igual para todas las unidades de diálisis, pues dependerá de la calidad química y bacteriológica del agua de aporte a tratar, su procedencia y posibles variaciones de los elementos disueltos en ella a lo largo del tiempo, limitaciones arquitectónicas, presupuesto económico

y perspectivas de evolución tanto de los propios tratamientos de agua como de las nuevas técnicas de diálisis (Andrysiak P. et al., 2002; Varela C. et al., 2003).

La composición básica de un sistema de tratamiento de agua para hemodiálisis consiste, en términos generales, en un pretratamiento, donde en general se disminuye el contenido de sales presentes en el agua y un tratamiento con osmosis inversa para obtener agua purificada. El pretratamiento usualmente cuenta con un filtro de retención de partículas en suspensión o sedimentos, descalcificador y filtro de carbón o algún otro sistema para la eliminación de cloro; diseñados para las características del agua de aporte. Es importante tener presente los problemas que el mal diseño del pretratamiento puede tener en etapas posteriores: el cloro puede dañar las membranas de osmosis, la presencia de calcio puede saturarlas, dificultando la obtención de agua purificada de forma sistemática.

El sistema de tratamiento propiamente dicho cuenta con membranas de osmosis inversa para asegurar la obtención de agua de las características especificadas para los sistemas de purificación. La instalación de otros elementos posteriores a la osmosis (como radiación UV o generación de ozono) se emplea a modo de protección adicional del sistema y permitir tener un margen de respuesta frente a un desvío en el funcionamiento del sistema sin que éste se encuentre fuera de especificaciones.

➤ **Almacenamiento y distribución del agua:**

El agua almacenada es sumamente vulnerable a contaminación, en especial microbiológica, por lo que en general se intenta minimizar tanto el volumen como el tiempo de almacenamiento. Cuando existan depósitos de agua tratada, estos deben estar herméticamente cerrados, opacos, con la salida de agua por la parte inferior y con filtro de venteo antibacteriano de 0,2 µm. El agua contenida en estos depósitos debe estar sometida a recirculación continuamente.

El agua tratada puede disolver sustancias de los elementos que estén en contacto con ella, por lo que la red de distribución debe estar realizada con materiales que no aporten elementos extraños al agua. No se pueden utilizar cañerías de cobre, hierro o aluminio. Si se utiliza acero inoxidable debe ser de calidad farmacéutica. Estos sistemas presentan la ventaja de que se pueden utilizar métodos de desinfección térmica o química y tienen mayor resistencia a los golpes o tracciones que puedan suceder accidentalmente. En este tipo de cañerías hay que cuidar la forma de realizar las soldaduras, para que no sufran oxidación posterior. Cuando la opción es el empleo de materiales plásticos, hay que tener en cuenta que las uniones (empleadas en los codos para cambiar la dirección de la cañería y en las derivaciones a los monitores y llaves), implican pérdidas de continuidad y generación de intersticios en las cañerías, provocando una velocidad de flujo inferior a la deseada.

La cañería que alimenta al monitor desde la red de distribución deberá considerarse como un elemento más de la propia red de distribución. El agua debe circular a una velocidad tal que minimice los riesgos de contaminación y formación de biofilms (> 1 m/seg). El agua no consumida se hace recircular hacia el tanque de almacenamiento.

➤ **Modelo de sistema empleado para el desarrollo del trabajo:**

El sistema seleccionado para el desarrollo de este trabajo es un sistema típico de obtención de agua purificada y se muestra en el siguiente esquema (figura 6):

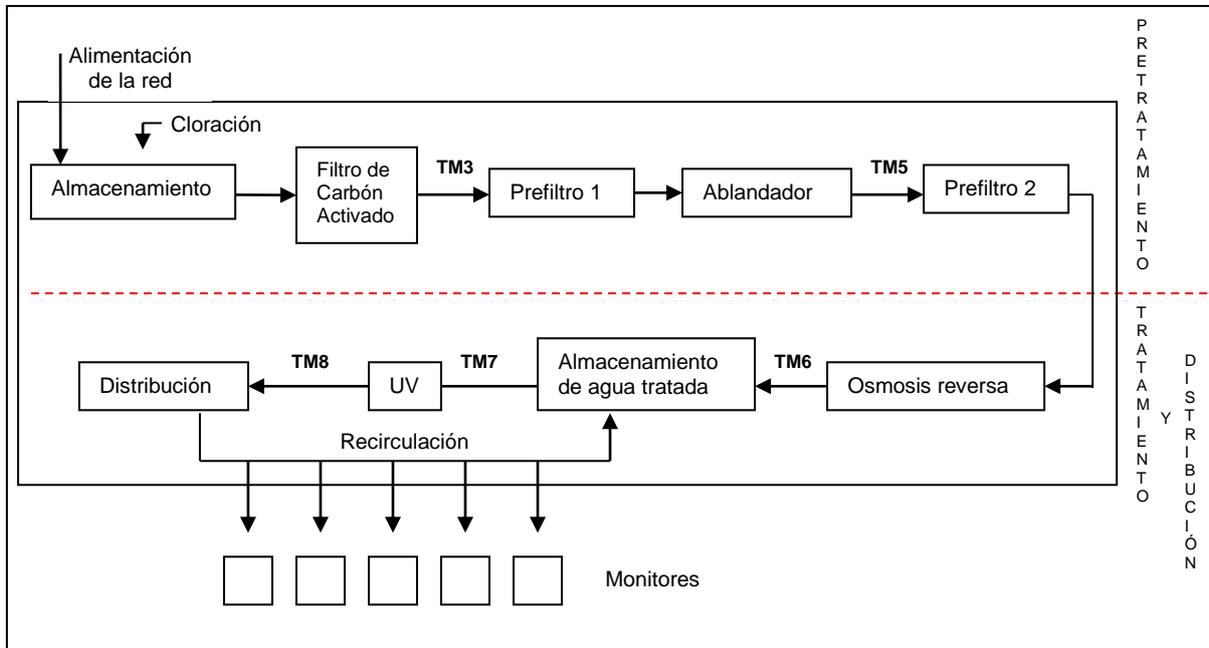


Figura 6 – Representación esquemática del sistema de trabajo.

➤ **Plan de seguimiento y mantenimiento del sistema en cuestión:**

Existe un programa de seguimiento en el que se establece la frecuencia de muestreo para controles químicos y microbiológicos de cada uno de los puntos del sistema y las determinaciones que se deben realizar en cada instancia. También se han establecido las acciones que se deben tomar en caso de obtener resultados fuera de especificaciones. Para la realización de estos controles el sistema está dividido en tres sectores: la sala de lavado (destinada al enjuague de los capilares que van a ser reusados), el sistema de tratamiento (incluyendo el sistema de pretratamiento y el sistema de tratamiento), en el que se controlan los puntos de toma TM3, TM5 y TM8; y finalmente el sistema de distribución. El control de los puntos de salida de la sala de lavado se realiza trimestralmente y los puntos del sistema de tratamiento se analizan mensualmente. En el sistema de distribución se controlan los picos (salidas a las máquinas) de a uno mensualmente, es decir que con cada muestreo mensual de los puntos del sistema de tratamiento se controla un pico y como la sala cuenta con un total de diez picos, el control de cada uno se repite cada diez meses. Los parámetros microbiológicos propuestos son recuento de microorganismos heterótrofos, recuento de coliformes totales y búsqueda de *Pseudomonas aeruginosa*. Los límites de alerta y acción establecidos para el sistema en cuestión se detallan en la siguiente tabla:

Tabla III- Límites para microorganismos heterótrofos.

	Sistema de pretratamiento	Sistema de tratamiento
Límite de alerta	500 ufc/mL	50 ufc/mL
Límite de acción	1000 ufc/mL	200 ufc/mL

Cuando se alcanzan los límites de alerta se realiza una cloración del sistema (1000 ppm) y en caso de alcanzar los límites de acción se realiza formolización (4%) o tratamiento con ácido peracético (1%).

Un factor de riesgo que debe ser considerado a pesar de las precauciones tomadas es la presencia de superficies dentro del sistema de distribución que proporcionan sitios para la adhesión bacteriana y crecimiento celular. La mayoría de estas bacterias pueden usar trazas de nutrientes orgánicos e inorgánicos y multiplicarse para formar biofilms adheridos a la superficie interna de tanques, tuberías o membranas.

➤ **Biofilms en los sistemas de tratamiento de agua:**

Son películas de microorganismos adheridas a las superficies de los sistemas de agua. Los microorganismos de sistemas de bajos nutrientes, como son los de Agua Purificada y Agua para Inyectables, buscan su alimento en las capas adyacentes a las superficies. Los biofilms se describieron por primera vez por Antonie van Leeuwenhoek, pero la teoría sobre el proceso de su desarrollo recién apareció en 1978. Hoy se sabe que los biofilms se producen tanto en ambientes acuáticos como en sistemas industriales, y también en otros ambientes que incluyen los dispositivos médicos. Los métodos de microscopía electrónica permitieron describir la estructura que no es una simple acumulación de células y material polimérico, sino una comunidad compleja que incluye canales de agua y canales de circulación de nutrientes y desechos, compartiendo su hábitat con distintas especies, que aprovechan a su vez los productos no utilizados o eliminados por el/los grupo/s previo/s (Figura 7). Estas comunidades desarrollan aptitudes para facilitar su adhesión a las superficies, retienen partículas orgánicas que les sirven de alimento y las protegen de la agresión de los agentes sanitizantes. Por lo tanto: se nutren mejor, se reproducen más y se defienden mejor.

También se sabe que el aspecto del biofilm depende de la expresión de genes por las células que lo integran (Schulte S. et al., 2005).

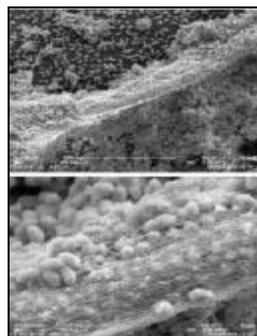


Figura 7. Fotografía de microscopía de barrido de un biofilm (Lasa I. et al., 2005)

El crecimiento y desprendimiento de estos biofilms puede ser responsable de la contaminación de las aguas de hemodiálisis. Los microorganismos creciendo en biofilms desprenden endotoxinas, resisten a los desinfectantes, y también se pueden liberar generando picos de contaminación.

Fragmentos de bacterias generados por algunos biofilms son capaces de cruzar la membrana de diálisis y estimular una respuesta inflamatoria en el paciente. Además los niveles superiores del biofilm, en contacto con el flujo de agua, comienzan a liberar células o trozos del biofilm, que irán a colonizar otros puntos del sistema (Donlan R.M. and Costerton J.W., 2002).

Las bacterias pueden colonizar todo tipo de material, desde acero hasta materiales sintéticos de construcción de las unidades y tuberías, siendo el factor de pulido de los materiales y la velocidad del flujo, además de las características del diseño y operación del sistema, las principales barreras frente a los biofilms.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtener información científica sobre el comportamiento de los microorganismos presentes en un sistema dado de tratamiento de agua, utilizando herramientas químicas, microbiológicas y genéticas combinadas.

Objetivos específicos:

1. Obtener información general del sistema y su comportamiento mediante la realización de un screening primario empleando métodos de cultivo convencionales.
2. Evaluar el sistema de desinfección y conservación empleado para el almacenamiento de dializadores y determinar la eficacia del mismo en las condiciones más críticas.
3. Evaluar la presencia de pirógenos mediante la determinación de endotoxinas bacterianas. Establecer la existencia de alguna correlación entre los recuentos altos de bacterias y la presencia de endotoxinas.
4. Estudiar la posibilidad de emplear métodos alternativos para determinar la carga bacteriana en tiempo real: citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.
5. Detectar la presencia de posibles patógenos asociados al sistema de agua por PCR en tiempo real. La propuesta implica la puesta a punto del método para evaluar su aplicación al sistema en cuestión tomando como modelo un microorganismo reportado como patógeno en estos sistemas.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN Y METODOLOGÍA

A continuación se presenta un resumen de la estrategia de trabajo utilizada para alcanzar los objetivos planteados. El trabajo se dividió en tres partes que implicaron diferentes líneas de investigación.

La primera parte consistió en alcanzar un conocimiento general del sistema para poder evaluar la situación del sistema objeto de trabajo. Se realizaron estudios cuantitativos y cualitativos de la población planctónica presente en el sistema así como también la población asociada al sistema en biofilms en cañerías y tanques de almacenamiento. Los estudios se llevaron a cabo mediante métodos convencionales de cultivo así como también empleando herramientas moleculares de análisis. El conocimiento de la población que forma parte del sistema así como la variación de esta con el transcurso del tiempo y frente a diferentes condiciones, hizo posible evaluar la eficacia de los procesos de sanitización establecidos para el sistema en cuestión.

Durante el tratamiento de hemodiálisis pueden ocurrir reacciones a pirógenos o episodios de chuco, se trata de eventos indeseados con repercusiones sobre los pacientes. Si bien se ha logrado mejorar en gran escala la ocurrencia de este tipo de episodios, tanto en nuestro país como en todo el mundo (Sociedad Uruguaya de Nefrología, Fondo Nacional de Recursos, 2008); es un hecho que estos aún suceden y se considera una prioridad minimizar su incidencia. En el segundo capítulo se realizó un seguimiento y análisis de los episodios de chuco sucedidos en un período determinado. Además del análisis microbiológico de rutina de las muestras involucradas se realizó la identificación de todos los microorganismos recuperados para evaluar la flora asociada con este tipo de eventos y se agregó además la determinación de endotoxinas bacterianas, ya que en muchos casos son causa de estas reacciones en los pacientes.

Si bien la calidad del agua para hemodiálisis constituye un factor fundamental en la seguridad del tratamiento de hemodiálisis, no debe despreciarse la importancia del dializador, en el cual se realiza el intercambio entre plasma y el líquido de diálisis. Esto hace que sea imprescindible el empleo de dializadores en óptimas condiciones, tanto en cuanto a la esterilidad como a la integridad de las fibras. En nuestro país la reutilización del dializador es una práctica habitual, de aquí surge la importancia de contar con métodos seguros de desinfección y conservación de los dializadores. La segunda parte de este capítulo consistió en la evaluación de la actividad de la solución de conservación de dializadores.

El capítulo final de este trabajo se volcó al estudio de técnicas alternativas de análisis, lo que implicó la puesta a punto de estas metodologías, la determinación de la sensibilidad y la evaluación de la aplicabilidad de las mismas al sistema de trabajo. Las técnicas estudiadas fueron citometría de flujo, microscopía de fluorescencia y PCR en tiempo real.

Capítulo 1:
Evaluación de la situación del sistema objeto de estudio

RESUMEN

Esta parte del trabajo consistió en realizar un monitoreo inicial del sistema que permitió evaluar la situación del mismo respecto a las exigencias establecidas y su evolución con el transcurso del tiempo, así como también aspectos cualitativos de la población planctónica mediante la caracterización de cepas obtenidas en diferentes aislamientos del sistema. Este seguimiento permitió además realizar un estudio comparativo empleando diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para poder formar un criterio de selección objetivo entre las diferentes propuestas para el análisis por métodos convencionales. En esta etapa se realizó también el estudio de la población asociada al sistema en biofilms de cañerías y la evaluación de los procesos de sanitización de rutina para el sistema con el fin de determinar su eficiencia.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de purificación de agua, ya sea para uso industrial o para la producción de agua para hemodiálisis están compuestos por una serie de etapas sucesivas que conforman dos grandes procesos: el de pretratamiento y el de tratamiento y distribución.

La figura 1.1 muestra la representación esquemática del sistema empleado como modelo para el desarrollo de nuestro trabajo. Se trata de un sistema típico de tratamiento de agua para hemodiálisis.

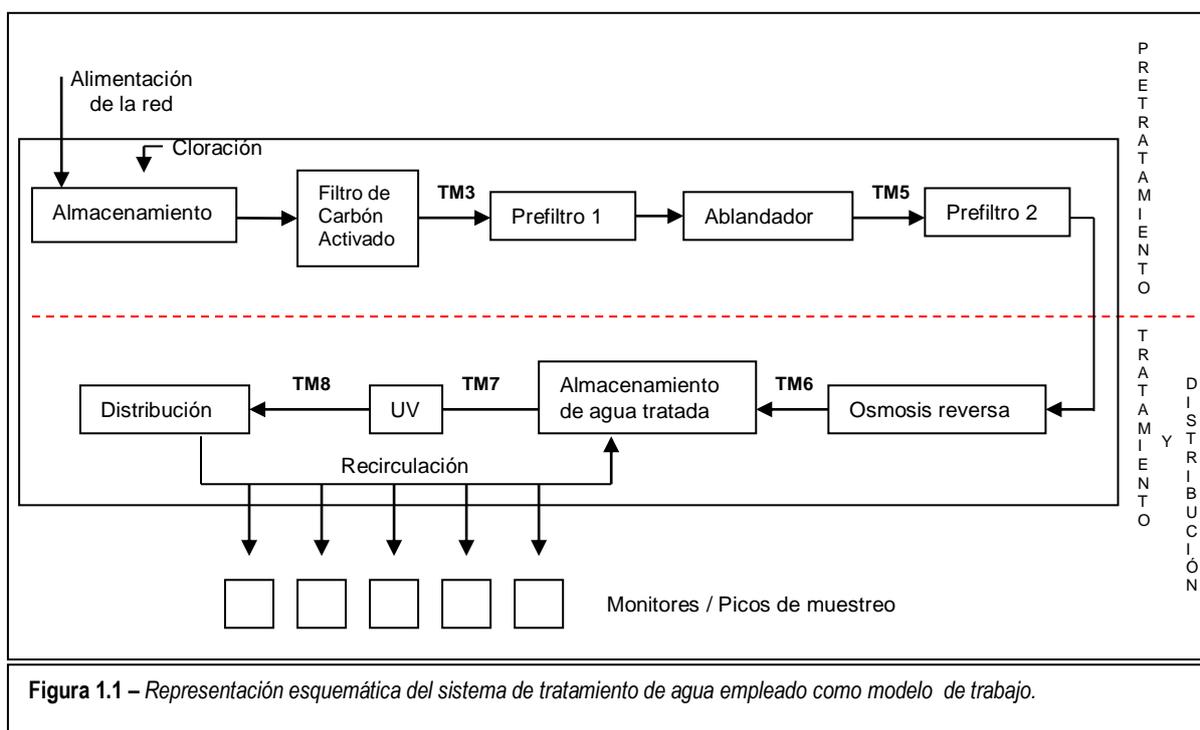


Figura 1.1 – Representación esquemática del sistema de tratamiento de agua empleado como modelo de trabajo.

Existen consideraciones generales para el diseño de sistemas de tratamiento de agua, que deben adoptarse en la mayoría de los casos para lograr la calidad de agua requerida. La manera de asegurar la calidad de agua purificada usada en la mayoría de los sistemas, es mediante el empleo de membranas de ósmosis, los sistemas llamados de pretratamiento son necesarios para tratar el agua que llega a estas membranas con el fin de protegerlas de los componentes usualmente presentes en el agua de red.

La ósmosis inversa es un método de desalinización de agua y retención de microorganismos y endotoxinas, aceptado por la USP como un método de obtención de agua purificada. Esta retención de sales se lleva a cabo por un proceso de tamización, es decir por el paso de agua a través de una membrana semipermeable (generalmente de acetato de celulosa o de poliamidas aromáticas), de un diámetro de poro muy reducido. El fundamento de la ósmosis inversa consiste en aplicar una presión mayor que la presión osmótica en la solución más concentrada, con objeto de que el paso de agua a

través de la membrana sea de la solución más concentrada a la menos concentrada, impidiendo la membrana, el paso de la mayor parte de las sales y demás sustancias que contiene el agua (Lerín I. et al., 1999).

Otra consideración importante es mantener el agua en constante movimiento, de manera de evitar zonas de estancamiento, ya que proporcionan condiciones favorables para la contaminación microbiológica y formación de biofilms. La selección del material para la instalación del sistema debe hacerse cuidadosamente ya que posteriormente tendrá incidencia sobre las condiciones de limpieza y sanitización y el rango de temperatura al cual se podrá someter (Kulakov L.A. et al., 2002).

El grado de pureza del agua obtenida en un sistema de tratamiento está determinada por tres parámetros: químico, microbiológico y biológico; los cuales deben cumplir con especificaciones establecidas que determinan la calidad del agua que se desea obtener. La contaminación bacteriana en sistemas de agua para hemodiálisis es el mayor problema en la terapia de sustitución renal. Muchas bacterias se han adaptado a estos ambientes con una concentración limitada de nutrientes y temperaturas controladas. Además, la contaminación microbiana está claramente relacionada con las reacciones por pirógenos en los pacientes. Tomando en cuenta esta situación junto con el hecho de que el agua constituye el principal componente del líquido de diálisis, se han establecido ciertos criterios de calidad para garantizar la seguridad del paciente. Para esto existen guías y normativas que establecen lineamientos a seguir para mantener este tipo de sistemas bajo control. (Pérez García R. et al., 2004).

Un aspecto crítico en los sistemas de purificación de agua lo constituye la desinfección. Resulta muy difícil hacer recomendaciones generales al respecto debido a que cada sistema en su conjunto tiene muchas variables que podrían afectar el funcionamiento, fundamentalmente las membranas de ósmosis. La frecuencia para la desinfección del sistema puede ser establecida por el centro siempre que se pueda probar que en esas condiciones no existirán apartamientos de las especificaciones. De todas maneras siempre es una buena estrategia situarse en las "peores condiciones" para lograr un sistema seguro. La selección del desinfectante a usar debe hacerse considerando muchas variantes propias del sistema. En teoría la posibilidad de alternar entre diferentes desinfectantes es un buen procedimiento para abarcar un mayor espectro de bacterias sensibles y una acción más eficiente sobre los biofilms (Layman-Amato R., 1995).

Para el sistema objeto de trabajo el protocolo de desinfección del sistema establece que se realiza con una frecuencia mensual la cloración de cañerías, picos de salas de diálisis, de lavado y aparatos; mientras que se realiza semanalmente la cloración de los picos de salas de lavado como práctica usual para mantener el sistema bajo control.

Para llevar a cabo el monitoreo del sistema deben establecerse límites de alerta y de acción. Estos límites deben ser determinados teniendo en consideración que el objetivo principal es detectar condiciones que se alejen del comportamiento habitual del sistema bajo control. Generalmente estos límites se establecen

a partir de valores históricos que no necesariamente coinciden con los límites de aceptación recomendados por las normativas vigentes.

Para el sistema modelo de nuestro trabajo, el protocolo establece que cuando se alcanzan los límites de alerta (Tabla 1.1) se realiza una cloración del sistema (1000ppm) y en caso de alcanzar los límites de acción se realiza formolización (4%) o tratamiento con ácido peracético (1%).

Tabla 1.1- Límites para microorganismos heterótrofos establecidos por el centro de diálisis.

	Sistema de pretratamiento	Sistema de tratamiento
Límite de alerta	500 ufc/mL	50 ufc/mL
Límite de acción	1000 ufc/mL	200 ufc/mL

Un problema potencial en los sistemas de tratamiento de agua es la formación de biofilms. Se trata de comunidades bacterianas adheridas a una superficie y unidas entre sí por una matriz polimérica producto de su propia síntesis.

Los microorganismos que forman parte de un biofilm tienen la capacidad de responder de manera conjunta a las situaciones de estrés y las oportunidades. Estas comunidades pueden establecerse y desarrollarse a partir de un simple microorganismo conduciendo a la formación de una amplia población microbiana que tiende a ser heterogénea en lo que refiere a su población, estructura, superficie y fisiología. La composición de los biofilms se va modificando con el transcurso del tiempo. Estudios realizados sobre biofilms alojados en membranas de ósmosis inversa revelaron el cambio continuo en la población predominante en dichas comunidades, poniendo en evidencia la dinámica de los mismos (Bereschenko L.A. et al., 2010).

Cualquier sistema de agua que se encuentre expuesto a la presencia de microorganismos, por pequeña que esta sea, en mayor o menor tiempo estos microorganismos formarán biofilms. El único sitio en el cual aún no se ha comprobado la presencia de biofilms es en los dializadores, ya sea porque son de un único uso o en el caso de reuso de los mismos por recibir un método de desinfección sumamente riguroso (Pasmore M. et al., 2011).

Existen múltiples problemas en la detección de la presencia de biofilms en un sistema, el primero de ellos radica en las dificultades de muestreo. El muestreo implica un procedimiento destructivo del sistema, lo ideal sería fraccionar secciones del sistema de manera de acceder al interior de las superficies para analizar el biofilm utilizando técnica de Microscopía de Escaneo Láser Confocal (CLSM). En la mayoría de los casos un muestreo destructivo no es viable, y la alternativa consiste en hisopar o “raspar” las superficies y realizar un análisis por cultivo convencional o imagenología. De todos modos este muestreo tampoco es del todo viable debido a que la mayoría de las superficies internas del sistema son inaccesibles. A pesar de estas dificultades, la presencia de biofilms en un sistema se pone en evidencia

por la liberación intermitente e impredecible de microorganismos y endotoxinas. Si se detecta esta tendencia deberían emplearse métodos de sanitización y limpieza para remover los biofilms.

Los sistemas de biofilms son sistemas dinámicos que continuamente están cambiando y adaptándose a las nuevas condiciones. Si un biofilm no es eliminado completamente, las bacterias remanentes tendrán el potencial de adaptarse, ya sea por selección de nuevos organismos tolerantes o por mutaciones. Aún si el biofilm es destruido pero no removido, tanto los pirógenos como el biofilm “muerto”, proporcionarán un sitio potencial para ser recolonizado por nuevas bacterias; y este proceso tomará solamente una fracción del tiempo que llevó la formación del biofilm original sobre una superficie limpia. Es por estas razones la gran variabilidad que existe en la eficiencia de los agentes desinfectantes, ya que dependerá de la localización del biofilm y el estado fisiológico de las células que constituyen esa comunidad en ese momento. Como no es posible tener un conocimiento tan profundo del sistema, es necesario contar con un seguimiento estricto del mismo para conocer su comportamiento frente a los diferentes procesos y establecer protocolos estándares a seguir, los cuales serán propios de cada sistema de tratamiento (Schulte S. et al., 2005).

La mejor estrategia frente a este problema es minimizar las posibilidades de formación de biofilms. Esto implica contar con procedimientos de desinfección que establezcan barreras, es decir, destruir los microorganismos contaminantes antes de que puedan colonizar cualquier superficie y desarrollar un biofilm (Pasmore M. et al., 2011).

Propuesta de trabajo:

Para conocer la situación desde el punto de vista microbiológico del sistema se propuso realizar un seguimiento del mismo durante un período de 12 meses y de manera coordinada con el calendario de controles establecido por el centro de diálisis, de forma de no afectar las actividades normales de éste. Los protocolos de seguimiento y control en los centros de diálisis únicamente consideran los métodos convencionales de cultivo para el recuento de bacterias en el sistema sin especificar las especies bacterianas presentes. Sin embargo, el monitoreo no se limitó únicamente a los análisis de rutina. Como primera excepción, los recuentos fueron realizados en los distintos medios de cultivo y condiciones que proponen las diferentes organizaciones que establecen las normativas de control, para poder realizar un estudio comparativo entre los resultados obtenidos con cada medio de cultivo, con el fin de lograr un primer aporte para la selección de las condiciones de análisis más adecuadas (Tabla 1.2). Además, se llevó a cabo la identificación de aquellos microorganismos aislados en los diferentes puntos de muestreo, lo cual nos permitió tener conocimiento de aspectos cualitativos de la población planctónica, así como también evaluar el efecto de los desinfectantes sobre el sistema de tratamiento y distribución.

Para realizar la identificación de los microorganismos aislados del sistema se comenzó con el empleo de técnicas microbiológicas convencionales que se basan en características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en que la identificación fenotípica requiere mucho tiempo, resulta difícil o incluso

imposible, como es el caso de bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan a las de ningún género o especie reconocida o bacterias de crecimiento lento, lo que retrasa considerablemente la identificación convencional (Rodicio M.C. et al., 2004). En estas circunstancias, la identificación molecular representa una herramienta fundamental. Los métodos moleculares empleados consisten básicamente en la amplificación de ADN por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), secuenciación del amplicón y análisis de la secuencia. El análisis más ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas es el de los ARNr 16S o del gen que lo codifica (ADNr 16S). El gen ADNr 16S consiste en una secuencia de 1500 pares de bases altamente conservadas, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen también regiones hipervariables que se encuentran en sitios específicos.

Una vez determinada la secuencia nucleotídica, debe realizarse la comparación de la misma con las depositadas en bases de datos; y será el grado de similitud entre las secuencias lo que indique su relación evolutiva (Petti C.A., 2007; Rodicio M.C. et al., 2004).

Tabla 1.2- Medios de cultivo y condiciones de incubación para las determinaciones en agua de diálisis según diferentes organizaciones

NORMA	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia, 2010).	TSA	30 a 35 °C	3 - 5 días
AAMI (USA) (ANSI/AAMI RD52: 2004).	TSA	35 a 37 °C	48 horas
Asociación de Estándares Canadiense (Canadian Standards Association, 2003).	TSA, SMA, R2A	35 °C	48 horas
Farmacopea de Estados Unidos USP 34 (United Status Pharmacopoeia, 2011)	TSA	30-35 °C	3 - 5 días
Sociedad Italiana de nefrología (Italian Society of, N.,2005)	TGEA, R2A	20-23 °C	5 días
Fondo Nacional de recursos (Uruguay) (Recursos., F.N.d., 2007)	TSA, PCA	35 °C	60 - 72 horas
ISO 13959: 2009	TGEA, R2A	17 – 23°C	7 días

TSA: agar tripteina soya, PCA: agar para recuento en placa, TGEA: agar triptona glucosa extracto de levadura, R2A Reasoner 2 agar, SMA Agar métodos estándar es igual al PCA .

Análisis de la población asociada al sistema en biofilms de cañerías:

El cambio de cañerías del sistema de distribución de agua purificada correspondió a un procedimiento extraordinario como parte del mantenimiento del sistema. Ante la ocurrencia de este incidente circunstancial, fue posible el muestreo de la superficie interna de sectores críticos del sistema de cañerías como ser codos y uniones para la salida de picos, para analizar la posible flora bacteriana allí presente.

La metodología más ampliamente utilizada para el análisis de biofilms es la Microscopía de Barrido Láser Confocal (CLSM), ya que permite el estudio de la estructura del mismo. Se trata de una técnica no destructiva y no invasiva que permite resolver imágenes tridimensionales de biofilms, aportando datos cualitativos y cuantitativos acerca de los microorganismos que constituyen estas comunidades (Mueller L.N. et al., 2006). Sin embargo, se trata de una tecnología costosa y por lo tanto poco accesible. En nuestro caso se realizó el cultivo de las muestras obtenidas por hisopado de dichas superficies.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo y acondicionamiento de muestras

A los efectos de la realización del presente trabajo se seleccionó como modelo el sistema de obtención de agua del centro de diálisis del Hospital Evangélico.

Durante la etapa de screening se realizó el muestreo completo tanto de los puntos del sistema de pretratamiento como del sistema de tratamiento y se muestreó aleatoriamente los picos del sistema de distribución (Figura 1.1).

Para la toma de muestras, los puntos de muestreo fueron sanitizados empleando alcohol 70% permitiendo después su completa evaporación. Las muestras se recogieron después de dejar correr el chorro de agua durante 1 minuto, empleando bolsas estériles Nasco® de capacidad 300 mL. Las bolsas conteniendo las muestras fueron refrigerados durante el traslado y hasta el momento de su procesamiento (2 – 8 °C). Las muestras no fueron almacenadas en ningún caso por un período superior a 24 horas.

2. Monitoreo inicial del sistema:

El seguimiento del sistema se extendió por un período de 12 meses de muestreos regulares de acuerdo al plan establecido por el centro, involucrando también los muestreos realizados para el control del sistema en casos de apartamientos detectados durante el seguimiento regular, alcanzando un total de 45 muestras procesadas en dicho período. Esto hizo posible el seguimiento del sistema a lo largo de las cuatro estaciones del año para evaluar su comportamiento y la posibilidad de asociar este factor como causa probable de estas variaciones.

Los medios de cultivo empleados para los recuentos fueron: Tryptic Soy Agar (TSA, Difco™) y Plate Count Agar (PCA, Difco™); Reasoner 2 Agar (R2A, Difco™) y MacConkey Agar (MC, Difco™) (*Anexo 1*). Los tres primeros medios fueron seleccionados con base en indicaciones de organismos regulatorios; siendo el TSA y PCA medios ricos y el R2A un medio mínimo que simula mejor las condiciones de este tipo de sistemas y por lo tanto se espera obtener una mejor recuperación (van der Linde K. et al., 1999). El medio selectivo fue seleccionado con el fin de favorecer el crecimiento de los microorganismos patógenos desde el punto de vista clínico de mayor relevancia para este sistema en particular (principalmente *Stenotrophomonas maltophilia*). Dado que el organismo regulatorio en nuestro país recomienda el empleo de los medios de cultivos PCA o TSA de manera indistinta, se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos en los recuentos empleando paralelamente PCA y R2A, con el fin de evaluar las diferencias en la recuperación entre un medio rico un medio mínimo como el R2A.

Todos los recuentos se realizaron empleando el método de filtración por membrana, empleando para ello membranas estériles de 0.45µm, 47mm de diámetro (Millipore, Cat. No. HAWG047S6), equipos de filtración Nalguene (250 mL) y bomba de vacío Sartorius (16694-2-50-06) 6L/min. / 230V.

En todos los puntos del sistema de tratamiento se realizaron los análisis sobre 100 mL de muestra con el fin de lograr recuperar incluso aquellos microorganismos que se encuentran presentes en el sistema en bajo número, partiendo de la base de que se trata de un sistema de purificación de agua para hemodiálisis que cumple con las especificaciones establecidas para tal fin. Para el sistema de pre-tratamiento se realizaron además los recuentos sobre 1mL de muestra.

Sin perjuicio de lo que indican las metodologías citadas en la tabla 1.2, se realizó la lectura de las placas de recuento en todos los medios de cultivo al cabo de 72 horas de incubación a 32.5 ± 2.5 °C y se continuó incubando hasta 5 días a esta temperatura. En el caso de los recuentos realizados en R2A las placas se continuaron incubando 5 días más a 22.5 ± 2.5 °C (condición recomendada para este medio de cultivo).

Tratamiento estadístico de los datos:

Se empleó una transformación de los datos en sus correspondientes logaritmos para que se cumpliera una distribución normal. El supuesto de normalidad se comprobó empleando la prueba de Shapiro – Wilks (González B, 2006).

Para evaluar la existencia o no de diferencias significativas entre ambos medios de cultivo se empleó la prueba t de Student ($p \leq 0.05$) para dos muestras dependientes (pareadas) (Pértega S. et al., 2001; Morales P., 2009; Rodríguez A. et al., 2003).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando los programas Microsoft Excel (1997) e InfoStat/L (Di Rienzo J.A. et al., 2009).

➤ *Aspectos cualitativos de la población planctónica:*

Se realizó el aislamiento de las bacterias recuperadas en todos los puntos de toma del sistema de tratamiento y distribución (Figura 1.1) a partir de muestras tomadas en instancias previas y posteriores a un proceso de desinfección seleccionado aleatoriamente, con el fin de obtener un muestreo representativo de los diferentes estadios del sistema. La selección de los microorganismos que fueron identificados se basó en las características morfológicas de las colonias y la observación microscópica de los mismos. Se identificaron aquellos microorganismos que presentaron una población mayoritaria en cada uno de los aislamientos. Para la caracterización fenotípica de dichas cepas se realizó la observación microscópica de las colonias aisladas y las pruebas primarias, empleando posteriormente sistemas comerciales de identificación (BD BBL™ Oxi/Ferm™ Tube II; BD BBL™ Enterotube™ II) (Anexos 4 y 5), basados en pruebas bioquímicas.

Caracterización molecular:

Se realizó la secuenciación del gen ARNr 16S de los distintos microorganismos recuperados en aquellos casos en que no fue posible identificarlos mediante los métodos convencionales citados anteriormente.

Extracción de ADN:

Para la caracterización molecular de las cepas seleccionadas, se prepararon suspensiones en suero fisiológico a partir de cultivos de 24 horas en R2A de cada una de las cepas aisladas. A partir de estas suspensiones se realizó la extracción y purificación de ADN empleando el kit comercial AppliChem® *Geno/mini DNA Isolation Spin Kit* siguiendo el procedimiento establecido por este (*Anexo 2*).

Amplificación del gen 16S ARNr:

Todas las amplificaciones por PCR fueron realizadas en un termociclador Corbett RESEARCH Model CG1-96, empleando primers universales para Eubacteria Eub 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') y EUB 1525R (3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5'). El ciclo térmico empleado para la amplificación se detalla a continuación: etapa inicial de desnaturalización a 94 °C 5min., 30 ciclos de 94 °C 1min., 55 °C 1min., 72°C 3 min. y una etapa de elongación final de 72 °C 7 min. En la mezcla de reacción (25µL) se agregó 5 µL de la muestra de extracción de ADN, 2.5µL Buffer TM 10X, 1 µL MgCl₂ 50mM, 1µL dNTP 5 mM (*biolabs*TM), 1µL de cada primer 5 µM, 0.1 µL Taq 5U/µL (*Invitrogen*TM). La cantidad de agua miliQ agregada en cada caso fue la suficiente para completar el volumen total de 25 µL.

Se observó el producto obtenido por electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE (Tris-borate-EDTA) 0.5x, teñido con bromuro de etidio y utilizando el marcador de peso molecular GeneRulerTM 1kb Ladder (250-10000bp).

Secuenciación del gen 16S ARNr:

La purificación y secuenciación de los fragmentos amplificados fueron realizadas por MACROGEN (Kumchun-ku, Saoul, Korea). Se realizó el ensamblaje de las secuencias empleando el Vector NTI y fueron comparadas por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) utilizando la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para la clasificación taxonómica de las cepas secuenciadas se empleó además el RDP (Ribosomal Database Project) (rdp.cme.msu.edu), para verificar la identidad de las cepas secuenciadas de acuerdo al INSDC (Internacional Nucleotide Sequence Database Collaboration: DDBJ, EMBL and GeneBank) (www.insdc.org).

3. Evaluación de los procesos de sanitización de rutina:

Se realizaron muestreos previos y posteriores a las instancias predeterminadas para la desinfección del sistema. Se tomaron muestras de los puntos TM3, TM5, TM6, TM7 y TM8 (Figura 1.1) para obtener resultados representativos del sistema de pretratamiento así como del sistema de tratamiento y recirculación. Para evaluar los procesos de sanitización, es importante tener datos objetivos de la acción del agente sobre cada componente del sistema, ya que se espera que cada uno tenga una población asociada diferente, por lo menos entre el sistema de pretratamiento (filtro de carbón activado y ablandador) y el sistema de tratamiento y recirculación (membranas de ósmosis, tanques de almacenamiento y cañerías posteriores a la lámpara UV).

Este análisis de evaluación del proceso de sanitización se realizó en dos oportunidades de forma independiente (con una diferencia de seis meses entre cada una).

El análisis y seguimiento de las muestras se realizó de manera similar al "*Monitoreo inicial del sistema*", pero empleando únicamente los medios no selectivos (TSA, R2A y PCA).

4. Población asociada al sistema en biofilms de cañerías:

Una vez realizado el cambio de cañerías del sistema, se procedió a la toma de muestras sobre las unidades extraídas. Se realizó hisopado de aquellas superficies consideradas importantes (codos y juntas) de las cañerías extraídas del sistema y cultivo de los mismos. El medio de cultivo empleado para la recuperación de microorganismos fue R2A. Las placas se incubaron a 32.5 ± 2.5 °C durante 5 días.

Posteriormente se llevó a cabo la identificación de los microorganismos aislados en esta instancia mediante pruebas bioquímicas. Sobre los cultivos obtenidos se realizó frotis, tinción de Gram, pruebas primarias (oxidasa y catalasa) y se sembraron kits comerciales de identificación *Enterotube*® y *Oxiferm*® (Anexos 4 y 5). Solamente en uno de los casos la bacteria fue identificada por métodos moleculares de acuerdo a lo establecido anteriormente para "*Aspectos cualitativos de la población planctónica, Caracterización Molecular*".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Monitoreo inicial del sistema:

Los resultados para las 45 muestras de los distintos puntos del sistema se presentan en la figura 1.2, donde se indica con la línea horizontal el límite de aceptación. Para realizar el monitoreo se realizaron los recuentos correspondientes a cada punto del sistema empleando diferentes medios de cultivo (R2A, PCA y TSA); el análisis de los resultados se realizó tomando los valores más altos obtenidos para cada punto en cada instancia de muestreo, es decir, posicionándonos en el peor escenario. En estas condiciones, únicamente una de las muestras del sistema de tratamiento arrojó resultados por encima del nivel de alerta establecido por el centro de diálisis para el sistema en cuestión, pero de todas maneras no supera el límite de acción establecido (200 ufc/mL). El resto de las muestras con valores que sobrepasan las 50 ufc/mL pertenecen en todos los casos a puntos del sistema de pretratamiento (TM3 y TM5), cuyo nivel de alerta está establecido en 500 ufc/mL, y por lo tanto no se trata de un apartamiento.

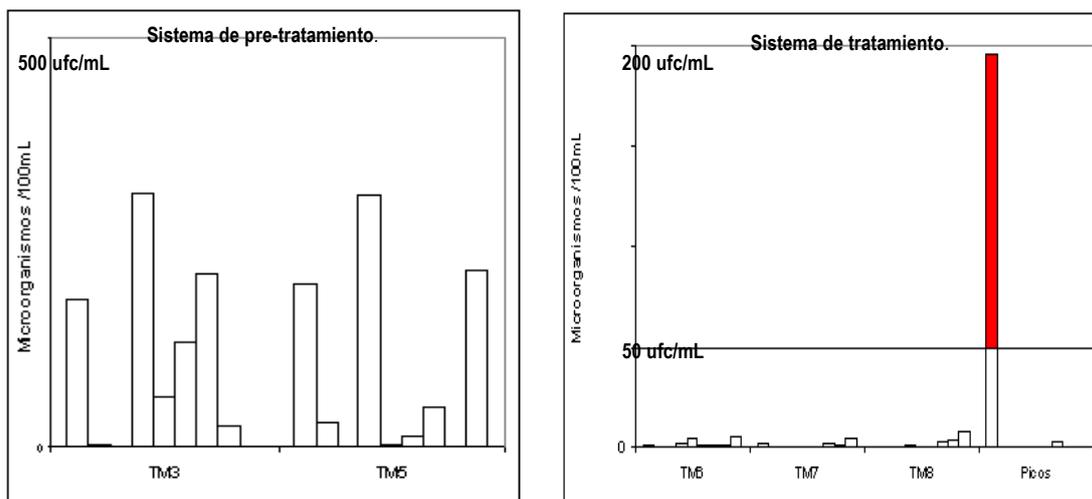


Figura 1.2- Recuento de microorganismos aerobios de los puntos de control del sistema por métodos convencionales.

TM3: Carbón activado; TM5: Ablandador; TM6: Ósmosis reversa; TM7: Almacenamiento; TM8: UV.

➤ Estudio comparativo de los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo:

En la figura 1.3 se puede observar la representación gráfica de los resultados obtenidos una vez transformados los valores de recuento obtenidos en sus correspondientes logaritmos, para todas las muestras analizadas en ambos medios de cultivo.

Se realizaron treinta y seis ensayos comparativos para evaluar los resultados obtenidos con los diferentes medios de cultivo empleados para el monitoreo primario del sistema (se descartaron aquellos valores de recuento en que las condiciones del análisis no fueron similares para ambos medios, por ejemplo los casos en los que se sembraron volúmenes diferentes en cada uno de los medios de cultivo). Con base en los resultados obtenidos, los recuentos en todos los medios de cultivo se extendieron hasta 5 días, ya que se pudo observar que en la mayoría de las determinaciones existían diferencias entre los recuentos realizados a las 48 – 72 horas de incubación y los recuentos leídos a los 5 días, para ambos medios. Por lo tanto todos los resultados evaluados en esta instancia corresponden a cultivos de los diferentes medios que fueron incubados durante 5 días.

Es importante destacar también que no se obtuvieron diferencias en los recuentos tras la incubación de las placas de R2A a $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ durante 5 días adicionales, respecto a los obtenidos al cabo de la incubación a $32,5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

En ningún caso se logró buena recuperación para el medio selectivo seleccionado (MacConkey Agar).

El análisis estadístico de los resultados reflejó que no hay diferencias significativas entre los recuentos en R2A y PCA, por lo que el uso de R2A no ofrece ventajas desde el punto de vista sanitario. Sin perjuicio de estos resultados, las determinaciones realizadas en los capítulos siguientes se llevaron a cabo utilizando el medio de cultivo R2A, a efectos de poder comparar los resultados con la bibliografía disponible.

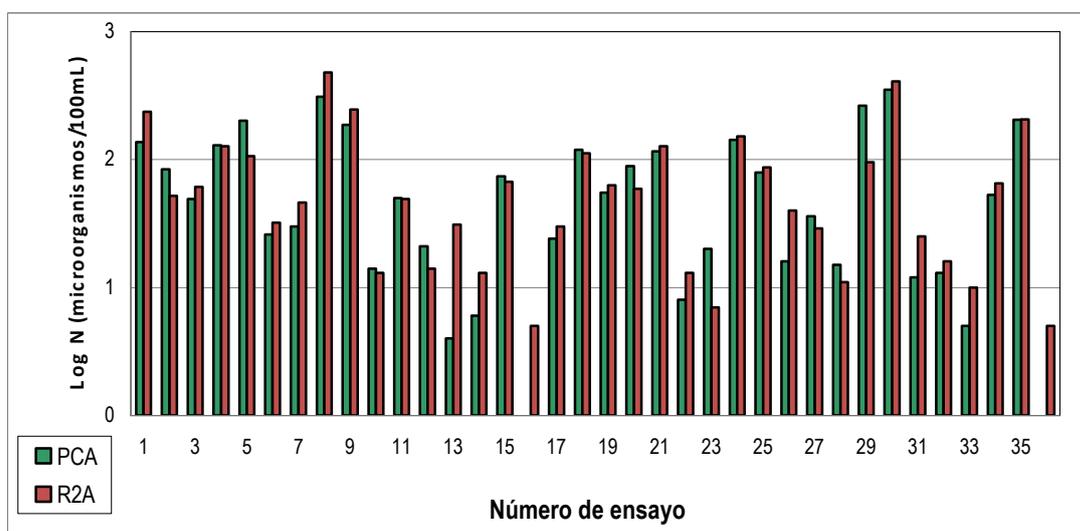


Figura 1.3- Comparación de medios de cultivo (PCA y R2A). Resultados de recuentos obtenidos en ensayos independientes empleando los dos medios de cultivo.

Nota: Los valores correspondientes al ensayo N°16 y al ensayo N°35 están sobre el eje de la gráfica

➤ *Evolución del sistema en el transcurso del tiempo:*

Se realizó un seguimiento de las variaciones en el sistema con el transcurso del tiempo para evaluar el comportamiento del mismo en las diferentes estaciones del año (Figura 1.4).

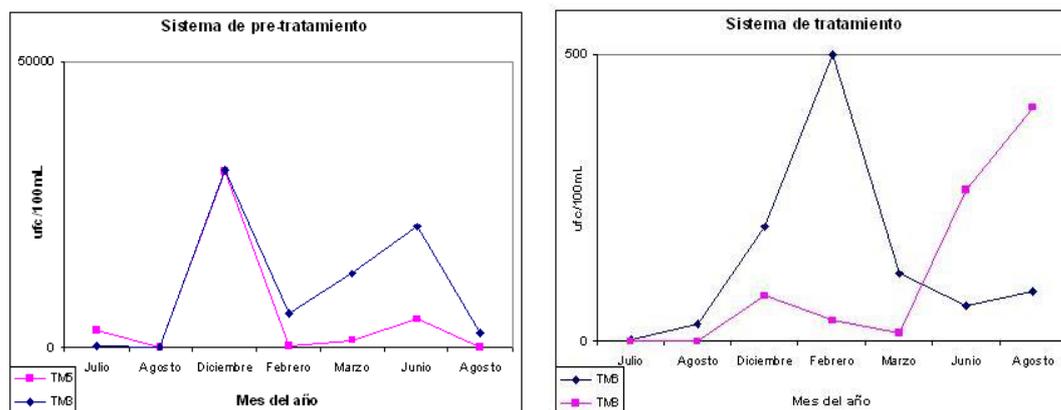


Figura 1.4- Evolución de la población de microorganismos presentes en los sistemas de pretratamiento y tratamiento con el transcurso del tiempo. Los resultados que se muestran por mes corresponden al mismo día de muestreo en ambas figuras.

En los dos puntos de muestreo pertenecientes al sistema de pretratamiento, TM3 (post-carbón activado) y TM5 (post ablandador) se observó un pico en el mes de diciembre. Para el punto TM6 (post ósmosis), perteneciente al sistema de tratamiento el pico se observó en el mes de febrero. En los tres puntos el aumento en los recuentos coincide con los meses de verano. Sin embargo, esta tendencia no se mantiene al analizar los resultados obtenidos en el punto de muestreo TM8 (post UV), donde se observa un aumento muy leve en el mes de diciembre. La situación en este punto del sistema es diferente, ya que se pone de manifiesto un aumento en la población al transcurrir el segundo año de muestreo.

Los recuentos en el sistema de pretratamiento (puntos TM3 y TM5) ascienden a cifras 100 veces mayores que los obtenidos en el sistema de tratamiento (puntos TM6 y TM8), hecho que se atribuye a la presencia de las membranas de ósmosis reversa.

En todos los puntos se tomó en cuenta los resultados obtenidos en el medio de cultivo que arrojó los resultados más desfavorables para cada caso en particular.

➤ *Aspectos cualitativos de la población planctónica:*

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la identificación de los microorganismos recuperados en el sistema de tratamiento previa y posteriormente a una instancia de desinfección. Las tablas 1.2 y 1.3 muestran aquellos microorganismos que fueron identificados por métodos convencionales y por métodos moleculares respectivamente. En todos los casos se obtuvo una buena identificación, por lo menos a nivel de género, sin resultados atípicos.

Tabla 1.2- Identificación de aislamientos del sistema de tratamiento por métodos clásicos

Clasificación	Bacteria	Método de identificación	Punto de muestreo ^a		Número cepas	Reporte ^b
			Previo	Posterior		
β -proteobacteria	<i>Burkholderia cepacia</i>	Oxiferm®	TM7		2	Si (1)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Oxiferm®	TM8	TM7	2	Si (2)
γ -proteobacteria	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Enterotubo®	TM7		1	Si (3)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Enterotubo / Oxiferm®	TM6		1	Si (4)
Flavobacteria	<i>Flavobacterium sp.</i>	Oxiferm®	TM8		3	Si (5)

a Muestréos de rutina (previo y posterior a una instancia de desinfección)

b Bacteria reportada en este tipo de sistemas

(1) Magalhaes M. et al., 2003; Souza A.V. et al., 2004; Bereschenko L.A. et al., 2008; Kulakov L.A. et al., 2002; Oliveira Lima J.R. et al., 2005; (2) Bereschenko L.A. et al., 2008; Bueno Montanari L. et al., 2009; Oliveira Lima J.R. et al., 2005; (3) Gomila M. et al., 2005; (4) Gomila M. et al., 2005; Kulakov L.A. et al., 2002; Bueno Montanari L. et al., 2009; Oliveira Lima J.R. et al., 2005; (5) Bereschenko L.A. et al., 2008; Kulakov L.A. et al., 2002.

Tabla 1.3- Identificación de aislamientos del sistema de tratamiento por métodos moleculares

Clasificación	Bacteria	%sm ^a	Ln ^b	Punto de muestreo ^c		Selección ^d		Número cepas	Reporte ^e	
				Previo	Post	macro	micro			
α -proteobacteria	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	99	1393	TM6				10	No	
				TM7		Si	Si			
				TM8						
α -proteobacteria	<i>Caulobacter vibrioides</i>	99	1395	TM6	TM6		Si	3	Si (6)	
	<i>Sphingopyxis macrogoltabida</i>	98	1397		TM6	Si		1	No	
β -proteobacteria	<i>Ralstonia pickettii</i>	99	1461		TM8	Si		2	Si (7)	
							Picos			Si
					TM6	Si				2

a % de similitud con especies reconocidas

b Longitud de la secuencia nucleotídica

c Muestréos de rutina (previo y posterior a una instancia de desinfección)

d Selección de los aislamientos (por características de colonias o características microscópicas)

e Bacteria reportada en este tipo de sistemas

(6) Gomila M. et al., 2005; (7) Kulakov L.A. et al., 2002; Oliveira Lima J.R. et al., 2005; (8) Bereschenko L.A. et al., 2008; Gomila M. et al., 2005.

En todos los casos el porcentaje de similitud entre la secuencia de los microorganismos aislados del sistema y las secuencias de especies reconocidas contra las que se compararon las primeras, fue del 99%. Este porcentaje de identidad entre las secuencias de ARNr 16S se considera aceptable para establecer relaciones a nivel de especies. No obstante, hay que tener en cuenta que es la comparación de genomas completos y no la comparación de los ARNr 16S de las bacterias lo que confirma la identidad (Rodicio M.C. et al., 2004).

Mediante el análisis molecular de las cepas aisladas del sistema, se identificaron dos microorganismos de los que no se encontraron antecedentes en sistemas de esta naturaleza: *Methylobacterium radiotolerans* y *Sphingopyxis macrogoltabida*, aunque otras especies del género *Sphingopyxis* si se han reportado en sistemas similares (Kulakov L.A. et al., 2002; Gomila M. et al., 2005).

Methylobacterium radiotolerans se trata de un microorganismo novedoso para nuestro trabajo ya que no ha sido reportado anteriormente en este tipo de sistemas, aunque si se ha reportado en sistemas de tratamiento y distribución de agua potable así como en tanques de almacenamiento (Hiraishi A. et al., 1995; Reasoner D.J. et al., 1989). Es un bastón Gram negativo esporulado, que forma colonias bien características en TSA y R2A, pequeñas, redondas, rosadas y brillantes; propiedad que lo hace fácilmente detectable. Se identificó mediante la secuenciación del gen 16S ARNr dado que no se logró la identificación por métodos fenotípicos convencionales. Las bacterias de este género son aerobias estrictas y el color característico de sus colonias se debe a la presencia de carotenoides. Otra propiedad que presenta esta bacteria es su crecimiento lento, lo cual coincide con reportes anteriores (Hiraishi A. et al., 1995; Rice E.W. et al., 2000). Las condiciones de cultivo indicadas por la AAMI (Association for Advanced of Medical Instrumentation) implican el uso de medio de cultivo TSA y la incubación de las placas durante 48 horas, este período se considera insuficiente para la recuperación de este microorganismo. Nuestros resultados indican que el tiempo de incubación necesario para la recuperación del mismo es de 5 días, esto se confirmó para la totalidad de los aislamientos realizados. Esta podría ser una razón por la cual esta bacteria no ha sido detectada en este tipo de sistemas, ya que muchos procedimientos estándar se basan en recomendaciones internacionales que establecen como condición para el recuento de bacterias heterótrofas la incubación durante 48 horas.

Esta bacteria se aisló no solamente en el sistema de tratamiento y distribución (Tabla 1.3), sino que los primeros aislamientos obtenidos de ella correspondieron a los puntos de toma TM3 y TM5 del sistema de pretratamiento (estos datos no se muestran en la tabla) y su recuperación fue constante en varios puntos del sistema durante todo el período de muestreo (se aisló en 19 oportunidades). Debido al color característico de la colonia fue posible identificarlo fácilmente, identidad que fue confirmada en cada caso mediante un frotis.

La permanencia de esta bacteria en el sistema a lo largo del tiempo, pone en evidencia su resistencia a los sistemas de desinfección así como también a la radiación ultravioleta. De hecho los microorganismos del género *Methylobacterium* también han sido reportados como resistentes a la cloración (Hiraishi A. et al., 1995). De todas formas, esta bacteria se encontró en todos los casos en proporción minoritaria respecto a los demás microorganismos cultivables.

Sphingopyxis macrogoltabida se trata de un bastón Gram negativo, no esporulado, móvil; el cual originalmente fue clasificado dentro del género *Sphingomonas* (Takeuchi M. et al., 2001; Lee M. et al., 2008). En un estudio realizado acerca de la formación de biofilms sobre membranas de ósmosis inversa, se demostró la presencia de bacterias pertenecientes al género *Sphingomonas* en la totalidad de las

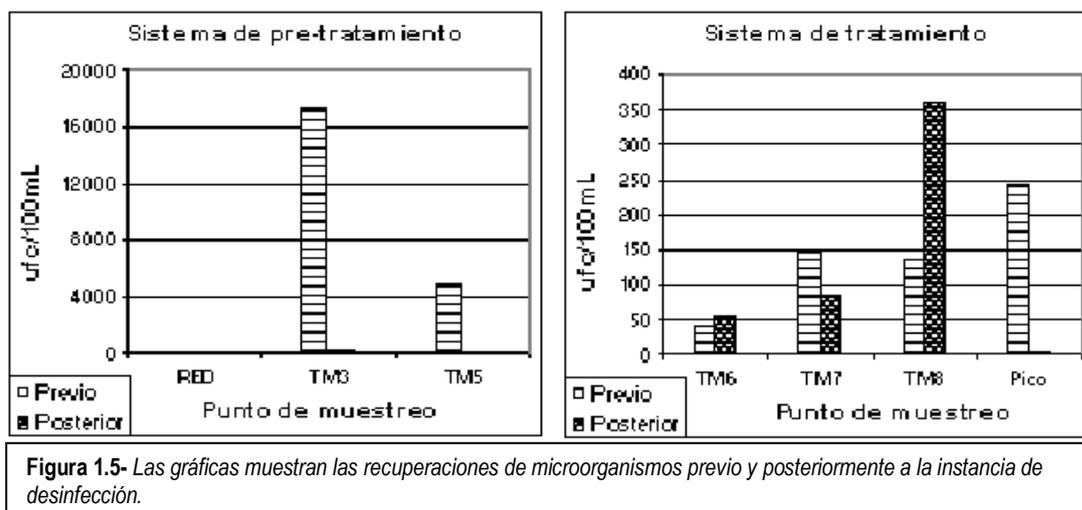
muestras aisladas, lo que puede explicarse por la propiedad de estos microorganismos de asociación a las superficies (Bereschenko L.A. et al., 2008). Bacterias del género *Sphingopyxis* están típicamente presentes en suelo y agua y algunas especies han sido reportadas en sistemas de distribución de agua potable para el consumo (Takeuchi M. et al., 2001; Tokajian S. et al., 2008) así como también en sistemas de purificación de agua.

El resto de las cepas aisladas que fueron identificadas tanto por métodos convencionales como por métodos moleculares corresponden a especies que ya fueron reportadas en sistemas de purificación de agua y algunos de ellos como patógenos clínicos, como es el caso de *Stenotrophomonas maltophilia*, que además se caracteriza por su resistencia a varios agentes antimicrobianos de amplio espectro (Rodríguez C. et al., 2007; Antón D. et al., 2005), *Burkholderia cepacia* (Magalhaes et al., 2003) y patógenos oportunistas como *Ralstonia pickettii* y *Pseudomonas sp.* (Sancho-Chust J.N. et al., 2010).

2. Evaluación de procesos de sanitización de rutina

La figura 1.5 muestra una disminución importante en la población asociada al sistema de pretratamiento frente a un procedimiento rutinario de sanitización. En los puntos del sistema de tratamiento no se observaron grandes cambios en los recuentos bacterianos, igualmente los recuentos de microorganismos en el sistema de tratamiento se mantienen en todos los casos muy por debajo de las especificaciones establecidas para este. Para el caso de los picos (puntos de salida al paciente) se vuelve a observar una disminución en la población, aunque no tan pronunciada como la del sistema de pretratamiento. Estos resultados fueron consistentes en los dos ensayos realizados de forma independiente.

A pesar de no observarse una gran disminución en el número de bacterias en el sistema de tratamiento tras una instancia de desinfección, si se observó una variación en la población asociada a cada punto de muestreo (Tablas 1.2 y 1.3). Los microorganismos aislados en los diferentes puntos del sistema luego del proceso de sanitización, no son los mismos que los que se recuperaron en instancias previas, con excepción de *Caulobacter vibroides*, recuperado en el punto TM6; por lo tanto su presencia no se podría asociar con una resistencia por parte de la flora microbiana presente, más bien se trata de una recolonización del sistema, debido al constante flujo de agua en un sistema dinámico.



3. Población asociada al sistema en biofilms de cañerías:

En este ensayo se realizó la recuperación de microorganismos por métodos convencionales, por lo tanto debemos tener en cuenta que se evaluó únicamente una fracción de la población asociada al sistema en biofilms, constituida por microorganismos cultivables.

En la tabla 1.4 se detallan las secciones analizadas en cada punto y los resultados de las pruebas para dichas muestras.

La mayor diversidad de colonias recuperadas en las placas de cultivo, se observó en la salida de los tanques de agua tratada. En todos los casos se trató de bacterias Gram negativas. Las bacterias identificadas en este sector del sistema fueron *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter lwoffii* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Las muestras extraídas de las cañerías que formaban parte del sistema de distribución en las salas demostraron una población más homogénea, identificándose en todos los casos *Acinetobacter lwoffii* y *Methylobacterium radiotolerans*. Se analizó también uno de los picos de sala, en esta salida se aisló además una población importante de bacterias oxidasa positivo, identificándose en todos los casos bacterias del género *Pseudomonas*.

Las canillas, codos y caños posteriores al UV no arrojaron crecimiento, lo cual sugiere una vez más la gran eficiencia de este sistema para destruir microorganismos presentes en el agua.

Tabla 1.4- Población asociada a distintos puntos del sistema

Punto del sistema	Muestras		Método de identificación	Microorganismos identificados
	Punto de muestreo correspondiente	Sección analizada		
Salidas de tanques de agua tratada	TM7	Codo con canilla	Ocifer®	<i>Burkholderia cepacia</i>
			Enterotubo® / Oxifer®	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
			Enterotubo®	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
Canillas, codos, caños post- UV	TM8	Codo corto	---	No se observa crecimiento
		Codo con canilla	---	No se observa crecimiento
Sistema de distribución	---	Codo con canilla	Enterotubo® Secuenciación ARNr 16s	<i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Methylobacterium radiotolerans</i>
Canilla de sala	Picos	Codo en T	Oxifer®	<i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas alcaligenes</i>

Tanto la *Stenotrophomonas maltophilia*, recuperada en las cañerías a la salida de los tanques de agua tratada, como las dos especies de *Pseudomonas* (*Pseudomonas acidovorans* y *Pseudomonas alcaligenes*) aisladas de picos de salida del sistema a los monitores; no fueron recuperadas como parte de la población planctónica en los muestreos realizados sobre el sistema en funcionamiento. Esto podría ser un indicio de la presencia de estos microorganismos como parte de biofilms asociados a las cañerías. *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter lwoffii* fueron recuperadas en la salida de los tanques de agua tratada. Este resultado es consistente con los muestreos realizados durante el estudio de aspectos cualitativos de la población asociada al sistema, ya que ambos microorganismos fueron recuperados durante muestreos realizados del sistema en el punto TM7 (salida de los tanques de almacenamiento), previamente a una instancia de desinfección, pero no se recuperaron inmediatamente después de realizado este procedimiento. Esto podría sugerir que estos microorganismos son parte de la comunidad microbiana que constituye el biofilm en ese sitio, pero además forman parte de la población planctónica propia del sistema y por lo tanto su presencia no sería consecuencia del desprendimiento de biofilms por causa del proceso de sanitización; dado que en el muestreo realizado enseguida de la desinfección no se recuperaron. Se ha reportado la presencia de *Acinetobacter lwoffii* en biofilms naturales, donde se pone de manifiesto la formación de biofilms en asociación con otros microorganismos y el efecto de sinergia producido por esta combinación (Burmolle M. et al., 2006). Estudios realizados sobre la constitución de biofilms alojados en membranas de filtración de un sistema de potabilización de agua, demostraron la presencia de *Acinetobacter lwoffii*, *Burkholderia cepacia*, *Brevundimonas vesicularis* y *Stenotrophomonas maltophilia* en dicha estructura (Su F. et al., 2009); lo que demuestra una gran similitud con la población recuperada tras el análisis de la sección de cañerías correspondiente a la salida de los tanques de agua tratada. Esto podría ser un indicio de la acción de sinergia que presenta la asociación de estos microorganismos proporcionando características de estabilidad y resistencia a la estructura del biofilm.

No debería dejarse de lado en este análisis el hecho de que la comunidad bacteriana que constituye un biofilm en sus primeras etapas de formación está sujeta a cambios permanentes. En estudios de biofilms formados sobre membranas de ósmosis inversa en sistemas de purificación de agua se ha reportado la modificación constante que sufren estas comunidades a corto plazo y su permanencia en el transcurso del tiempo. Los análisis realizados a los 4, 8 y 16 días desde el momento en que comienza el proceso de formación del biofilm demostraron que el grupo de bacterias dominante en cada momento es bien diferente, sin embargo al cabo de un tiempo de establecido el biofilm la estructura permanece constante incluso durante años (Chen C.-L. et al., 2004; Bereschenko L.A. et al., 2010).

En sistemas de tratamiento y distribución de agua potable se han identificado mediante métodos moleculares bacterias de los géneros *Sphingomonas*, *Porphyrobacter*, *Sphingopyxis*, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Methylophilus*, *Acidovorax*, *Bosea* (Liu W.-T., 2010). Sin embargo, trabajos realizados sobre la caracterización de biofilms en membranas de ósmosis inversa de sistemas de purificación de agua, reportan una población mucho más amplia de microorganismos que forman parte de biofilms, que incluye los géneros *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Janthinobacterium*, *Nitrosomonas*, *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Legionella*, *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, *Stenotrophomonas*, *Bosea*, *Caulobacter*, *Bacillus*, *Staphylococcus* (Bereschenko L.A. et al., 2008; Chen C.-L. et al., 2004).

Los microorganismos recuperados de los aislamientos realizados de la superficie interna de las cañerías del sistema de trabajo, constituyen únicamente una fracción de los mencionados anteriormente. Bacterias de los géneros *Flavobacterium sp.*, *Acidovorax spp.*, *Pseudomonas sp.*, que fueron aisladas en distintos puntos del sistema de tratamiento y que han sido reportados anteriormente en estudios de biofilms en sistemas de tratamiento de agua, no se recuperaron de los sitios seleccionados para el análisis de cañerías. Sin embargo, esto no necesariamente refleja la diversidad en una comunidad microbiana que constituye un biofilm dado que en los sistemas oligotróficos, los métodos de cultivo estándar únicamente permiten obtener una pequeña fracción del total.

Capítulo 2:
Estudio de procedimientos con importancia clínica

RESUMEN

Las reacciones a pirógenos o episodios de chucho en hemodiálisis se definen por la aparición de escalofríos y/o fiebre en un paciente, sin signos ni síntomas de infección antes de la sesión de diálisis.

Las manifestaciones comienzan generalmente durante el transcurso de la sesión.

Se realizó un estudio de las muestras relacionadas con episodios de chucho en pacientes, eventos que podrían deberse al pasaje de pirógenos a la sangre. Por esta razón no solamente se realizó un análisis microbiológico sobre dichas muestras sino también la determinación de endotoxinas bacterianas por el ensayo de coagulación de *Limulus Amebocyte Lisate* (LAL).

Se realizaron además, ensayos para estudiar la posible liberación de pirógenos por efecto de la luz UV que forma parte del sistema de tratamiento.

Finalmente se llevó a cabo la evaluación de la actividad de la solución de conservación de dializadores de reuso, ya que se trata de una práctica habitual en nuestro país y podría ser una de las causas asignables a los episodios de chucho.

INTRODUCCIÓN

En los primeros años de la hemodiálisis, uno de los principales problemas durante las sesiones, era la aparición de las reacciones a pirógenos, también llamados episodios de chucho. Sin embargo, mediante el avance de la ciencia y la tecnología dedicadas al mejoramiento de la terapia de sustitución renal, se ha logrado alcanzar en la actualidad sistemas más seguros, permitiendo un mayor control de todo el proceso reduciendo considerablemente la incidencia de complicaciones originadas por esta causa.

El Fondo Nacional de Recursos, como organismo regulador en nuestro país, cuenta con un programa de vigilancia de las reacciones pirógenas y las medidas de intervención. Se recomienda hacer un seguimiento para correlacionar ocurrencia de chuchos con el recuento bacteriano y el resultado de hemocultivos; así como las medidas correctivas tomadas analizando cada situación en particular (Fondo Nacional de Recursos, 2005).

Clásicamente se ha considerado a las endotoxinas bacterianas como los principales responsables de las reacciones a pirógenos, aunque actualmente se reconoce el importante papel que juegan también otros componentes de la pared celular como los peptidoglicanos y muramilo péptidos, y las exotoxinas. Las endotoxinas son moléculas de superficie que están presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. En términos químicos las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) con una región terminal (Lípido A) muy conservada entre las especies y una cadena polisacárida compuesta por una región específica (Antígeno-O) y una región más conservada, la cual tiene una estructura básicamente similar en las diferentes bacterias. La región O-específica se caracteriza por unidades de oligosacáridos repetitivas características de cada bacteria, y es esencial para inducir la respuesta inmune. Luego de la lisis bacteriana, los LPS se vuelven biológicamente activos, y la unidad responsable de esta propiedad es el lípido A. (Binding M. et al., 2003).

Las endotoxinas bacterianas producto de la lisis de estas bacterias son moléculas pequeñas que pueden atravesar la membrana del dializador y pasar a la sangre. Una vez en la sangre, y en presencia del complemento y otros componentes del plasma, inducen la producción de citoquinas por los monocitos, que podrían ser las responsables de la sintomatología. (Torregrosa I. et al., 1998).

La determinación de endotoxinas bacterianas se realiza generalmente mediante el test de *Limulus Amebocyte Lisate* (LAL), y puede realizarse mediante gel – clot o gelificación que se basa en la capacidad de estas sustancias para formar un coágulo estable; turbidimetría, basado en la capacidad que tienen las endotoxinas para reaccionar con sustratos endógenos que se escinden generando turbidez y colorimétricos, que suponen una modificación del anterior y cuya base es la capacidad de endotoxinas para reaccionar con sustancias que desarrollan color. El método empleado habitualmente es el gel-clot. Esta prueba es muy específica pero no muy sensible, detecta

lipopolisacáridos bacterianos pero no la fracción de lípido A libre ni otros pirógenos de pequeño tamaño. Existen otros métodos de detección de contaminación por endotoxinas basados en su actividad inmunogénica, como son: la producción de citoquinas por monocitos o neutrófilos o el marcaje isotópico y la determinación de anticuerpos anti-endotoxinas (Pérez García R. et al., 2004).

Las normativas de calidad de agua tratada para hemodiálisis establecen recomendaciones de límites microbiológicos y límites para endotoxinas fijadas por los diferentes organismos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1- Límites permitidos para bacterias y endotoxinas en agua para hemodiálisis.

NORMA	BACTERIAS ufc/mL	ENDOTOXINAS UE/mL (UI)
Farmacopea Europea, EP (European Pharmacopoeia, 2010).	100	0.25
AAMI (USA), (ANSI/AAMI, 2004).	200	2.0
Asociación de Estándares Canadiense (Canadian Standards Association, 2003).	100	2.0
Farmacopea de estados Unidos USP 34 (United Status Pharmacopoeia, 2011)	100 Ausencia de <i>Ps. aeruginosa</i> / mL	1.0
Sociedad Italiana de nefrología (Italian Society of, N.,2005)	100	0,25
Fondo Nacional de recursos (Uruguay) (Recursos., F.N.d., 2007)	100 Ausencia de <i>Ps. aeruginosa</i> / 10 mL	2.0
ISO 13959: 2009	100	0.5

Ufc: unidades formadoras de colonias UE unidades de endotoxinas.

En el presente trabajo se procedió al seguimiento de las muestras de manera coordinada realizando el ensayo de LAL paralelamente al recuento de la población bacteriana con el fin de establecer la existencia de una posible correlación entre ambos parámetros; ya que se debe tener en cuenta que la contaminación bacteriana es el origen de las endotoxinas y otras sustancias con capacidad pirogénica.

La información obtenida a partir de este estudio es de gran importancia como una opción para el monitoreo rutinario del funcionamiento del sistema.

Estudio de la liberación de pirógenos por efecto de la radiación ultravioleta:

La luz ultravioleta es la porción del espectro electromagnético que se encuentra entre los rayos X y la luz visible. Se han definido cuatro regiones del espectro UV: 100 - 200nm (UV vacío), 200 - 280nm (UVC), 280 - 315nm (UVB) y 315 - 400nm (UVA) (Wright H.B. et al., 2001). La aplicación práctica de la desinfección UV se basa en la capacidad germicida de UVC y UVB (longitudes de onda inferiores a 300 nm). El tratamiento mediante radiación ultravioleta no altera la constitución química del agua, ya que no se añade nada al agua excepto energía. El grado de inactivación con radiación ultravioleta está directamente relacionado con la cantidad de radiación aplicada al agua. La dosis viene dada por la

intensidad de luz ultravioleta y el tiempo de exposición, medida en microwatt por centímetro cuadrado ($\mu\text{w}/\text{cm}^2$). Debe tenerse en cuenta que la intensidad de la luz emitida decrece con el tiempo, por lo que las lámparas deben ser sustituidas cuando esto suceda. Las lámparas de vapor de mercurio, que producen radiación ultravioleta a 254 nm, son las más usadas. Esta longitud de onda se considera la más efectiva para su acción desinfectante así como también para la eliminación de ozono, cloro y cloraminas que pudieran estar presentes en esta etapa del sistema.

El efecto letal de la luz ultravioleta sobre los microorganismos está dado por su efecto de dimerización del ADN. Los microorganismos son inactivados por la luz UV como resultado del daño fotoquímico sobre sus ácidos nucleicos. La radiación UV, absorbida por los nucleótidos, promueve la formación de enlaces entre nucleótidos adyacentes, con lo que se crean dímeros. La formación de un número suficiente de dímeros dentro de la célula impide las funciones de replicación. Sin embargo, existen microorganismos que cuentan con un mecanismo de fotorreactivación por exposición a luz "reactivadora" entre 300 y 500nm (Wright H.B. et al., 2001).

La efectividad de las lámparas de radiación UV decrece cuanto mayor es la concentración de sustancias disueltas en el agua, debido al "efecto de sombra" que estas pueden ejercer. Además algunos compuestos, como por ejemplo el hierro, tienen la capacidad de absorber luz UV, lo que puede ejercer un efecto "protector" sobre los microorganismos. Por ello, las lámparas ultravioletas deben disponerse en el sistema de tratamiento de agua cuando estas sustancias hayan sido previamente eliminadas. Otro aspecto a tener en cuenta es que la radiación ultravioleta no tiene ningún efecto sobre los biofilms, debido a su acción superficial que sería incapaz de penetrar en la compleja estructura de estos (Lerín I. et al., 1999).

En el sistema modelo de nuestro trabajo, la radiación por luz ultravioleta se emplea como un elemento que brinda protección adicional al sistema, fundamentalmente de posibles contaminaciones por microorganismos, permitiendo tener un margen de respuesta frente a un desvío en el funcionamiento del sistema sin que éste se encuentre fuera de especificaciones. Sin embargo, es bien conocido el hecho de que las células de las bacterias no son eliminadas mediante la acción de las unidades de emisión ultravioleta, por lo cual, dependiendo de la calidad del agua que alcanza el punto del sistema donde es irradiada; se van a generar restos de bacterias con posible acción pirogénica.

El estudio plantea realizar una evaluación del sistema frente a la posibilidad de generación de endotoxinas como consecuencia de la exposición de las bacterias a la acción de la luz ultravioleta.

Evaluación de la actividad de solución de conservación de dializadores:

La reutilización de dializadores ha sido evaluada y aceptada por los expertos y se trata de una práctica usual no sólo en nuestro país, sino en todo el continente americano.

El último informe indica que en el año 2008 el reuso promedio de dializadores fue de 24 veces, en la totalidad de los centros. En Latinoamérica, en 1999 se informó que 83% de los centros reutilizaba el dializador. En Argentina, Brasil y Chile, el reuso se informó en 100% de los centros, mientras que en

Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, República Dominicana y Venezuela ningún centro reusaba los materiales. El reuso promedio de Latinoamérica fue de 11 en 1999, siendo los mayores los de Argentina, Chile y Puerto Rico. En EE.UU., el porcentaje de centros que reutilizaban el dializador en 2005 era de 76% (Sociedad Uruguaya de Nefrología, Fondo Nacional de Recursos, 2008).

Es bien conocido que este procedimiento presenta importantes inconvenientes como son la pérdida de eficacia depurativa y la capacidad de ultrafiltración, capacidad potencial de contaminación y riesgo de transmisión de infecciones. Sin embargo, las bases para realizar esta práctica no se fundamentan únicamente en aspectos económicos, la principal ventaja consiste en el aumento de la biocompatibilidad debido a la capa proteica que tapiza la membrana en su primer uso, previniendo la activación del complemento y sus consecuencias. Por lo tanto, se trata de un compromiso donde se evalúan costos y beneficios de ambos procedimientos.

Por todo lo anterior, queda en evidencia la importancia de la metodología empleada para la desinfección y conservación de las fibras que se reusan.

La solución de conservación empleada para llevar a cabo la desinfección de las fibras de diálisis, consiste en una solución ácida hipertónica (cloruro de sodio anhidro 30% [p:v]; ácido acético glacial 1% [p:v]; agua purificada (c.s.p. 100mL)). El centro de diálisis cuenta con un protocolo que establece todo el procedimiento que debe llevarse a cabo en el proceso de desinfección y conservación de los dializadores, así como los criterios para evaluar la posibilidad de reuso de los mismos (Centro de Diálisis del Hospital Evangélico, 2009). Existen además sistemas comerciales disponibles en el mercado para el tratamiento de los dializadores para ser reutilizados.

Si bien están probados los buenos resultados obtenidos en el sistema con el empleo de la solución ácida hipertónica en el sistema de trabajo, no se cuenta con antecedentes ni referencias bibliográficas al respecto. Es por esta razón que se diseñaron una serie de experimentos para probar objetivamente la eficacia de esta solución y obtener evidencia documentada de la misma, lo que resulta de gran interés para el sector.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS RELACIONADAS CON EPISODIOS DE CHUCHO

Frente a la ocurrencia de episodios de presunta endotoxemia en pacientes se realizó en todos los casos el análisis de las muestras extraídas en el punto problema. El muestreo se realizó durante un año completo, procesando la totalidad de las muestras extraídas por esta causa en el período de tiempo preestablecido.

Las muestras empleadas para la realización de este estudio corresponden a la salida del pico (punto de salida del sistema de agua que se conecta al monitor), entrada del líquido de diálisis a la máquina, salida del dializador para descarte (figura 2.1) y muestra de los concentrados de hemodiálisis correspondientes. Los sitios de toma de muestras de agua fueron establecidos por el centro de diálisis para llevar un control interno de la ocurrencia de estos incidentes y tener conocimiento de la situación en el momento para buscar causas asignables.

Los recuentos microbiológicos se realizaron por el método de filtración por membrana empleando los medios de cultivo detallados en el punto anterior. Las muestras se incubaron a $32,5 \pm 2,5$ °C durante 5 días, de acuerdo con lo establecido.

Características fenotípicas y moleculares de cepas cultivables:

Se realizó el aislamiento de las bacterias recuperadas en todos los episodios de chucho ocurridos durante el seguimiento de los mismos. El criterio para la selección de las colonias a identificar se basó en las características morfológicas de las mismas, realizando la identificación de cada morfotipo de colonia que fueron recuperadas en la totalidad de los controles. Para la caracterización fenotípica de dichas cepas se realizó la observación microscópica de las colonias aisladas y las pruebas primarias, empleando posteriormente sistemas comerciales de identificación (BD BBL™ Oxi/Ferm™ Tube II; BD BBL™ Enterotube™ II) (Anexos 4 y 5) basados en pruebas bioquímicas. Se realizó la caracterización molecular (secuenciación del gen ARNr 16S) de los distintos microorganismos recuperados en los casos en que no fue posible identificarlos mediante los métodos convencionales.

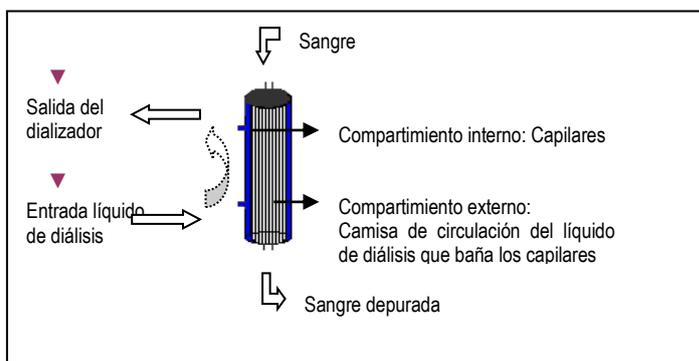


Figura 2.1- Representación esquemática de la fibra de diálisis. El compartimento externo (por donde circula el líquido de diálisis) está destacado en color azul. Se indican los puntos de toma de muestra (▼).

2. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE PIRÓGENOS POR EFECTO DE RADIACIÓN UV

❖ *Diseño del ensayo:*

El estudio de liberación de pirógenos por efecto de la luz ultravioleta consistió en exponer la muestra problema a la acción de radiación UV (lámpara Camag UV- Betrachter, 8W; λ 254 nm) durante tiempos diferentes preestablecidos (Tabla 2.2). La exposición de las muestras se realizó empleando placas de petri destapadas, donde se colocaron las suspensiones objeto de estudio (con el fin de aumentar la superficie de exposición); a la distancia establecida por la lámpara (aproximadamente 10 cm).

Cada una de las fracciones obtenidas al cabo de los distintos tiempos de exposición se separó en dos sub-fracciones: una de ellas fue analizada tal cual y la otra fue sometida a filtración esterilizante (0.22 μ m), condición que teóricamente impediría el pasaje de células enteras pero no de pirógenos.

El análisis de las muestras consistió en el recuento de microorganismos viables y la determinación de endotoxinas bacterianas mediante el ensayo de Limulus Amoebocyte Lysate (LAL); y para las fracciones filtradas se realizó únicamente el ensayo de LAL (Tabla 2.2). Se realizaron controles positivos empleando soluciones de estándar de endotoxina de concentración 0.25 UE/mL (2 λ), los cuales también fueron sometidos al proceso de filtración para descartar cualquier posible efecto de adsorción de la membrana sobre las endotoxinas.

Microorganismos empleados para los ensayos:

El ensayo se realizó empleando suspensiones de *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 17666™. Se seleccionó este microorganismo como modelo ya que se asocia a este tipo de sistemas como patógeno oportunista y en este sistema en particular estuvo asociado a episodios de chuchos.

Se preparó una suspensión según la escala de Mac Farland 1 (3×10^8 bacterias/mL) a partir de un cultivo de 24 horas en R2A. Se realizó el recuento de las suspensiones preparadas originalmente, en condiciones similares a las establecidas para el análisis de las muestras; para conocer exactamente el número de microorganismos de partida. Todas las operaciones realizadas en esta etapa fueron manejadas con material libre de pirógenos y agua libre de pirógenos (LRW) para la preparación de suspensiones y diluciones.

Determinación de la dilución de la suspensión empleada para la realización de las pruebas:

Dado que la presencia de bacterias no necesariamente se corresponde con un ensayo de LAL positivo, se procedió a realizar un ensayo preliminar que permitiera determinar a partir de que número de microorganismos el ensayo de LAL arrojaba resultados positivos para las condiciones de análisis planteadas. Para ello se realizaron diluciones seriadas con un factor de 10 de una suspensión de *Stenotrophomonas maltophilia* preparada según la escala de Mac Farland (Nº1) empleando agua libre de pirógenos (LRW).

Se realizaron los recuentos correspondientes para determinar el número de microorganismos presentes en las distintas diluciones y se realizó la prueba de LAL sobre las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Los ensayos de LAL y los recuentos se realizaron de acuerdo a lo establecido en los ítems siguientes.

Tabla 2.2- Diseño de los ensayos para el estudio de la liberación de pirógenos por efecto de luz UV.

Microorganismo	Tiempo exposición (minutos)	Fraciones obtenidas	Ensayos realizados
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 17666™	1	Filtrada/0.22µm	Recuento en placa Ensayo de LAL
		Sin filtrar	
	5	Filtrada/0.22µm	
		Sin filtrar	
	10	Filtrada/0.22µm	
		Sin filtrar	

❖ **Ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL):**

Para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas se aplicó la prueba de LAL mediante la técnica de coagulación (gel-clot). Para ello se empleó el kit comercial Lonza (Limulus Amebocyte Lysate) PYROGENT® Ultra (Cat. No. N594-125); el kit contiene el Lisado de Amebocitos de Limulus (sensibilidad del reactivo 0.125 EU/mL) y cinco soluciones de estándar de endotoxina de concentración 0.03, 0.06, 0.125 y 2.5 EU/mL (Anexo 3). Se empleó Buffer Tris 50mM (s50-642) (Lonza) y agua para LAL (LRW) (Lonza, Cat. No. W50-100) para la preparación de los reactivos. Para la reacción se emplearon tubos de vidrio de 13X100 mm libres de pirógenos. El baño de agua utilizado durante la incubación de los tubos fue Thermo Fisher Scientific - Precision (Modelo 2832 240V 50/60Hz) (United States Pharmacopeia, 2011 <85>; Lonza, PYROGENT™ Ultra Gel Clot LAL Assay).

En cada corrida del ensayo se realizó la curva para verificar la sensibilidad del reactivo y se agregaron controles positivos y negativos para validar la experiencia.

En todos los casos todos los tubos se sembraron por duplicado.

Despirogenización del material:

La despirogenización de todo el material utilizado se realizó en horno (Pablo Ferrando) a 200°C durante 4 horas (Perdomo R. et al., 2003).

❖ **Recuentos de microorganismos:**

Los recuentos se realizaron empleando el método de siembra incorporado en medio R2A, sembrando 1mL e incubando las placas a 32.5 ± 2.5 °C durante 5 días.

❖ **Estudio de la liberación de pirógenos por efecto de luz UV en condiciones semejantes a las del sistema real:**

Las condiciones del diseño de la experiencia fueron similares a las descritas inicialmente. La adecuación de las condiciones de los ensayos para que fueran similares a las condiciones del sistema consistió en trabajar con una suspensión cuya carga microbiana sea comparable a la que puede estar presente en este tipo de sistemas de agua, es decir de órdenes de $10^3 - 10^2$ microorganismos /mL.

Este punto se considera importante dado que es probable que el grado de eficiencia de la radiación UV sobre las muestras esté ligado estrechamente a la población irradiada. De todas maneras se podrá verificar si esta hipótesis es verdadera comparando los resultados obtenidos en los ensayos con las distintas suspensiones.

3. PRESENCIA DE PIRÓGENOS EN LOS DISTINTOS PUNTOS DEL SISTEMA

Se seleccionaron cuatro puntos del sistema incluyendo puntos del sistema de pretratamiento y del sistema de tratamiento para realizar un seguimiento en paralelo de recuento de microorganismos y la prueba de LAL. Los puntos seleccionados fueron TM5, TM6, TM7 y TM8. Se realizaron dos ensayos en dos instancias independientes. También se realizó el ensayo sobre las muestras tomadas en episodios de chuco, además del análisis de rutina que se realiza sobre dichas muestras; como parte del monitoreo durante los últimos 4 meses de muestreo.

La prueba se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (*Anexo 3*), empleando el kit comercial Lonza (Limulus Amebocyte Lysate) PYROGENT® Ultra; sensibilidad del reactivo 0.125 EU/mL. Los recuentos se realizaron por el método de siembra incorporado, sembrando 1 mL, se empleó el medio de cultivo R2A y las placas se incubaron durante 5 días a 32.5 ± 2.5 °C.

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SOLUCIÓN DE CONSERVACIÓN DE DIALIZADORES

Para la evaluación de la eficacia de la solución ácida hipertónica empleada para la conservación de dializadores para su reutilización, se seleccionó una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* como modelo, se trata de una cepa que fue aislada a partir de hemocultivos de un paciente que sufrió un episodio de chuco durante el tratamiento. El mismo microorganismo fue aislado en otros episodios similares. La identidad de la cepa fue confirmada en nuestro laboratorio empleando el kit comercial BD BBL™ Oxi/Ferm™ Tube II (*Anexo 5*). La experiencia se dividió en dos partes:

- En una primera instancia se realizaron ensayos in vitro para evaluar la actividad desinfectante de la solución de conservación.
- En la segunda parte se llevó a cabo la evaluación de la actividad “real”, realizando para ello el análisis sobre un dializador, empleando para estos ensayos un dializador nuevo y uno usado.

❖ **Diseño de los experimentos:**

a- Primera parte:

Análisis in vitro de la actividad de la solución de conservación:

Se realizó una curva de muerte del microorganismo seleccionado por exposición a la acción de la solución de conservación. Para ello se preparó una suspensión según la escala de Mac Farland 1 (10^8 bacterias / mL) del microorganismo en cuestión y se inoculó la solución de conservación de manera de lograr una dilución al décimo en el agente (18 mL de solución hipertónica + 2 mL de la suspensión).

A continuación se realizaron los recuentos de la solución de conservación inoculada en los tiempos establecidos (tabla 2.4) para evaluar su actividad. Se realizaron dos ensayos que se describen a continuación.

Ensayo 1:

Para el diseño de esta experiencia se midió el pH de las diferentes diluciones a las que fue sometida la solución hipertónica para conocer las condiciones reales del ensayo y evaluar la posibilidad de crecimiento de los microorganismos en estas condiciones (tabla 2.3). A partir de la dilución 10^{-2} el pH del medio no sería una limitante para el crecimiento microbiano. La menor dilución sembrada fue la dilución 10^{-1} (correspondiente a los tiempos de contacto de 15 a 45 minutos) y al sembrar la placa se consideró que la muestra (solución hipertónica + suspensión de microorganismo) se vuelve a diluir (1:20 aproximadamente), alcanzando así condiciones válidas para la realización del ensayo.

Tabla 2.3- Variación del pH de la solución hipertónica con el factor de dilución

Factor de Dilución	pH
10^{-1}	5.0
10^{-2}	5.9
10^{-3}	6.5

Ensayo 2:

El mismo ensayo se realizó repitiendo las condiciones anteriores pero los recuentos de las diluciones en todos los tiempos muestreados se realizaron por el método de filtración por membrana, asegurando de esta forma la eliminación del agente del medio y por lo tanto no se esperaría actividad inhibitoria residual en el medio de crecimiento (tabla 2.4). En cada caso se filtró 1mL de la solución de conservación inoculada (suspendida en 20mL de agua estéril) y posteriormente se realizaron 3 enjuagues con 100 mL de agua estéril.

En la tabla 2.4 se detallan las condiciones de tiempo, diluciones empleadas y volúmenes de siembra para ambos ensayos.

Tabla 2.4- Diseño de la experiencia para la evaluación de la actividad de la solución de conservación

Tiempo de contacto (min.)	Diluciones sembradas	Ensayo 1	Ensayo 2
		Método de recuento / Volumen sembrado (mL)	Método de recuento / Volumen sembrado (mL)
0	-3 -4 -5	Recuento en placa incorporado (1mL)	Filtración por membrana (1 mL)
15	-1 -2 -3	Recuento en placa incorporado (1mL)	Filtración por membrana (1 mL)
30	-1 -2 -3	Recuento en placa incorporado (1mL)	Filtración por membrana (1 mL)
45	-1 -2 -3	Recuento en placa incorporado (1mL)	Filtración por membrana (1 mL)
60	0	Filtración por membrana (10 mL)	Filtración por membrana (10 mL)

Previamente a la inoculación de la solución se realizó el recuento de la suspensión para conocer exactamente la carga del inóculo original.

Todos los recuentos se realizaron según los métodos detallados en la tabla 2.4, empleando como medio de cultivo R2A. Las placas se incubaron a $32,5 \pm 2,5$ °C durante 5 días.

b- Segunda parte:

➤ *Evaluación de la actividad de la solución de conservación sobre un dializador nuevo:*

Esta segunda etapa consistió en simular una situación de contaminación del dializador. Para ello se inoculó un dializador con una suspensión del microorganismo empleado como modelo de los ensayos (*Stenotrophomonas maltophilia*), dejando transcurrir cierto tiempo de exposición y posteriormente enjuagando el dializador. A continuación se realizó el tratamiento empleando la solución ácida hipertónica y posterior almacenamiento del dializador, sometiénolo a las condiciones normales de conservación. Finalmente se llevó a cabo el análisis y la evaluación posterior de los resultados.

La puesta a punto de esta técnica implicó no solamente el ajuste de volúmenes de trabajo sino también la metodología a emplear para el manejo de los dializadores, dado que en el laboratorio no se cuenta con monitores para hemodiálisis y por lo tanto no fue posible conectarlos a un circuito continuo para el enjuague de los mismos.

Desarrollo de la experiencia:

1. Se preparó y una suspensión de *Stenotrophomonas maltophilia* MacFarland-1 y se realizó el recuento inicial de la misma.
2. Inoculación del dializador: Se llenó la parte externa del dializador con agua destilada estéril y a continuación se inoculó empleando 5mL de una dilución 10^{-4} de la suspensión preparada anteriormente (estimando una carga del orden de 10^4 bacterias). La sección interna del dializador se inoculó directamente con el mismo volumen de la dilución 10^{-4} de dicha suspensión (figura 2.2).
3. Incubación: Se incubó el dializador con la suspensión durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Tratamiento con solución ácida hipertónica: Una vez transcurrido el tiempo indicado, empleando agua destilada estéril (100 mL), se recuperó el contenido del interior de los capilares (por desplazamiento) y se realizó el recuento de los microorganismos recuperados en el volumen eluido (E1) por el método de filtración por membrana. El compartimiento externo se vació (recogiendo la fracción E2). Se completó el volumen de ambos compartimientos con la solución de conservación (solución ácida hipertónica).
5. Almacenamiento: Se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente, simulando las condiciones de almacenamiento normal.
6. Enjuague: Al cabo de 24 horas se vació la parte externa del dializador y se lavó la sección interna con cuatro fracciones de 100mL de agua destilada estéril: F1, F2, F3 y F4. Se lavó la parte externa con 100mL de agua estéril, recogiendo la totalidad del líquido de enjuague (Fex) (Figura 2.3).
7. Análisis: Se realizó el recuento de cada una de las fracciones obtenidas. Todos los recuentos se realizaron empleando los medios de cultivo R2A, incubando las placas a $32,5 \pm 2,5$ °C durante 5 días.

Los ensayos se realizaron por duplicado.

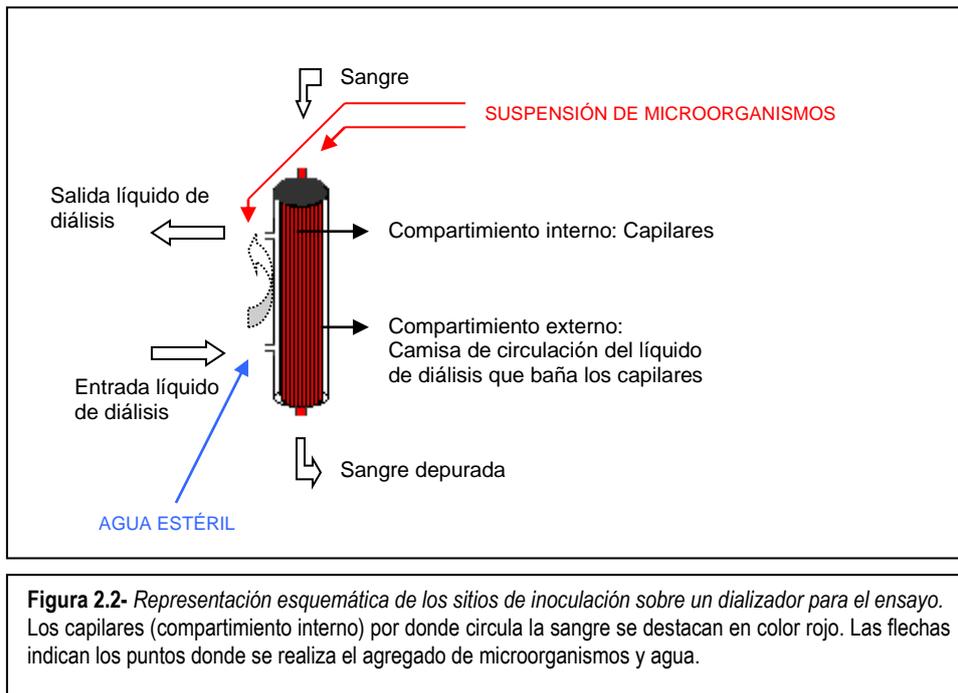
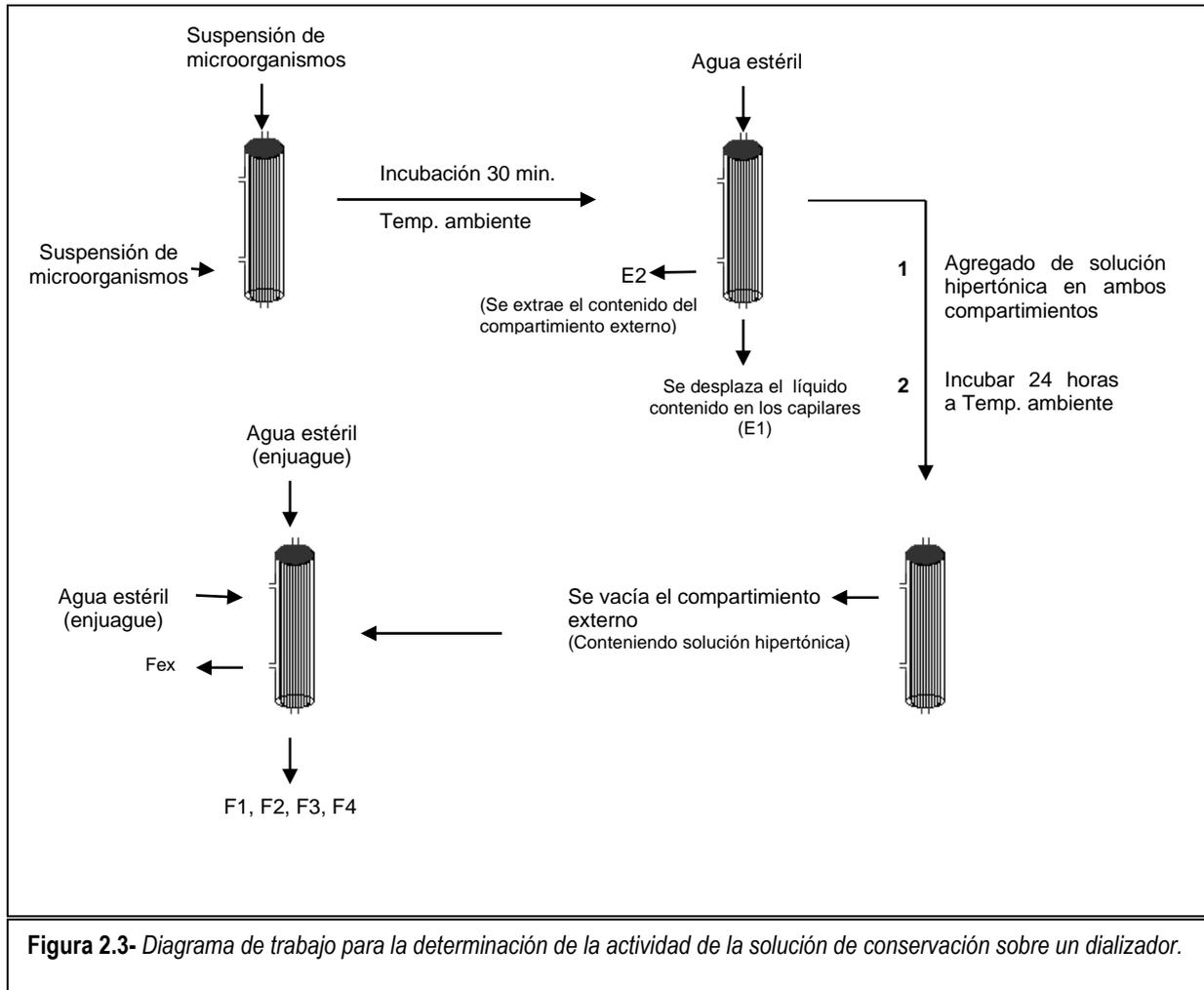


Figura 2.2- Representación esquemática de los sitios de inoculación sobre un dializador para el ensayo. Los capilares (compartimiento interno) por donde circula la sangre se destacan en color rojo. Las flechas indican los puntos donde se realiza el agregado de microorganismos y agua.



➤ *Evaluación de la actividad de la solución de conservación sobre un dializador usado:*

El ensayo descrito anteriormente intentó simular la acción de la solución de conservación sobre un dializador expuesto a contaminación. Sin embargo, esto no logra reproducir las condiciones reales en caso de dializadores de reuso, dado que la presencia de residuos de proteínas y elementos de la sangre presentes en dializadores usados posiblemente interfiera en la acción de la solución de conservación. Por esta razón, para evaluar la actividad “real” de la solución se realizó el ensayo empleando fibras de diálisis usadas y almacenadas durante 24 horas después de su último uso en las condiciones normales de almacenamiento en el centro de diálisis.

Previamente a la realización del ensayo los dializadores fueron sometidos al mismo tratamiento de enjuague al que se someten usualmente antes de cada uso. Se conectó al circuito y se hizo pasar agua del sistema por el compartimiento externo y se enjuagó la sección interna de la fibra con suero fisiológico estéril, para eliminar cualquier posible residuo de solución de conservación que pudiera permanecer en el dializador.

Se tomaron las muestras de agua del enjuague correspondientes a los puntos de entrada y salida del líquido de diálisis para ser analizadas, así como el dializador enjuagado.

El ensayo de evaluación se realizó en dos oportunidades independientes sobre dos dializadores usados.

Datos de los dializadores usados para los ensayos (proporcionados por el centro):

	Número de reusos	Volumen residual (mL)
• Primer ensayo	12	118
• Segundo ensayo	14	100

Desarrollo de la experiencia:

1. Se preparó una suspensión de *Stenotrophomonas maltophilia* MacFarland-1 y se realizó el recuento inicial de la misma.
2. Inoculación del dializador: Se llenó el compartimiento externo del dializador con agua estéril y se inoculó cada uno de los dos compartimientos (interno y externo) con 5 mL de la dilución 10^{-4} de la suspensión indicada (estimando una carga de 10^4 bacterias en el inóculo).
3. Incubación: Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Tratamiento con solución ácida hipertónica: Se eluyó el contenido del compartimiento interno por desplazamiento con agua estéril empleando un volumen equivalente al volumen residual medido y se filtró el volumen recuperado. A continuación se extrajo el líquido contenido en el compartimiento externo por uno de los extremos (E1) y se filtró la totalidad del volumen eluido.
5. Almacenamiento: Se completó el volumen de ambos compartimientos con solución ácida hipertónica y se incubó la fibra durante 24 horas a temperatura ambiente.
6. Enjuague: Una vez transcurrido el tiempo indicado se vació la parte externa del dializador. Se lavó la sección interna de la fibra con cuatro fracciones de 100 mL de agua destilada estéril: F1, F2, F3, F4, y la sección externa con 100mL de agua estéril, recogiendo la totalidad del líquido de enjuague (Fex).
7. Análisis: Se realizó el recuento de cada una de las fracciones obtenidas. Todos los recuentos se realizaron de manera similar a lo descrito para el análisis de un dializador nuevo.

Modificaciones a la metodología para la filtración de las fracciones obtenidas:

En el primer ensayo las muestras eluidas a partir del compartimiento interno no fueron filtrables, es probable que esto se deba a la presencia de macromoléculas adheridas al interior de los capilares (debido a la reutilización del dializador), que se desprendieron durante el procedimiento, quedando suspendidas en el eluido y que contribuyeron a saturar la membrana de filtración rápidamente. Lo mismo sucedió al momento de filtrar las muestras finales (fracciones F1, F2, F3 y F4). Este fenómeno no permitió estimar el número de microorganismos retenidos en el compartimiento interno, por lo que solamente se obtuvieron resultados para el compartimiento externo en estas condiciones.

Conociendo estos antecedentes, en el segundo ensayo se modificó el procedimiento para procesar las muestras. Se dividieron las fracciones eluidas del compartimiento interno y se procedió a trabajar con un número mayor de fracciones más pequeñas, suspendiéndolas en un volumen de agua destilada estéril (100mL) para realizar la filtración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LAS MUESTRAS RELACIONADAS CON EPISODIOS DE CHUCHO

Se procesaron la totalidad de las muestras extraídas por la ocurrencia de chuchos durante un año completo, registrándose una totalidad de 10 eventos en dicho período de tiempo. Con la realización de un seguimiento anual, fue posible evaluar la incidencia de estos eventos según los meses del año, descartándose (para el año estudiado) un aumento de chuchos en los meses de temperaturas más altas (Figura 2.4).

En todas las soluciones de concentrados para hemodiálisis analizadas no se recuperaron microorganismos, por lo que se descartaron las mismas como posible fuente de contaminación. En todos los otros puntos de muestreo (sitio de entrada del LD a la fibra, sitio de salida del líquido de descarte y el pico correspondiente) se obtuvo crecimiento de microorganismos.

De todas las muestras analizadas, únicamente en un caso se obtuvieron resultados fuera de especificaciones y correspondió a una muestra del sitio de entrada de LD al dializador.

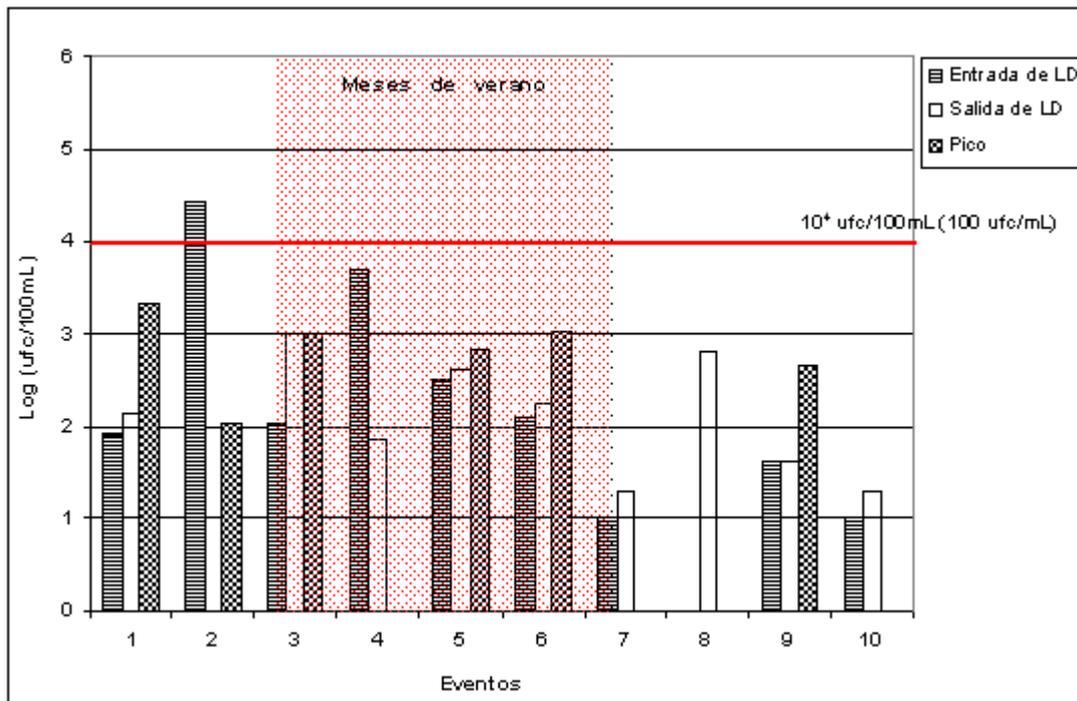


Figura 2.4- Determinación de carga bacteriana en episodios de chuchos.

Los "meses de verano" se consideraron los meses más calurosos del año, incluyendo el período noviembre – marzo.

Características fenotípicas y moleculares de cepas cultivables:

A medida que se procesaron las muestras, se realizó la identificación de los microorganismos recuperados en cada ocasión. Las tablas 2.5 y 2.6 muestran los resultados obtenidos en la identificación de los microorganismos recuperados en episodios de chucho.

Tabla 2.5- Identificación de microorganismos recuperados en episodios de chucho por métodos convencionales.

Clasificación	Bacteria	Método de identificación	Punto de muestreo	Número de aislamientos	Código ^a	Reporte ^b
<i>β-proteobacteria</i>	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	Oxiferm®	Entrada Pico	2	EC6 EC8	Si (1)
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Oxiferm®	Pico Salida	2	EC2 EC8	Si (2)
<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Enterotubo®	Pico	1	EC2	Si (3)
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Oxiferm®	Entrada	2	EC5 EC9	Si (4)
	<i>Pseudomonas putida</i>	Oxiferm®	Salida	1	EC2	Si (5)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Enterotubo / Oxiferm®	Entrada Salida	2	EC8 EC8	Si (6)

a EC indica el Episodio de Chucho correspondiente a la recuperación del microorganismo indicado.

b Bacteria reportada en este tipo de sistemas

(1) Bueno et al., 2009; (2) Magalhaes et al., 2003; Souza et al., 2004; Bereschenko et al., 2008; Oliveira Lima JR. et al., 2005; (3) Gomila et al., 2005; (4) Bereschenko et al., 2008; Buenote et al., 2009; Oliveira Lima JR. et al., 2005; (5) Bueno et al., 2009; Bereschenko et al., 2008; (6) Kulakov et al., 2002; Bueno et al., 2009; Oliveira Lima JR. et al., 2005.

Tabla 2.6- Identificación de microorganismos recuperados en episodios de chucho por métodos moleculares.

Clasificación	Bacteria	% sm ^a	Ln ^b	Punto de muestreo	Número de aislamientos	Código ^c	Reporte ^d
<i>α-proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	99	1393	Picos	2	EC1 EC6	No
	<i>Ralstonia pickettii</i>	99	1454	Entrada	1	EC7	Si (7)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	99	1463	Pico	1	EC3	Si (7)
	<i>Ralstonia pickettii</i>	98	1448	Salida	1	EC4	Si (7)
<i>Bacilli</i>	<i>Paenibacillus campinasensis</i>	99	1462	Salida	1	EC6	Si (8)

a % de similitud con secuencias de la base de datos RDP

b Longitud de la secuencia nucleotídica

c EC indica el Episodio de Chucho correspondiente a la recuperación del microorganismo indicado.

d Bacteria reportada en este tipo de sistemas

(7) Kulakov et al., 2002; Oliveira Lima JR. et al., 2005; (8) Gomila et al., 2005.

Todos los microorganismos recuperados en los episodios de chucho fueron identificados anteriormente como parte de la población planctónica del sistema o bien como parte de la flora integrante de biofilms. La única excepción fue el caso de *Paenibacillus campinasensis*, pero la presencia de este ha sido reportada anteriormente en sistemas similares (Gomila M. et al., 2005). Se trata de un bastón Gram positivo,

aerobio que raramente se encuentra como causante de enfermedades en humanos. Sin embargo, recientemente se han descrito casos de infecciones en seres humanos causadas por bacterias del género *Paenibacillus*, como es el caso de *Paenibacillus alvei* y *Paenibacillus thiaminolyticus* el cual se ha reportado como causante de bacteriemia en pacientes hemodializados (Ouyang J. et al., 2008).

Al igual que como de desprende del análisis de la población del sistema, en los aislamientos asociados a episodios de chucho los microorganismos que predominan son bastones Gram negativos, lo que concuerda con resultados obtenidos en estudios de sistemas similares (Oliveira Lima J.R. et al., 2005; Santos F. et al., 2000; Reis J.D.P. et al., 1998). *Burkholderia cepacia* ha sido asociado con casos de fibrosis quística causando infecciones respiratorias que pueden acarrear un daño tisular irreversible, especialmente en pacientes más susceptibles como son los enfermos renales (Oliveira Lima J.R. et al., 2005), por lo que la determinación de este microorganismo en este tipo de sistemas, especialmente asociado a episodios de chuchos es importante para tomar acciones correctivas. De todas maneras, independientemente del microorganismo identificado el procedimiento habitual del centro es la sanitización del sistema tras la ocurrencia de episodios de chucho.

2. ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE PIRÓGENOS POR EFECTO DE LUZ UV

➤ *Determinación de la dilución de la suspensión empleada para la realización de las pruebas:*

La tabla 2.7 muestra los resultados de recuentos y LAL para las diluciones de *Stenotrophomonas maltophilia*. En ambos casos la prueba de LAL arrojó resultados positivos para la dilución conteniendo una carga bacteriana del orden de 10^6 ufc/mL. Tomando en cuenta la sensibilidad del reactivo utilizado, la cual fue confirmada, se puede decir que para aquellas diluciones conteniendo menos de 10^6 ufc/mL la carga de endotoxinas bacterianas detectables por el método de LAL se encuentra por debajo de 0.125 UE/mL.

Tabla 2.7- Resultados de recuentos y LAL para las diferentes diluciones

		Diluciones			
		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Ensayo 1	Recuento (ufc/mL)	2.2 E6	2.2 E5	2.2 E4	2.2 E3
	Ensayo de LAL (UE/mL)	> 0.125	< 0.125	< 0.125	< 0.125
Ensayo 2	Recuento (ufc/mL)	1.7 E6	1.7 E5	1.7 E4	1.7 E3
	Ensayo de LAL (UE/mL)	> 0.125	< 0.125	< 0.125	< 0.125

- *Determinación del efecto de la radiación UV sobre una cepa de Stenotrophomonas maltophilia y estudio de la liberación de pirógenos:*

En la tabla 2.8 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 2.8- Determinación de la variación del número de microorganismos y de endotoxinas bacterianas por exposición a radiación UV.

Condición de la muestra	Filtrada				Sin filtrar				Solución estándar de endotoxina sin filtrar	Solución estándar de endotoxina filtrada
	0	1	5	10	0	1	5	10		
Tiempo exposición (min.)	0	1	5	10	0	1	5	10	---	---
Recuento (ufc/mL)					2.1 E8	2.0 E7	1.7 E7	3.1 E6	---	---
Ensayo de LAL	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ensayo de LAL (+): > 0.125 UE/mL Ensayo de LAL (-): < 0.125 UE/mL

Los resultados demuestran la acción de la radiación UV sobre el microorganismo en cuestión. Para el tiempo de exposición 0, es decir antes de someter a la muestra a la acción de la radiación UV, el ensayo de LAL arrojó resultados positivos para la muestra sin filtrar, resultado que coincide con los obtenidos en los ensayos realizados sobre las distintas diluciones de la suspensión original. Los controles positivos demuestran la ausencia de interferencias en los ensayos. Sin embargo, la solución obtenida tras la filtración realizada sobre la misma suspensión dio resultados negativos. Por el contrario, al cabo de un minuto de exposición, el ensayo de LAL fue positivo tanto para las muestras sin filtrar como también para las muestras filtradas. Este resultado podría interpretarse considerando que la exposición a la radiación UV, dio lugar a la generación de restos bacterianos con actividad pirogénica capaces de atravesar la membrana del filtro, lo cual implica que al menos una parte de las endotoxinas detectadas están en solución. Este resultado tendría importancia para el estudio de nuestro sistema, ya que en el caso del agua de diálisis solamente las endotoxinas solubles capaces de atravesar la membrana de los capilares llegan al paciente.

- *Estudio de la liberación de pirógenos por efecto de la luz UV en condiciones semejantes a las del sistema real:*

La tabla 2.9 muestra los resultados obtenidos para el ensayo realizado empleando suspensiones de microorganismos con una carga microbiana por debajo de los límites establecidos para agua para hemodiálisis, de manera de lograr condiciones similares a las del sistema real y obtener resultados que aporten un conocimiento respecto a lo que sucede en el sistema en cuestión.

Tabla 2.9- Determinación de la variación del número de microorganismos y de endotoxinas bacterianas por exposición a radiación UV.

Condición de la muestra	Filtrada				Sin filtrar				Solución estándar de endotoxina sin filtrar	Solución estándar de endotoxina filtrada
	0	1	5	10	0	1	5	10		
Tiempo exposición (min.)	0	1	5	10	0	1	5	10		
Recuento (ufc/mL)					1.4 E2	1.0 E2	< 1	< 1	---	---
Ensayo de LAL	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Ensayo de LAL (+): > 0.125 UE/mL Ensayo de LAL (-): < 0.125 UE/mL

De acuerdo a los resultados obtenidos, la acción de la radiación UV sobre una población bacteriana que está por debajo de los límites establecidos para sistemas de purificación de agua resultó eficiente, y los ensayos de LAL para determinación de endotoxinas bacterianas resultaron negativos, lo que implica que la concentración de endotoxinas estuvo por debajo de 0.125 UE/mL. Este resultado tiene una gran importancia para este tipo de sistemas ya que la radiación UV es un elemento fundamental. Tanto las endotoxinas como fragmentos de células con capacidad pirogénica, son sustancias sumamente estables, cuya degradación requiere tratamientos drásticos como el empleo de ácidos o bases fuertes o procesos de pirólisis térmica. Se ha reportado la presencia de endotoxinas bacterianas en ausencia de bacterias viables luego del tratamiento de sistemas con cloro, lo que sugiere la generación de pirógenos por parte del agente (Oliveira Lima J.R. et al., 2005). Un estudio comparativo realizado sobre el efecto del cloro y el ozono como agentes desinfectantes para el tratamiento de sistemas de agua dió resultados similares en cuanto a la acción sobre los microorganismos presentes, pero sin embargo la acción del ozono sobre las endotoxinas bacterianas presentes en el sistema fue más eficiente (Kontana A. et al., 2009). Esta diferencia podría atribuirse al alto potencial de oxidación del ozono, que supera ampliamente al del cloro. Lo que se puede interpretar de los resultados obtenidos en nuestro estudio es que la radiación UV es potencial generador de pirógenos. Sin embargo, cuando actúa sobre un número bajo de microorganismos (10^2 ufc/mL) los pirógenos generados están por debajo del límite exigido. Estos resultados fueron obtenidos exclusivamente para el microorganismo *S. maltophilia*, pero podría considerarse un resultado representativo de bacterias típicas presentes en el agua capaces de generar endotoxinas. Por lo tanto para contar con un sistema seguro, lo importante es mantenerlo bajo control.

3. PRESENCIA DE PIRÓGENOS EN LOS DISTINTOS PUNTOS DEL SISTEMA

En los análisis realizados en los distintos puntos del sistema la prueba de LAL arrojó resultados positivos únicamente para el punto TM5 (post-ablandador). En la determinación en paralelo del número de bacterias viables mediante el recuento en placa, se observó para este punto el mayor recuento, aún cumpliendo con los límites establecidos. En la tabla 2.10 se detallan los resultados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, las bacterias viables recuperadas en este punto están muy por debajo del número que arroja un resultado de LAL positivo; por lo tanto este podría atribuirse a la presencia de pirógenos en solución, posiblemente generados por la acción del cloro. El análisis de los puntos posteriores a las membranas de ósmosis inversa estaría indicando la retención de células y fracciones celulares con actividad pirogénica por parte de estas.

Tabla 2.10- Resultados del ensayo de LAL y recuentos sobre muestras del sistema.

	Ensayo	Muestra			
		TM5	TM6	TM7	TM8
Experiencia 1	LAL (UE / mL)	> 0.125	< 0.125	< 0.125	< 0.125
	Recuento (ufc/mL)	220	< 10	< 10	< 10
Experiencia 2	LAL (UE / mL)	> 0.125	< 0.125	< 0.125	< 0.125
	Recuento (ufc/mL)	480	<10	<10	<10

Para las muestras obtenidas tras la ocurrencia de chuchos, la prueba de LAL dió resultados negativos en todos los casos, independientemente de los recuentos obtenidos para estos puntos, pero sin perder de vista que en ningún caso estos recuentos estuvieron por encima de los límites respectivos. Se ha reportado que existe una buena correlación entre el número de bacterias, el nivel de endotoxinas en el líquido de diálisis y la presencia de reacciones a pirógenos en los pacientes (Oliveira Lima J.R. et al., 2005). Otro trabajo establece que una concentración bacteriana por encima de 2000 ufc/mL, se correlaciona con un nivel de endotoxinas suficiente para generar síntomas clínicos (Santos F. et al., 2000). Sin embargo, este número sobrepasa ampliamente las especificaciones establecidas en estos sistemas, por lo que se considera que existe un factor importante de la capacidad de generación de pirógenos que aportan los distintos tipos de microorganismos, sin perder de vista el aporte generado por los microorganismos no viables presentes en el sistema. La diferencia en el potencial para generar reacciones a pirógenos de las moléculas de LPS se debe a su estructura, la cual aparte de su núcleo básico común puede variar considerablemente, fundamentalmente la región O-específica compuesta por unidades de oligosacáridos repetitivas y que es característica de cada bacteria. Se han reportado diferencias en el potencial de activación de factores del sistema del complemento por LPS generados por diferentes microorganismos. Esto indica que el ensayo de LAL no puede correlacionarse directamente con el potencial pirogénico en seres humanos, simplemente se trata de un indicador que permite estimar el nivel de pirógenos (Dehus O. et al, 2006).

Dado que en ningún caso se obtuvieron resultados para LAL positivos en los distintos episodios monitoreados, se manejaron diferentes hipótesis al respecto que deberían ser estudiadas, una es la posibilidad de que las reacciones a pirógenos generadas en los pacientes sean provocadas al menos en parte, por moléculas no detectables por el ensayo de LAL. Otra posibilidad sería que cuando aparece un número elevado de endotoxinas en el sistema su distribución no sea homogénea y por lo tanto cuando un

episodio de chuco es detectado en un paciente, el muestreo posterior de los diferentes puntos del sistema no sea representativo de lo ocurrido solamente unos instantes previos, hecho que podría vincularse con el desprendimiento de biofilms.

Todos los elementos discutidos anteriormente son válidos para aquellos casos en que los episodios en los pacientes ocurren como consecuencia del líquido de diálisis, sin embargo esta no suele ser la causa más frecuente. Se ha reportado que las infecciones relacionadas a catéteres endovenosos son una de las complicaciones más frecuentes y graves en hemodializados y es responsable de 80% - 90% de las bacteriemias en este grupo (Medina J. et al., 2006; Contreras L. et al., 2003).

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SOLUCIÓN DE CONSERVACIÓN DE DIALIZADORES

a- Primera parte:

Análisis in vitro de la actividad de la solución de conservación:

1- Seguimiento realizado por el método de recuento en placa incorporado*:

Actividad solución conservación:

Tiempo de muestreo (min)	Recuento final
t ₀	5.8 E5 ufc/mL
t ₁₅	< 10 ufc/mL
t ₃₀	< 10 ufc/mL
t ₄₅	< 10 ufc/mL
t ₆₀	< 1 ufc/ mL

♣ En la muestra obtenida para t₆₀ se realizó el recuento por filtración por membrana.

2- Seguimiento realizado por el método de filtración por membrana:

Actividad solución conservación:

Tiempo de muestreo (min)	Recuento final
t ₀	4.4 E5 ufc/mL
t ₁₅	< 10 ufc/mL
t ₃₀	< 10 ufc/mL
t ₄₅	< 10 ufc/mL
t ₆₀	< 1 ufc/ mL

b- Segunda parte:

➤ *Evaluación de la actividad de la solución de conservación sobre un dializador nuevo:*

Resultados de recuentos:

❖ Recuento de la suspensión original (*Stenotrophomonas maltophilia*, Mac Farland – 1):

Ensayo 1	Ensayo 2
3.9 E8 ufc /mL	4.8 E8 ufc /mL

- ❖ Microorganismos recuperados previamente al agregado de solución de conservación:

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2
E1	9.0 E4 bacterias	1.1 E5 bacterias
E2	1.0 E5 bacterias	1.4 E5 bacterias

- ❖ Microorganismos recuperados en las fracciones de enjuague posteriores a la exposición a la solución de conservación:

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2
F1	No se recuperaron microorganismos	No se recuperaron microorganismos
F2	No se recuperaron microorganismos	No se recuperaron microorganismos
F3	No se recuperaron microorganismos	No se recuperaron microorganismos
F4	No se recuperaron microorganismos	No se recuperaron microorganismos
Fex	No se recuperaron microorganismos	No se recuperaron microorganismos

Interpretación de los resultados:

- ❖ Número real de microorganismos empleados para la realización de los ensayos (cada compartimiento del dializador se inoculó con 5mL de la dilución 10^{-4} de la suspensión original):

	Ensayo 1	Ensayo 2
Suspensión original	3.9 E8 ufc /mL	4.8 E8 ufc /mL
Microorganismos introducidos	2.0 E5 bacterias *	2.4 E5 bacterias *
Microorganismos recuperados en el eluido previo al agregado de solución de conservación	E1	9.0 E4 bacterias
	E2	1.0 E5 bacterias

* Total de bacterias presentes en el inóculo.

En todos los casos se estima que el número de microorganismos que permanecen en el dializador y que por lo tanto fueron sometidos a la acción de la solución fue aproximadamente el 50% del inóculo inicial.

Evaluación de la actividad de la solución de conservación:

En las fracciones del enjuague (F1, F2, F3 y F4) correspondientes a la parte interna del dializador y la fracción del compartimiento externo (Fex), no se recuperaron microorganismos luego de haber conservado el dializador durante 24 horas con la solución hipertónica. Por lo tanto se verifica su eficacia en estas condiciones.

- Evaluación de la actividad de la solución de conservación sobre un dializador usado:

Resultados de recuentos:

- ❖ Recuento de la suspensión original (*Stenotrophomonas maltophilia*, Mac Farland – 1):

Ensayo 1	Ensayo 2
5.3 E8 ufc /mL	1.7 E9 ufc /mL

- ❖ Microorganismos recuperados previamente al agregado de solución de conservación:

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2
E1	---	3.1 E4 bacterias
E2	1.6 E5 bacterias	6.3 E4 bacterias

- ❖ Microorganismos recuperados en las fracciones de enjuague posteriores a la exposición a la solución de conservación:

Muestra	Ensayo 1	Ensayo 2
F1	---	---
F2	---	---
F3	---	---
F4	---	---
Fex	No se recuperaron microorganismos	No se recuperaron microorganismos

Interpretación de los resultados:

- ❖ Número real de microorganismos empleados para la realización de los ensayos (cada compartimiento del dializador se inoculó con 5mL de la dilución 10^{-4} de la suspensión original):

	Ensayo 1	Ensayo 2
Suspensión original	5.3 E8 ufc /mL	1.7 E9 ufc /mL
Microorganismos introducidos	2.7 E5 bacterias	8.5 E5 bacterias
Microorganismos recuperados en el eluido previo al agregado de solución de conservación	E1	3.1 E4 bacterias
	E2	6.3 E4 bacterias

En el caso de los dializadores usados no fue posible establecer un porcentaje de microorganismos retenidos en el dializador, esto probablemente se debe a que los residuos presentes en el interior constituyen una composición sumamente heterogénea e impredecible. De todas maneras se puede asegurar que para todos los casos el número de microorganismos retenidos que fue expuesto a la acción de la solución de conservación fue del orden de 10^5 bacterias en cada compartimiento.

Evaluación de la actividad de la solución de conservación:

En el primer ensayo, las fracciones del enjuague (F1, F2, F3 y F4) correspondientes a la parte interna del dializador no fueron filtrables, es probable que esto se deba a la presencia de macromoléculas adheridas al interior de los capilares (debido a la reutilización del dializador), que se desprendieron durante el procedimiento, quedando suspendidas en el eluido y que contribuyeron a saturar la membrana de filtración rápidamente. La fracción obtenida del enjuague del compartimiento externo (Fex) no presentó inconvenientes para su procesamiento y no se observó crecimiento de microorganismos.

En el segundo ensayo, la modificación del procedimiento de trabajo permitió procesar la muestra del eluido inicial, para poder estimar el número de microorganismos remanentes en dicho compartimiento que

fue sometido a la acción de la solución de conservación. Sin embargo, al momento de procesar las fracciones finales, luego de haber conservado la fibra 24 horas con la solución hipertónica, se presentó el mismo problema a pesar de las modificaciones introducidas. Las muestras obtenidas del compartimiento externo se procesaron según lo establecido y al cabo del período de incubación no se observó crecimiento. De acuerdo a los resultados obtenidos es posible asegurar la eficacia de la solución de conservación únicamente en el compartimiento externo. De todas maneras se considera un resultado valioso dado que se trata del sitio a donde accede el líquido de hemodiálisis, asegurándose así la eliminación de cualquier contaminación proveniente del sistema, teniendo en cuenta que las membranas de diálisis no permiten el pasaje de microorganismos. Es importante considerar también que estos ensayos fueron realizados con cargas microbianas de órdenes mucho mayores a los que pueda aportar cualquier contaminación en este tipo de sistemas.

Capítulo 3:

Desarrollo y puesta a punto de métodos alternativos de análisis

RESUMEN

Se llevaron a cabo simultáneamente análisis empleando los métodos convencionales de cultivo, de acuerdo a las normativas establecidas por los organismos regulatorios pertinentes y métodos alternativos de análisis basados en técnicas moleculares y de fluorescencia.

Los métodos utilizados incluyen microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y PCR en tiempo real. El empleo de estas nuevas tecnologías para el análisis de las muestras requiere aumentar la carga inicial de las mismas mediante métodos de concentración para lograr un mayor límite de detección en los análisis.

El capítulo plantea el desarrollo y puesta a punto de estas metodologías alternativas empleando microorganismos que fueron seleccionados como modelo para la determinación de parámetros como sensibilidad y especificidad de las mismas, para poder evaluar objetivamente la posibilidad de aplicar estas técnicas al sistema objeto de estudio y sistemas con características similares.

INTRODUCCIÓN

El agua que se utiliza en hemodiálisis debe contener un bajo número de microorganismos por mL. Para el empleo de métodos alternativos se requieren instancias de concentración previamente a la determinación de los microorganismos en cuestión (Rajal V.B. et al., 2007; Jofre J. et al., 2010). La composición del agua y las características de los microorganismos afectan la eficiencia de los métodos de concentración; lo que dificulta la optimización de un método estándar de concentración para la matriz agua (Cofre J. et al., 2010). Es por esta razón que se deben establecer técnicas particulares para aplicar a cada tipo de sistema y los microorganismos objeto de trabajo (Rajal V.B. et al., 2007; Ferguson C., 2004). Muchas veces pueden emplearse técnicas ya establecidas para la concentración de las muestras pero la eficiencia de concentración puede resultar baja o muy variable entre las muestras, dependiendo de cada sistema. En todo caso deberá evaluarse la aplicabilidad de la técnica al sistema en cuestión (Jofre J. et al., 2010).

No debe perderse de vista que cuando se realiza la concentración de una muestra también aumenta la materia orgánica, minerales y otros compuestos presentes en el agua, lo que altera la composición de las muestras haciéndolas más complejas. Esta es una característica que debe ser tomada en cuenta al momento de la selección de los puntos de muestreo (Jofre J. et al., 2010).

De todas maneras la necesidad de concentrar la muestra previamente al análisis, se traduce en un incremento de los costos y complejidad de los análisis.

Los métodos que se ensayaron como alternativos, permiten acortar los tiempos de análisis y/o aumentar la especificidad.

CITOMETRÍA DE FLUJO:

La citometría de flujo consiste en una técnica de análisis que permite estudiar características estructurales y funcionales de partículas y células en suspensión. La importancia de los análisis de citometría de flujo radica en que se realizan medidas sobre partículas individuales dentro de una suspensión al pasar a través de una fuente de luz de alta intensidad a gran velocidad. Esta metodología cuenta con la capacidad de medir múltiples parámetros celulares basados en la dispersión de la luz y en la fluorescencia.

La dispersión de la luz se basa en el principio físico que ocurre al incidir un haz de luz sobre una célula, cambiando la dirección de la luz pero no su longitud de onda. Las características celulares que contribuyen a la dispersión de la luz son el tamaño celular, el núcleo, la membrana celular y el material granular del interior. También la forma de la célula y si la superficie es lisa o rugosa.

La fluorescencia ocurre cuando una molécula es excitada por un haz de luz de una longitud de onda determinada y vuelve a su estado basal (no excitado) por la emisión de luz a una longitud de onda diferente. Las moléculas que cuentan con esta propiedad se denominan compuestos fluorescentes, fluoróforos o fluorocromos.

La citometría de flujo tiene múltiples aplicaciones. Existe un amplio espectro de compuestos fluorescentes disponibles para estimar directamente parámetros celulares como contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, potencial de membrana, entre otros. La conjugación con ligandos y anticuerpos ha hecho posible la determinación de densidad y distribución de células que han permitido el estudio más profundo de dichas poblaciones. Las aplicaciones de esta tecnología a la microbiología han permitido la discriminación e identificación de microorganismos por la dispersión de la luz y el empleo de combinaciones de fluorocromos o anticuerpos marcados. Actualmente es posible emplear esta metodología para determinaciones cuantitativas mediante la utilización de un estándar interno. (Ormerod M.G., 1990; Davey H.M. et al., 1996).

❖ *Características generales de un citómetro de flujo:*

El citómetro de flujo consiste, básicamente, en una fuente de luz, un sistema de flujo celular, los componentes ópticos para diferenciar y seleccionar las modificaciones impartidas a la luz incidente, los elementos electrónicos para amplificar y procesar la señal resultante y un ordenador (Figura 3.1).

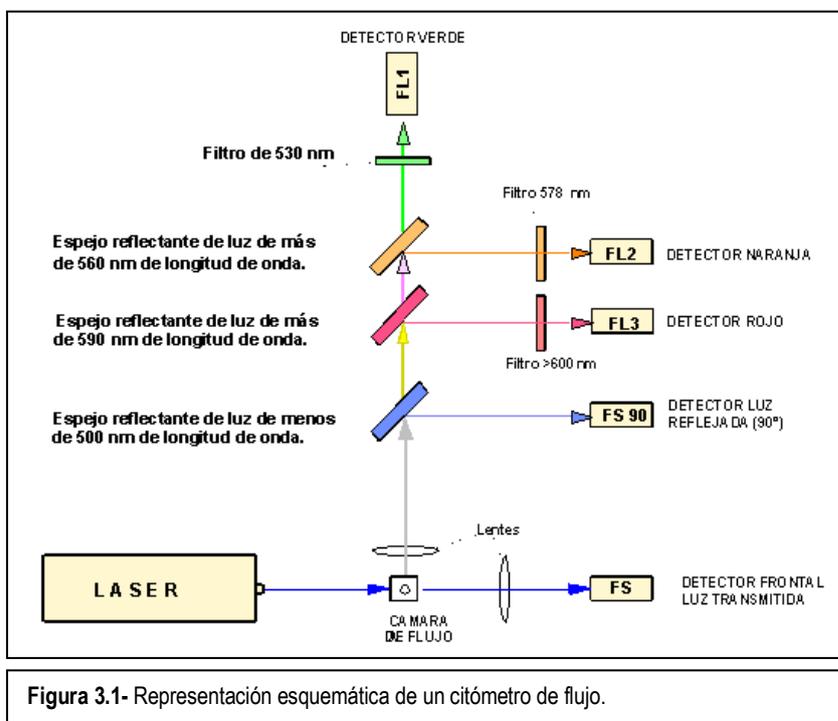


Figura 3.1- Representación esquemática de un citómetro de flujo.

Los citómetros poseen dos sistemas de medida: los sistemas de dispersión y los de fluorescencia.

El sistema de dispersión hacia delante, situado justo enfrente de la fuente emisora, se denomina "Forward Scatter" (FS). Cuando el haz de luz láser incidente atraviesa una célula o partícula, sufre una dispersión que puede ser evidenciada en un fotodetector como una disminución de la luz incidente.

El tiempo que dure el corte en la llegada de fotones al detector será proporcional al diámetro, y por tanto el volumen, celular.

Además del detector de luz situado frente al haz láser, existe otro grupo óptico que detecta la luz dispersada por las células y que se coloca formando un ángulo de 90° con el haz incidente. Esta luz es descompuesta, mediante los filtros apropiados para poder estudiar tanto la dispersión de luz de la misma longitud de onda del láser ("Side Scatter") como la emitida por los fluorocromos. La mayor o menor dispersión de la luz en este detector, será proporcional a la rugosidad de la superficie celular y a las estructuras y organelos celulares (Matas Parra C., 1997) (figura 3.2).

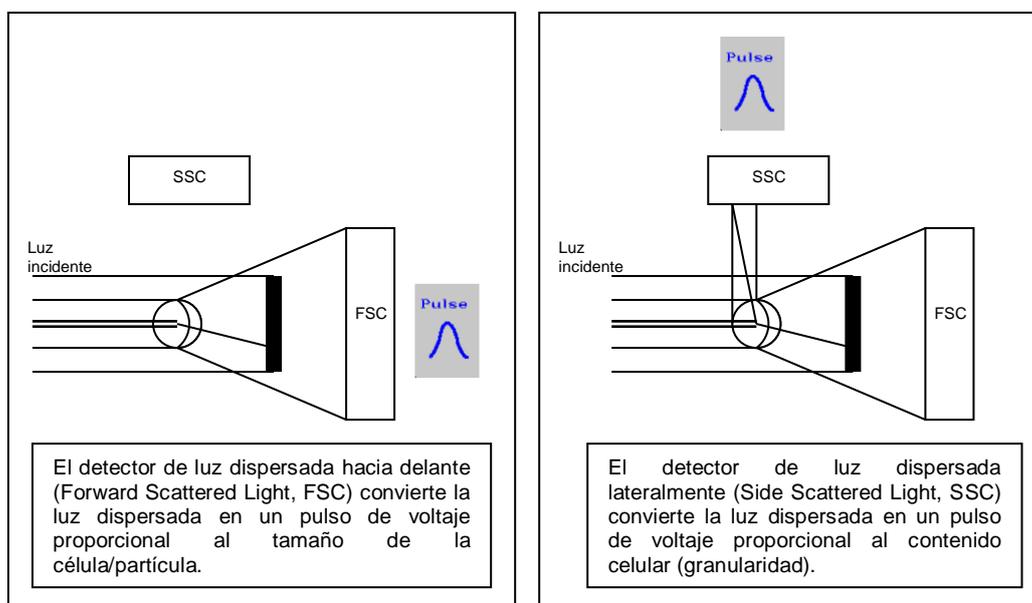


Figura 3.2- Representación de los detectores FSC y SSC.

La luz correspondiente a las diferentes emisiones fluorescentes se recoge en ángulos cercanos a los 90° junto con la luz dispersada lateralmente. Un sistema óptico permite separar la luz que aporta cada una de las emisiones fluorescentes correspondientes a cada uno de los fluorocromos presentes en la célula. Esta propiedad es la que permite utilizar de forma simultánea diferentes fluorocromos y así realizar un análisis multiparamétrico (http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm).

❖ *Fluorescencia y compuestos fluorescentes:*

El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando una molécula excitada por un haz de luz de una longitud de onda determinada, vuelve al estado basal mediante la emisión de luz a una longitud de onda mayor.

Cuando la excitación del compuesto fluorescente se detiene (quitando la fuente de luz), las emisiones fluorescentes cesan rápidamente. Esto distingue la fluorescencia de un fenómeno relacionado conocido como fosforescencia, el cual continúa por cierto tiempo. La diferencia existente entre las longitudes de onda de la luz incidente y la luz emitida hace posible el empleo de filtros ópticos para la separación de la luz de excitación y la luz de emisión, permitiendo así cuantificar la fluorescencia generada por un determinado compuesto.

Existen propiedades de las diferentes moléculas fluorescentes que las hacen más o menos apropiadas para la citometría de flujo. El coeficiente de excitación es una medida de la cantidad de luz que puede absorber a una determinada longitud de onda. Las moléculas fluorescentes ideales deben tener su máxima capacidad de absorción a una longitud de onda cercana a la longitud de onda de emisión de la fuente (alto coeficiente de excitación), pero distante del máximo de excitación de las moléculas con capacidad de autofluorescencia presentes en el interior de las células (piridina, flavina).

Otro factor que debe considerarse es la fotoestabilidad, es decir, el número de veces que una molécula puede ser excitada antes de descomponerse; de todas maneras esta propiedad cobra mayor importancia para los estudios de microscopía de fluorescencia ya que en el caso de la citometría de flujo las moléculas permanecen un tiempo muy corto en la zona de excitación.

El tiempo entre el estado de excitación y la emisión por parte de la molécula fluorescente puede tener importancia dado que una emisión rápida (del orden de nanosegundos) puede permitir que la molécula sea excitada más de una vez al pasar por la zona de iluminación.

Las propiedades físicas de los compuestos fluorescentes juegan un rol fundamental, es importante considerar la solubilidad en agua, la capacidad de penetración en las células y la toxicidad de la molécula. (Davey H.M. et al., 1996). Algunas moléculas fluorescentes empleadas en citometría de flujo se listan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1- Fluoróforos empleados en citometría de flujo

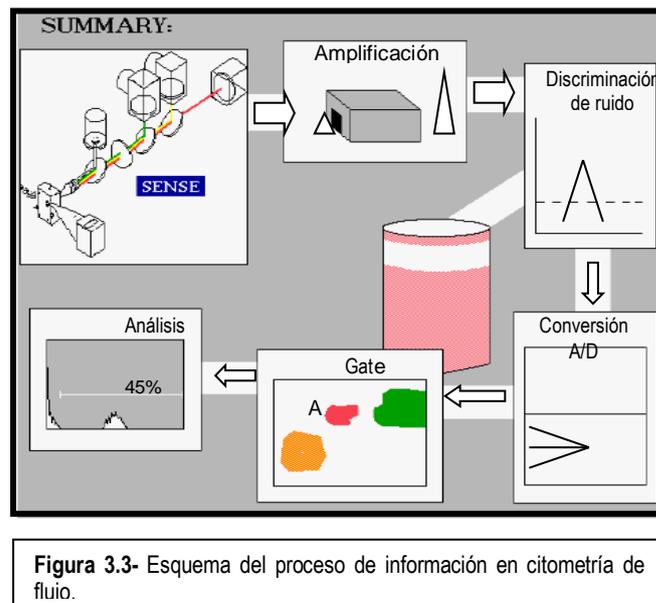
Fluoróforo	Ex (máx.) ^a (nm)	Em (máx.) ^a (nm)
Ethidium bromide	521	602
Propidium iodide	530	618
SYTO9	482	500
Texas Red	591	613
Thiazole orange	509	525

a- Ex (máx.) y Em (máx.) se refieren a las longitudes de onda correspondientes a los picos de excitación y emisión respectivamente.

Los valores de longitud de onda de absorción y emisión están sujetos a un pequeño grado de variación dependiendo de las condiciones de medida.

❖ *Procesamiento de las señales y representación de datos:*

La figura 3.3 representa el proceso que sufre la información generada a partir de los diferentes detectores hasta la representación de la misma mediante modelos informáticos.



La información obtenida por técnicas de análisis de citometría de flujo se representa en forma de distribuciones de frecuencia o histogramas de una o dos dimensiones, o en modo lista, que consiste en guardar toda la información obtenida para cada evento de modo que se pueden modificar las regiones de análisis y reconstruir los histogramas en función de nuevos parámetros de selección.

La citometría de flujo permite el estudio de múltiples características celulares combinando las lecturas sobre señales de dispersión de luz y señales fluorescentes. El empleo de fluorocromos con longitudes de onda de excitación compatibles con la fuente de luz del citómetro y con distintos espectros de emisión posibilita el estudio simultáneo de varias propiedades o características sobre células incluso en muestras heterogéneas (Montserrat J., 2009).

La representación monoparamétrica de datos consiste en histogramas, en los que se representa en cada valor de abscisas (intensidad de fluorescencia) el número de células que emiten esa intensidad (figura 3.4 A). Las distribuciones de frecuencia de dos parámetros, también denominadas citogramas, representan en cada eje la intensidad de fluorescencia de un parámetro diferente. Las más comunes son las distribuciones de frecuencia de puntos ("dot plots") donde cada punto representa a una partícula analizada, y la distribución de los puntos permite visualizar las contribuciones relativas de cada región de rangos de intensidad de fluorescencia. La utilización de representaciones en dos dimensiones permite establecer de manera visual cual es la correlación entre cualesquiera dos parámetros (figura 3.4 B). Otra característica propia del análisis de datos de citometría de flujo es la utilización de ventanas de análisis ("gates") (figura 3.4 C). El establecimiento de ventanas de análisis se utiliza tanto para seleccionar de manera específica la población de células o partículas de interés, como para simplificar el análisis de poblaciones heterogéneas en las que se analizan simultáneamente un número elevado de parámetros.

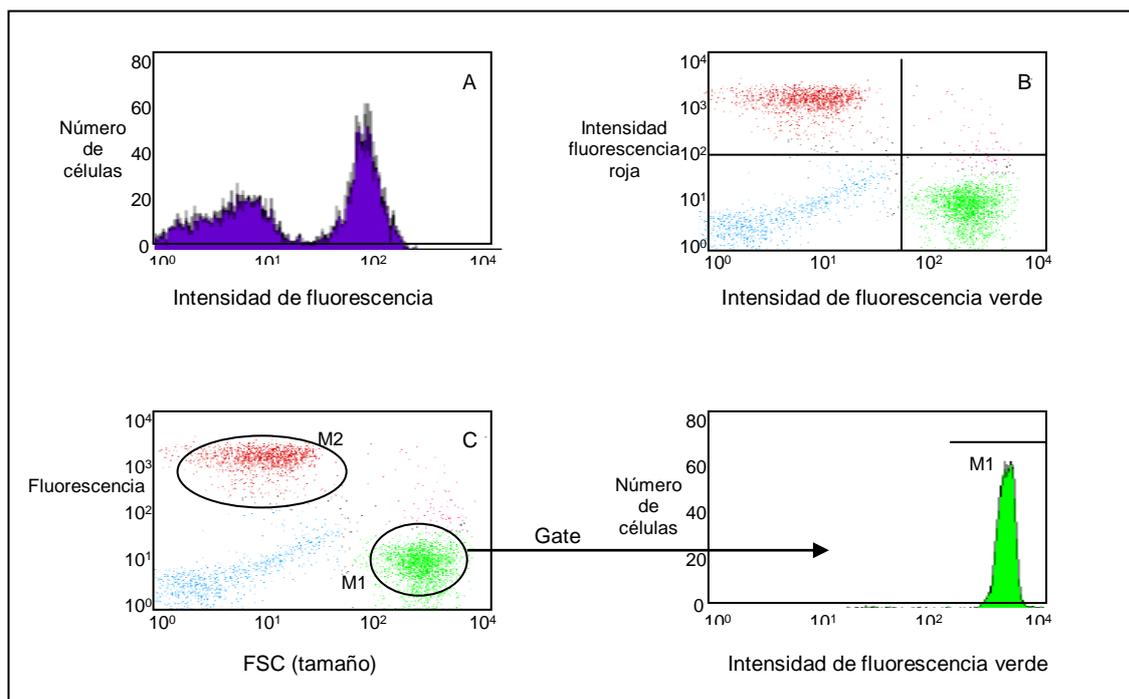


Figura 3.4. Representación de datos de Citometría de Flujo.

Cuando se trata de análisis por citometría con dos o más fluorocromos se busca marcar las células con moléculas distintas que reflejen las diversas propiedades celulares y detectar la señal proporcional a cada una de los fluorocromos empleados en los detectores adecuados sin desviaciones producidas por interferencias de la señal. Sin embargo los fluorocromos tienen espectros de emisión que en ocasiones se superponen y los filtros no son perfectos, por ello los citómetros poseen un sistema informático de compensación o sustracción de señal. Es difícil predecir teóricamente el grado de compensación y por lo tanto debe ser ajustado individualmente.

Nivel umbral (Threshold):

El umbral puede utilizarse para limitar el número de eventos y debe fijarse en un parámetro. Cuando se define un valor de umbral, únicamente las señales con igual o mayor intensidad serán procesadas.

❖ *Aplicación de la citometría de flujo en el análisis microbiológico de sistemas de agua:*

La citometría de flujo es una herramienta alternativa potencial para el análisis de bacterias en muestras de agua, permitiendo la clasificación y conteo de estas células sin necesidad de cultivar (Hammes F. et al., 2008). Mediante la aplicación de esta metodología es posible diferenciar células viables de no viables así como bacterias Gram positivas de bacterias Gram negativas dependiendo de la combinación de colorantes seleccionada. Además de la clasificación de la población bacteriana es posible una cuantificación de la misma. Para ello se emplea una suspensión de microesferas marcadas como estándar de referencia para un volumen dado de muestra. El tamaño y fluorescencia de las microesferas

debe ser cuidadosamente seleccionado para asegurarse que sea claramente distinguible de la población de bacterias marcadas en el diagrama de citometría. La concentración de bacterias se determina correlacionando el número de bacterias y el de microesferas (estándar de referencia) en el citograma (Berney M. et al., 2007).

La aplicación de esta metodología a la microbiología presenta limitaciones que deben ser tomadas en cuenta al momento del diseño de los ensayos e interpretación de resultados:

1. Criterio de viabilidad: La viabilidad de las bacterias no siempre se define fácilmente únicamente en términos fisiológicos y morfológicos. Si bien en términos generales los métodos de cultivo convencional arrojan resultados que se correlacionan con los ensayos de viabilidad por citometría; bajo ciertas condiciones, bacterias con ciertas estructuras de la membrana comprometida (que serían catalogadas como “muertas” por citometría de flujo) pueden ser recuperadas por cultivo. Inversamente, algunas bacterias con membranas intactas son incapaces de reproducirse en medios nutrientes, pero emitirán en la zona de bacterias “vivas” en el citograma.
2. En la citometría de flujo, las bacterias se definen únicamente en base a su tamaño y capacidad de tinción. Lo ideal sería poder inspeccionar cada muestra por microscopía de fluorescencia para confirmar que las partículas contadas por el citómetro son realmente bacterias.
3. Cuando se procesan muestras muy diluidas se necesitan tiempos de adquisición más largos y consecuentemente el ruido puede volverse más significativo. En estos casos son importantes los controles para poder estimar la contribución del ruido.

De todas maneras, la citometría de flujo proporciona una alternativa importante para dar una respuesta rápida sobre la calidad del agua del sistema en un determinado momento. En este trabajo se propone estudiar la capacidad de aplicación de esta metodología a este tipo de sistemas en condiciones reales de trabajo.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA:

La Microscopía de fluorescencia se basa en el principio de fluorescencia en el que una molécula fluorescente, ya sea una sustancia natural presente en las células o un colorante aplicado, es estimulada por un haz de luz emitiendo parte de la energía absorbida bajo la forma de fluorescencia. Siendo escasas las moléculas autofluorescentes, su aplicación más difundida es para revelar una fluorescencia agregada mediante el empleo de moléculas fluorescentes. Se trata de una de las técnicas microscópicas más ampliamente utilizadas debido a sus dos principales ventajas: el empleo de moléculas de unión específica permite observar características fisiológicas de las células y la posibilidad de observación de estructuras celulares.

El microscopio de fluorescencia es básicamente similar al microscopio óptico convencional, a excepción de que la luz incidente que procede de una potente fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la

longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo (Huang B. et al., 2009) (figura 3.5).

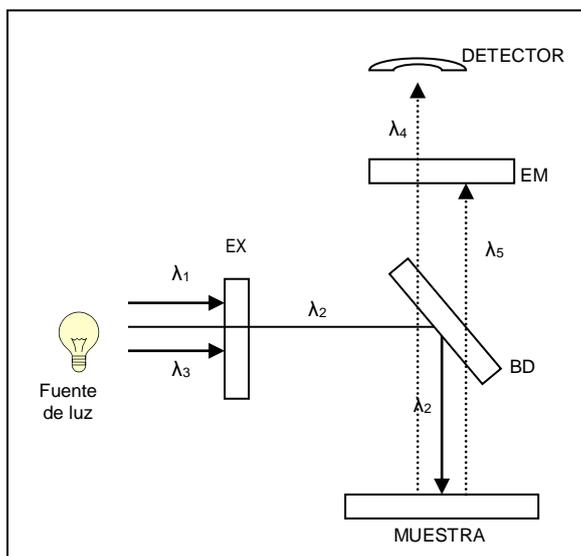


Figura 3.5- Componentes de un microscopio de fluorescencia. El filtro de excitación (EX) selecciona la longitud de onda (λ_2) del espectro de luz incidente y la dirige a la muestra por medio de un espejo dicróico (BD). El filtro de emisión (EM) transmite selectivamente una porción de la fluorescencia emitida a una longitud de onda determinada (λ_4), bloqueando los otros componentes (λ_5).

Principio de fluorescencia:

El proceso de fluorescencia se expuso detalladamente en la parte 2 de este capítulo "Citometría de flujo". La figura 3.6 resume las etapas de este fenómeno.

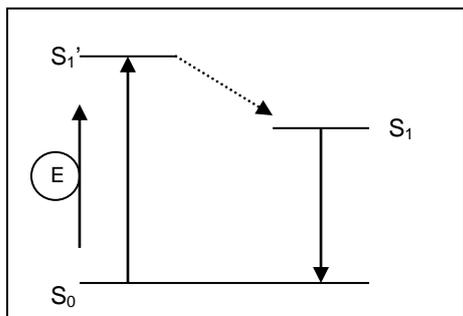


Figura 3.6- Proceso de fluorescencia. Una fuente externa aporta un fotón de energía (E) a una molécula fluorescente que se encuentra en su estado basal (S_0), llevándola a un estado excitado (S_1'). La molécula permanece en el estado excitado por un período finito de tiempo, parte de la energía es disipada, alcanzando un estado excitado relajado donde se origina la emisión fluorescente (S_1). La energía emitida que produce la fluorescencia permite a la molécula alcanzar nuevamente el estado basal (S_0).

Espectro de fluorescencia:

Los fluoróforos presentan espectros fluorescentes de excitación y espectros fluorescentes de emisión. El ancho de banda de estos espectros es un parámetro de particular importancia, fundamentalmente para la aplicación de técnicas en las que se emplean dos o más fluoróforos simultáneamente. La excitación de una misma molécula a diferentes longitudes de onda tendrá espectros de excitación de amplitudes diferentes. Si bien esto no tiene influencia sobre los perfiles de emisión para esa molécula, producirá variaciones en la intensidad de fluorescencia de emisión (figura 3.7), esto explica la importancia en la selección del espectro de fluorescencia de excitación.

La tabla 3.2 establece propiedades importantes acerca de los espectros de las moléculas fluorescentes que deberían ser tomadas en cuenta al momento de la selección de las mismas (Invitrogen Life Science, 2010).

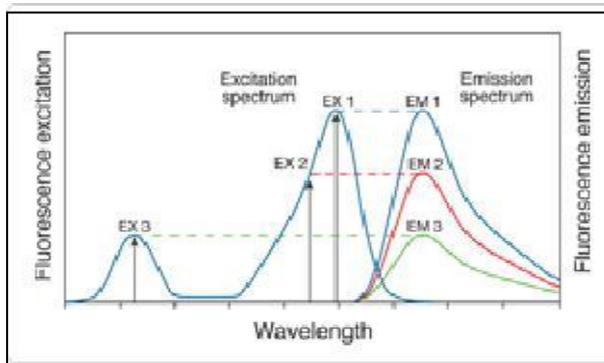


Figura 3.7- Representación de los espectros de excitación y emisión para una misma molécula.

EX1, EX2, EX3 corresponden a los espectros de excitación del fluoróforo a tres longitudes de onda diferente. EM1, EM2, EM3 corresponden a los espectros de emisión correspondientes.

Tabla 3.2- Propiedades de las moléculas fluorescentes

Propiedad	Significado
Espectro de fluorescencia de excitación	La energía de excitación debe ser de una longitud de onda lo más cercana posible al pico del espectro de excitación del fluoróforo
Espectro de absorción	Generalmente el espectro de absorción de una sustancia coincide con el espectro de excitación.
Espectro de fluorescencia de emisión	La discriminación entre los espectros de emisión de cada sustancia es la base para el análisis empleando más de un fluoróforo y para la resolución entre la emisión de las sondas fluorescentes y la autofluorescencia de fondo.
EC (Extinction coefficient)	Se refiere a la capacidad de absorción de luz a una determinada longitud de onda.
QY (Fluorescent Quantum Yield)	Se refiere al número de fotones fluorescentes emitidos por fotón de excitación absorbido.
Quenching (pérdida de fluorescencia)	Es la pérdida de la señal fluorescente debido a interacciones entre el fluoróforo y el entorno molecular (incluyendo otros fluoróforos)
Pérdida de fluorescencia	La pérdida de la señal fluorescente es irreversible y está relacionada con la duración de exposición e intensidad de la fuente de excitación.

Interferencias:

Muchas veces el límite de detección está comprometido por señales de fondo, estas pueden generarse por componentes propios de la muestra (autofluorescencia) o por moléculas fluorescentes unidas de forma inespecífica o libres en la muestra. La detección de autofluorescencia puede minimizarse seleccionando filtros que reduzcan la transmisión de ésta en relación a la fluorescencia emitida por el colorante (Figura 3.8) o seleccionando sondas fluorescentes que absorban y emitan a mayores longitudes de onda.

Muchas veces los análisis se llevan a cabo empleando más de un fluoróforo para determinar diferentes propiedades en una muestra, en estos casos se vuelve muy importante la separación de las múltiples señales y la selección más adecuada de las diferentes moléculas que se deben utilizar (Invitrogen Life Science, 2010).

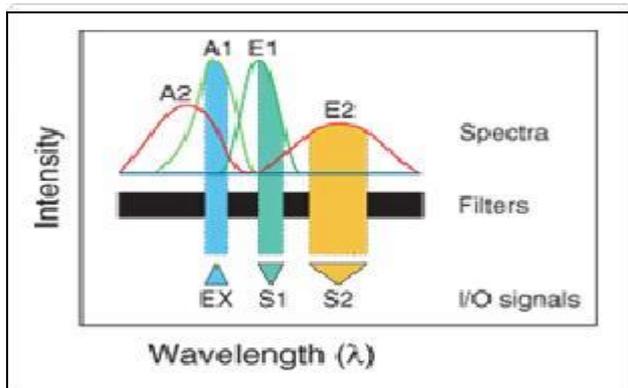


Figura 3.8- Interferencia en la detección de fluorescencia.

La energía de excitación (EX) coincide con el solapamiento de los espectros de excitación de dos compuestos (A1 y A2) produciendo dos espectros de emisión (E1 y E2). El empleo de filtros permite separar las dos señales (S1 y S2).

Pérdida de fluorescencia:

Uno de los problemas de la utilización de fluorocromos en microscopía de fluorescencia es la pérdida gradual de la fluorescencia o “decaimiento” debido a las grandes intensidades de luz empleadas; es por esta razón que las muestras no pueden ser observadas durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, se han desarrollado métodos que permiten reducir este efecto, como son el uso de reactivos protectores de la fluorescencia, el uso de fluorocromos con poco “decaimiento”, el empleo de luz de excitación de menor intensidad o la reducción del tiempo de exposición ya sea mediante el direccionamiento del 100% de la luz hacia el dispositivo de registro (cámara, película) o el empleo de mecanismos de medición de la exposición óptima (automática) para reducir la iluminación al máximo.

Los reactivos protectores de la fluorescencia son moléculas que aportan al fluorocromo aquellos electrones que ha perdido por la emisión fluorescente. Se trata de moléculas donadoras de electrones que deben encontrarse para ser efectivas en estrecha vecindad a las moléculas de fluorocromo. Además son específicas de fluorocromo pues los electrones que pueden donar sólo serán donables si se encuentran en niveles de energía ligeramente superiores a los propios del fluorocromo en reposo (Berney M. et al., 2007).

Aplicación de la microscopía de fluorescencia al sistema de trabajo:

Se planteó la microscopía de fluorescencia como alternativa a los métodos convencionales de cultivo debido a que existe un número significativamente mayor entre los microorganismos presentes en un sistema de tratamiento de agua y aquellos que pueden ser cultivados en medios de cultivos sintéticos, ya que estos solamente detectan una pequeña fracción del total de la población microbiana que se manifiesta en estos sistemas. Para alcanzar una comprensión más completa de todo el sistema se debería lograr cuantificar la totalidad de los microorganismos.

La microscopía de fluorescencia permite no solamente el análisis directo de células, sino que además brinda la posibilidad de diferenciar bacterias viables y no viables en base a su permeabilidad a colorantes.

Para lograr buenos resultados con esta metodología y minimizar las interferencias se vuelve un aspecto fundamental la selección de los filtros y colorantes que serán empleados en el sistema. Seleccionar el set de filtros correcto requiere conocer los espectros de excitación y emisión de los colorantes que serán empleados en el análisis. La tabla 3.1 lista las características de los espectros de los fluorocromos.

PCR EN TIEMPO REAL:

En la PCR a tiempo real, también llamada PCR cuantitativa (qPCR); los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Agentes intercalantes:

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. Estos compuestos se unen al DNA intercalándose en la doble hélice, y generando una señal fluorescente cuando la muestra es excitada por una fuente de luz (Figura 3.9). Sin embargo, cuando se encuentran libres en solución presentan una señal de base muy baja. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green.

El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de primers, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los primers para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Otra estrategia posible para minimizar este problema, es iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad.

Una herramienta fundamental para asegurarse la especificidad es la determinación de la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados, es decir, la temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado (T_m). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR.

Una ventaja importante de la utilización de agentes intercalantes es que la optimización de las condiciones de la reacción resulta más sencilla frente al empleo de sondas específicas, además de ser una metodología más económica (Costa J., 2004; Valasek M.A. et al., 2005).

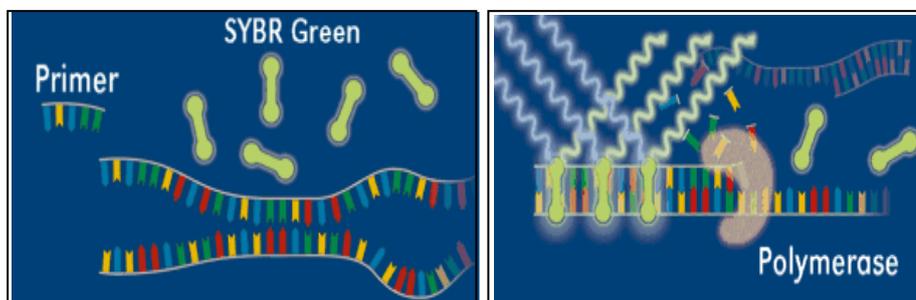


Figura 3.9- Mecanismo de Agentes intercalantes (SYBR Green I)

Sondas de hibridación específicas:

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas "Taqman", las sondas "molecular beacons" y las sondas "FRET" (Figura 3.10). (Costa J., 2004; Valasek M.A. et al., 2005).

1. Sondas de hidrólisis:

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda.

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador y separando físicamente las moléculas del donador y el aceptor, permitiendo de esta manera la detección de la señal emitida por el primero.

2. Molecular beacons:

Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana.

Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es

absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero.

3. Sondas FRET:

El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales (Costa J., 2004).

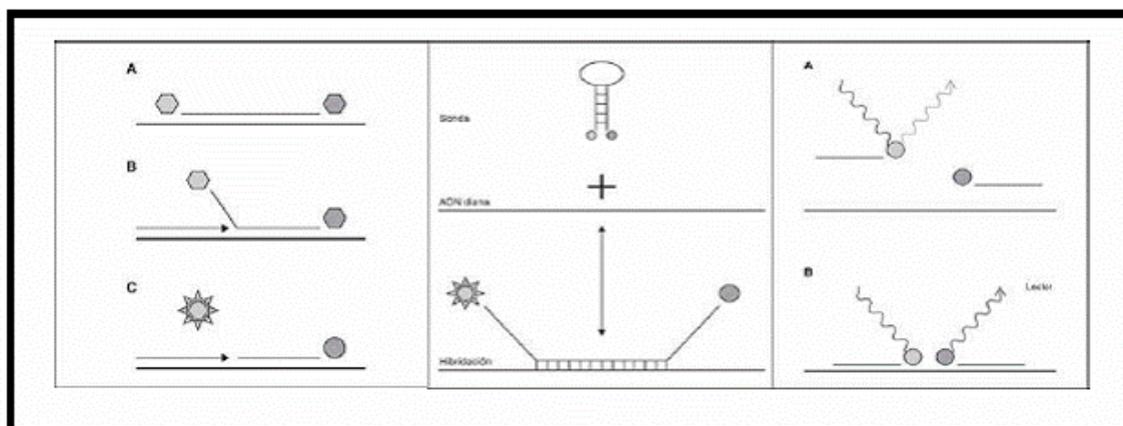


Figura 3.10- Sondas específicas Taqman, molecular beacons y sondas FRET.

Cuantificación del ADN e interpretación de los resultados:

La cuantificación de la concentración inicial de ADN en una muestra puede realizarse simplemente añadiendo controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN para construir una curva patrón. En la PCR a tiempo real el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (Figura 3.11-A). Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina ciclo umbral (C_t , de *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_t correspondientes se dibuja una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los C_t de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial.

Curvas de disociación:

Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la T_m de los amplicones para comprobar su especificidad (Figura 3.11-B).

Ventajas de la PCR a tiempo real:

La primera gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y en un rango mucho mayor que en los procedimientos convencionales (Costa J., 2004; Valasek M.A., 2005).

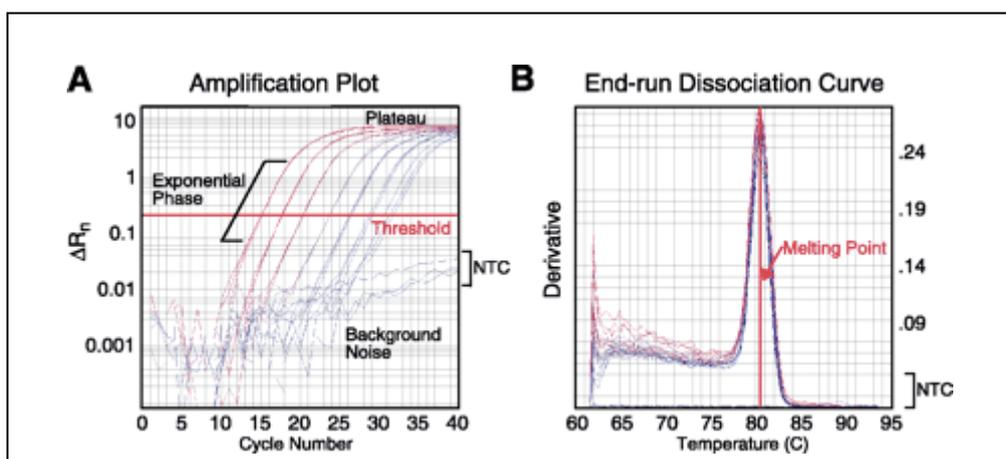


Figura 3.11- Resultados de una reacción de PCR en tiempo real.
A: Incremento de la señal fluorescente con cada ciclo de PCR y determinación del ciclo umbral (Ct).
B: Curvas de disociación, se indica T_m .

Monitoreo de microorganismos mediante métodos moleculares:

Si bien es posible emplear métodos convencionales para el monitoreo de la calidad del agua, es bien conocido el hecho de que un número importante de microorganismos presentes en el agua no pueden ser recuperados en estas condiciones. Muchas veces estos microorganismos alcanzan un estado fisiológicamente alterado, en el cual permanecen viables pero no son cultivables. En este trabajo se enfatizó la búsqueda de *Stenotrophomonas maltophilia*, que se conoce como microorganismo asociado a problemas en centros de diálisis y la posibilidad de aplicación de PCR en tiempo real sobre sistemas de esta naturaleza para su análisis cuantitativo. En esta instancia del trabajo se buscó realizar ensayos preliminares que nos permitieran evaluar la aplicación de esta metodología a sistemas de purificación de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE AGUA

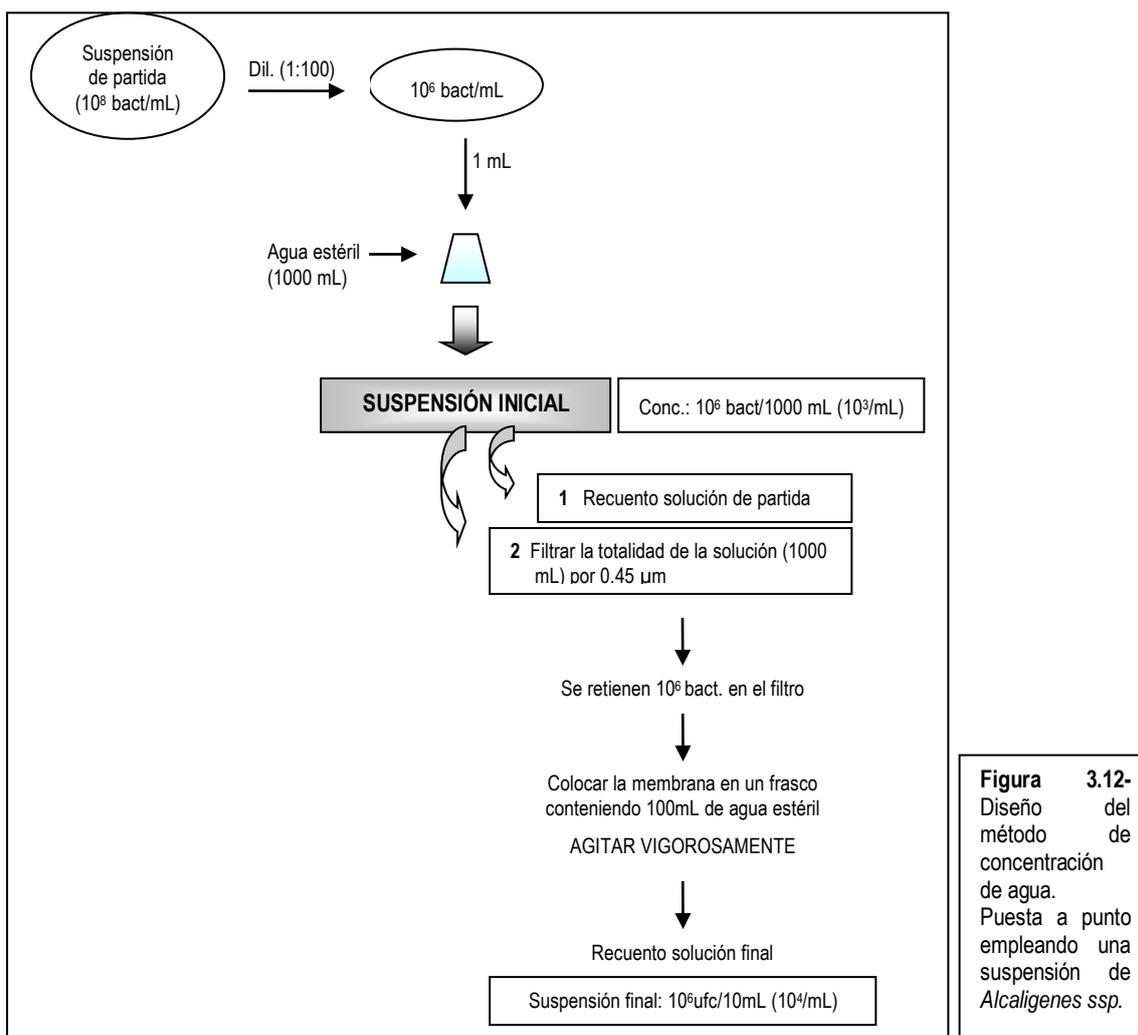
Para el sistema objeto de trabajo se diseñaron métodos de concentración de las muestras de agua empleando el principio de filtración y se realizó la validación de dicha metodología para evaluar la aplicabilidad de la misma sobre el sistema.

Para el diseño se realizaron pruebas con una suspensión del microorganismo que fue seleccionado como modelo para la realización de los análisis de citometría y microscopía, *Alcaligenes sp.*, como se describe más adelante. Tomando en cuenta las características del microorganismo en cuestión, las “muestras” se filtraron a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore), empleando una bomba de vacío (Sartorius) con flujo controlado. Una vez realizada la filtración de la totalidad de la muestra (1000 mL), la membrana se suspendió en el volumen final preestablecido de agua estéril (100 mL) y fue sometida a fuerte agitación utilizando vortex (se agitó 4 veces durante 1 minuto en un período de 10 minutos). En esta etapa del diseño se fijó el factor de concentración en 10.

Para conocer la eficiencia de esta metodología, se llevó a cabo el procedimiento descrito, partiendo de una suspensión con una concentración conocida de microorganismos (estimada empleando la escala de McFarland en 3×10^8 bacterias/mL) y se realizó el seguimiento de la misma empleando el método de recuento en placa para evaluar la recuperación (Figura 3.12).

Los recuentos se realizaron por el método de siembra incorporado en R2A, las placas se incubaron a 32.5 ± 2.5 °C durante 5 días.

Se realizaron dos repeticiones independientes del procedimiento.



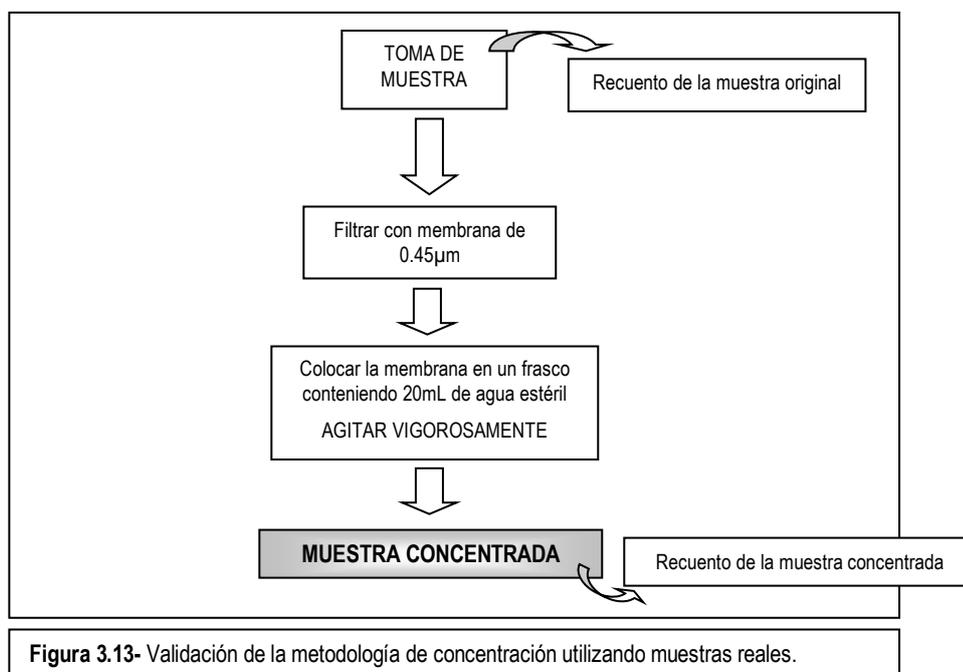
Una vez realizados los ensayos de prueba empleando la suspensión de *Alcaligenes sp.*, se realizó la segunda etapa del diseño que implicó trabajar con muestras del sistema de manera de reproducir las condiciones reales de trabajo considerando las posibles interferencias y recuentos de órdenes más bajos. Se seleccionaron muestras correspondientes a los picos de salida para posicionarnos en la situación más desfavorable, dado que se trata de los puntos de llegada del agua a las máquinas y por lo tanto sería esperable una concentración baja de microorganismos.

Se realizó el mismo procedimiento que el realizado en la primera etapa pero en esta instancia se realizó una concentración de un factor de 100 (Figura 3.13).

Para determinar la eficiencia de este procedimiento aplicado a las muestras del sistema se realizó el seguimiento de las muestras durante el proceso de concentración. Para ello se procedió a la toma de muestra y se realizó recuento de microorganismos heterótrofos para conocer la situación inicial de la muestra. A continuación se llevó a cabo el proceso de filtración de acuerdo a lo establecido en la primera etapa, con la diferencia de que se filtraron 2000 mL de muestra y el volumen final en el que se suspendió la membrana fue de 20 mL. Finalmente se contó la muestra concentrada.

El ensayo se repitió cuatro veces en las mismas condiciones.

Los recuentos de la muestra original se realizaron empleando el método filtración por membrana (se realizó filtrando 100 mL y 10 mL) debido a la baja carga esperada en estas muestras; mientras que las muestras concentradas se contaron por el método de siembra incorporada (1 mL), preparando las diluciones previas correspondientes para cada caso. El medio de cultivo empleado fue R2A, las placas fueron incubadas a $32,5 \pm 2.5$ °C durante 5 días.



2- CITOMETRÍA DE FLUJO:

❖ Diseño de las experiencias:

a- Determinación de bacterias por citometría de flujo. Puesta a punto de la metodología de trabajo:

Para poner a punto esta técnica se realizaron ensayos con suspensiones preparadas a partir de una cepa aislada del sistema de agua empleado como modelo del trabajo, la cual fue identificada en nuestro laboratorio mediante secuenciación del gen ARNr 16S como *Alcaligenes sp.* El criterio para la selección de este microorganismo como modelo de análisis se basó en la recuperación del mismo en el sistema tras la ocurrencia de episodios de chucho. Se trata de un bastón Gram negativo que ha sido reportado en este tipo de sistemas (Bueno Montanari L. et al., 2009).

El colorante empleado para la realización de estos ensayos fue Thiazole Orange, se trata de un colorante permanente con la capacidad de penetrar tanto en células vivas como en células muertas (BD Biosciences). La experiencia consistió en preparar diluciones seriadas a partir de la suspensión de *Alcaligenes sp.* y realizar los ensayos de citometría. De forma paralela se sembraron los recuentos de las diluciones correspondientes por el método de recuento en placa para evaluar los resultados obtenidos.

Con este ensayo no se pretende cuantificar el número de bacterias por citometría de flujo sino realizar una estimación grosera del mismo y determinar la mayor dilución para la cual es posible detectar bacterias empleando esta metodología. Se debe tener en cuenta que la citometría de flujo (como está planteada en esta instancia) no detecta únicamente las bacterias viables a diferencia de los métodos tradicionales de cultivo.

b- Aplicación de la metodología a muestras obtenidas del sistema:

En esta instancia se buscó evaluar la aplicabilidad de la metodología a muestras reales con base en los resultados obtenidos en la etapa anterior. Se realizó además la cuantificación de bacterias mediante el empleo de microesferas (*CountBright™ Absolute Counting Beads for flow Cytometry*, Product Information 2005) como estándar interno. Las muestras fueron sometidas a un proceso previo de concentración de acuerdo al procedimiento establecido anteriormente con el fin de alcanzar un número de microorganismos suficiente para llevar a cabo el análisis.

El punto de muestreo seleccionado fue TM3 (post carbón activado), fundamentando esta elección en el hecho de que se trata del punto del sistema que presenta mayores recuentos de bacterias.

En base a resultados obtenidos en esta instancia se llevó a cabo una segunda etapa de análisis cambiando el criterio para la selección de las muestras, se repitieron los ensayos, ahora sobre muestras de TM6 (post ósmosis) y P6 (pico de salida N°6), las cuales fueron sometidas al mismo tratamiento de concentración.

Paralelamente al análisis de las muestras se procesó una suspensión de *Alcaligenes sp.* preparada a partir de un cultivo de 24 horas en R2A, con el fin de contar con una muestra de la cual se pueda estimar el número de bacterias viables, ya que no se conoce el estado fisiológico de la población presente en las muestras del sistema.

Se sembraron además, los recuentos de las diluciones correspondientes por el método de recuento en placa para evaluar los resultados obtenidos.

c- Detección y cuantificación de bacterias viables y no viables. Puesta a punto y estudio del límite de detección del método:

La puesta a punto de los ensayos de diferenciación de bacterias viables y no viables y cuantificación de las mismas se realizó a partir de suspensiones de *Alcaligenes sp.*, realizando simultáneamente los recuentos correspondientes por métodos convencionales. Para las determinaciones de células no viables se emplearon fracciones de las mismas suspensiones sometidas a un tratamiento de esterilización por calor.

Debido a que el recuento en placa de las suspensiones empleadas en los ensayos de citometría se leen al menos 48 después de su siembra, no se tiene una estimación verdadera del número de microorganismos en la suspensión al momento de realizar la citometría. Tomando en cuenta lo anterior, se realizó una evaluación de la cinética de muerte de una suspensión de *Alcaligenes sp.* mediante la

construcción de una curva de muerte del microorganismo en cuestión para conocer el comportamiento de dichas suspensiones y poder estimar como baja el número de bacterias viables en las condiciones de trabajo establecidas. Así, fue posible emplear una suspensión preparada y contada 48 horas antes y conocer con mayor certeza el número de bacterias viables al momento de realizar la citometría.

*Evaluación de la cinética de muerte de una suspensión de *Alcaligenes sp.*:*

Para este estudio se consideraron los resultados de cuatro ensayos independientes reproduciendo en todos los casos las mismas condiciones: se preparó una suspensión de *Alcaligenes sp.*, ajustada al N°1 según la escala de MacFarland, a partir de un cultivo de 24 horas en R2A. Cada suspensión fue almacenada en refrigerador (2-8 °C) y se sembraron recuentos de las diluciones correspondientes de cada suspensión con una frecuencia diaria durante 72 horas. Con base en los resultados obtenidos en estos ensayos se construyó una curva de muerte para dicho microorganismo en las condiciones mencionadas.

Para la determinación del límite de detección se realizaron corridas empleando diluciones seriadas de suspensiones de concentración conocida. Se llevaron a cabo dos repeticiones independientes para cada concentración de células, realizando una doble tinción (Ioduro de Propidio / SYTO 9) para determinar células viables y no viables. La determinación del límite de detección es importante para conocer cuánto se deberán concentrar las muestras reales para obtener resultados válidos y evaluar la viabilidad de la aplicación de esta metodología con los fines propuestos.

Todos los ensayos realizados en esta segunda etapa se llevaron a cabo empleando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting. El kit emplea los fluorocromos Ioduro de Propidio y SYTO 9 y una suspensión calibrada de microesferas que sirve como estándar de referencia para determinar el volumen de muestra adquirido. Con las proporciones adecuadas de ambos colorantes, las bacterias con las membranas intactas emiten fluorescencia verde mientras que las bacterias con las membranas dañadas emiten fluorescencia roja, logrando así la diferenciación entre células viables y no viables. La concentración de bacterias viables y no viables puede determinarse a partir de la relación de eventos de bacterias y eventos de microesferas en el citograma (Berney M. et al., 2007).

❖ **Reactivos empleados en los ensayos de citometría:**

- Thiazole Orange (TO) (10 µg/mL)
- Absolute Counting Beads (*CountBright™*) (45496 beads/50µL)
- *Kit LIVE/DEAD® BacLight™*:
 - SYTO9 (Component A): 3.3 mM (verde, para bacterias viables).
 - Propidium iodide (Component B): 20 mM (rojo, para bacterias muertas).
 - Microesferas (Component C): 1.0 E8 microesferas/mL (0.6µm de diámetro).

❖ **Equipo:**

Todas las determinaciones se llevaron a cabo con un citómetro de flujo Dako CyAn ADP (Advanced Digital Processing) equipado con un láser azul de emisión a 488nm. El equipo cuenta con un detector FSC (Forward scattered light) y un detector SSC (Side scattered light) y los detectores de fluorescencia (FL-1 – FL-5). El instrumento se ajustó para medir las siguientes señales con amplificación logarítmica: dispersión frontal de luz láser (FSC), como medida del tamaño de la partícula; dispersión lateral de luz (SSC), como medida de la granularidad de la partícula; y emisión de fluorescencia en FL-1 (530/40 nm), FL-2 (575/25 nm) y FL3 (613/20 nm).

El citómetro CyAn ADP opera a través del software Summit™ V4.3.

Ensayos de citometría de flujo:

➤ **Ajuste de parámetros para la realización de las determinaciones:**

En primer lugar se llevó a cabo la determinación del nivel de ruido de fondo del equipo utilizando agua filtrada por filtro 0.22 µm, se realizó una adquisición de 6 minutos con un nivel de velocidad media (predeterminado por el equipo). Una vez corregido este parámetro inherente al equipo se realizaron los controles correspondientes a los colorantes y microesferas utilizadas para cuantificación. Se realizaron los controles de células muertas teñidas únicamente con Ioduro de Propidio (IP) y células viables teñidas únicamente con SYTO9 (“Single Stain”), empleando para ello las suspensiones correspondientes. Además se realizó el control de una suspensión de perlas para posicionar cada una de estas poblaciones en los respectivos diagramas de citometría.

Además de fijar las regiones correspondientes a cada uno de los fluoróforos, el “Single Stain” fue necesario para hacer las compensaciones electrónicas correspondientes, esto implicó la corrección para que en la tinción con Ioduro de Propidio todas las células teñidas aparezcan en la región de emisión dicho colorante y de manera similar para el SYTO9 (Figura 3.14). Los controles negativos respectivos fueron utilizados para delimitar ambas regiones.

Para los ensayos en que se empleó únicamente un colorante (TO) también se realizaron las compensaciones electrónicas adecuadas para el fluoróforo en cuestión.

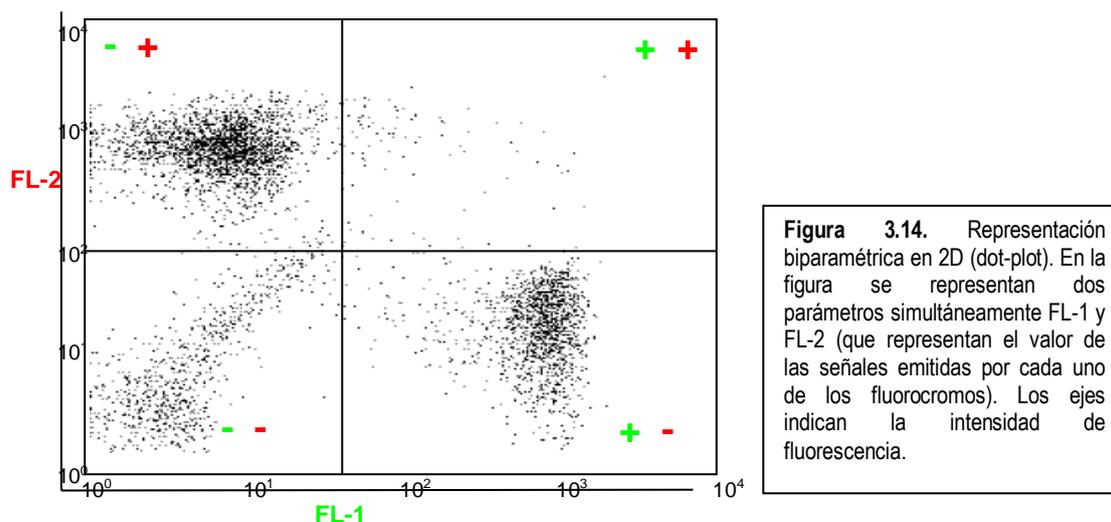


Figura 3.14. Representación biparamétrica en 2D (dot-plot). En la figura se representan dos parámetros simultáneamente FL-1 y FL-2 (que representan el valor de las señales emitidas por cada uno de los fluorocromos). Los ejes indican la intensidad de fluorescencia.

Finalmente, para realizar los análisis por citometría de flujo, fue necesario fijar el Threshold (nivel umbral) en 0.2 (mínimo nivel de la señal), para eliminar el ruido de fondo que es inherente a la muestra. Se configuró el Threshold utilizando agua filtrada y la suspensión de bacterias muertas tratadas con IP y haciendo un “back gate” de bacterias muertas coloreadas con IP en FSC.

Las adquisiciones se realizaron en Dot plot FSC vs SSC en escala logarítmica de amplificación, fijando el Trigger en SSC (parámetro para determinar el umbral). Se fija en el parámetro SSC porque se trata de bacterias y para el parámetro FSC (que se corresponde con el tamaño de partícula) dificultaría aún más su diferenciación con el ruido de fondo.

➤ **Realización de los análisis:**

a- *Determinación de bacterias por citometría de flujo. Puesta a punto de la metodología de trabajo:*

Se preparó la suspensión de *Alcaligenes sp.* en agua destilada estéril ajustada al N°1 según la escala de MacFarland, a partir de un cultivo de 24 horas en R2A. Se realizaron seis diluciones seriadas con un factor de 10 (carga estimada en la última dilución: 10² bacterias /mL).

Para la tinción se empleó una solución de Thiazole Orange (TO) de concentración 10 µg/mL. Se agregó a un tubo de reacción 500 µL de muestra problema + 10 µL de solución de TO, se agitó vigorosamente con vortex y se incubó el contenido del tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting kit. Product Information. 2004).

El ajuste de parámetros y las determinaciones por citometría se realizaron de acuerdo a lo establecido anteriormente.

Este análisis se trató simplemente de una determinación cualitativa, dado que no se utilizó un estándar Interno para los ensayos. Únicamente fue posible realizar una estimación cuantitativa de bacterias y evaluar los resultados numéricos relativos obtenidos para las distintas diluciones.

b- *Aplicación de la metodología a muestras obtenidas del sistema:*

- Ensayo sobre muestras obtenidas del punto TM3 (post carbón activado):

En primer lugar se llevó a cabo la concentración de las muestras obtenidas en este punto en un factor de 100.

El colorante empleado para los ensayos fue TO (100 µg/mL) y para el análisis cuantitativo de las muestras se emplearon microesferas (Counting Beads) en una concentración de 100 microesferas /µL. La tinción con TO se realizó agregando a un tubo de reacción 2 mL de muestra problema concentrada + 10 µL de solución de TO, se agitó vigorosamente con vortex y se incubó el contenido del tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz. A continuación se agregaron 10 µL de la suspensión de microesferas. La suspensión debe agitarse previamente a ser agregada al tubo de reacción para asegurar la homogeneidad de la misma.

El ajuste de parámetros y las determinaciones por citometría se realizaron de acuerdo a lo establecido anteriormente.

- Ensayo sobre muestras obtenidas de los puntos TM6 (post ósmosis reversa) y P6 (pico de salida):

Se procedió de forma similar a lo establecido para las muestras del punto TM3.

- Ensayo sobre suspensiones de *Alcaligenes sp.* preparadas en el laboratorio:

Se preparó la suspensión de *Alcaligenes sp.* en agua destilada estéril ajustada al N°1 según la escala de MacFarland, a partir de un cultivo de 24 horas en R2A. Se empleó la dilución 10^{-5} de dichas suspensiones (es decir una carga estimada de 10^3 bacterias /mL). Para los ensayos de citometría se procedió de forma similar a lo establecido para las muestras del punto TM3.

c- *Detección y cuantificación de bacterias viables y no viables. Puesta a punto y estudio del límite de detección del método:*

Para poner a punto los ensayos de diferenciación de bacterias viables y no viables y cuantificación de las mismas se preparó una suspensión de *Alcaligenes sp.* en agua destilada estéril ajustada al N°1 según la escala de MacFarland, a partir de un cultivo de 24 horas en R2A. Se realizaron seis diluciones seriadas con un factor de 10 (carga estimada en la última dilución: 10^2 bacterias /mL). Para las determinaciones de células no viables se emplearon las mismas suspensiones sometidas a un tratamiento de esterilización por calor en autoclave (ciclo de 15 min. a 121 °C).

Los ensayos de citometría se realizaron empleando el kit *LIVE/DEAD® BacLight™*. La tinción de las muestras se realizó agregando en un tubo de reacción 977 µL de agua filtrada (0.22 µm), 1.5 µL de SYTO9 (3.34 mM) y 1.5 µL de Ioduro de Propidio (30 mM). A la mezcla de tinción se agregaron 10 µL de la preparación de suspensiones de bacterias (Tabla 3.3) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz el contenido del tubo. Se resuspendió la suspensión de microesferas (1.0 E8 microesferas/mL) por agitación vigorosa con vortex, y posteriormente se agregó 10 µL de dicha suspensión al tubo de reacción, se agitó bien la mezcla y luego se realizó el análisis por citometría.

Tabla 3.3- Preparación de mezcla de suspensiones de bacterias para el análisis

Relación suspensiones [vivas : muertas]	Volumen agregado (mL)	
	Suspensión vivas	Suspensión muertas
0:100	0	1
50:50	0.5	0.5
100:0	1	0

Se debe tener en cuenta que la concentración de microesferas en la reacción es de 1.0 E6 microesferas/mL debido a la dilución de la suspensión en la propia mezcla de reacción. Para la determinación del límite de detección del método se repitió el ensayo en dos oportunidades independientes. En todos los casos se ajustó la cantidad de microesferas agregadas de manera que la concentración estimada de bacterias estuviera en un orden similar al de las microesferas. A pesar de esto se debe tener en cuenta que para que el conteo sea confiable se debe trabajar al menos con 1000 microesferas.

El ajuste de los parámetros para la realización de las determinaciones se realizó de acuerdo a lo establecido anteriormente en este apartado.

❖ **Recuento de muestras por métodos convencionales:**

Se realizaron los recuentos en placa empleando el método de siembra incorporada de las suspensiones de microorganismos y las muestras problema que fueron analizadas por citometría de flujo, con el fin de poder establecer una correlación entre ambas metodologías. El medio de cultivo empleado en todos los casos fue R2A, las placas se incubaron a 32.5 ± 2.5 °C durante un período de 48 – 72 hs.

3- MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

❖ **Análisis por microscopía de fluorescencia**

El análisis se basó en el empleo de dos fluorocromos que presentan la capacidad de diferenciar bacterias viables de bacterias no viables. Los colorantes empleados fueron Ioduro de Propidio y SYTO 9 (*Kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting*), ambas moléculas tienen la capacidad de marcar ácidos nucleicos, sin embargo el SYTO9 es capaz de penetrar en todas las células a diferencia del Ioduro de Propidio que únicamente puede alcanzar el interior celular de aquellas bacterias que tienen la membrana dañada. Las propiedades de esta combinación de colorantes se basa en una modificación en la unión al ADN del SYTO9 causada por el desplazamiento del mismo impartido por el Ioduro de Propidio, y la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET); esta es una interacción que ocurre solo a muy corta distancia entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en la que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra. (Berney M. et al., 2007; Stocks S.M., 2004).

La característica más crítica en el análisis por microscopía de fluorescencia en sistemas de purificación de agua es la baja carga microbiana presente, por lo que se planteó realizar un ensayo para estudiar el límite de detección.

Preparación de suspensiones de trabajo:

Para evaluar la aplicabilidad de esta metodología se empleó una suspensión McFarland 1 (10^8 bacterias/mL) del mismo microorganismos empleado para los ensayos de citometría de flujo, *Alcaligenes sp.* Una vez preparada la suspensión se dividió en dos porciones y una fue sometida a un tratamiento térmico (ebullición durante 15 minutos). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas sobre cada una de las porciones, para obtener cargas estimadas de $10^8 - 10^7 - 10^6 - 10^5 - 10^4$ de bacterias viables y no viables respectivamente.

➤ *Coloración y acondicionamiento de las muestras:*

Para realizar las tinciones se emplearon diluciones 1:10 de los colorantes Ioduro de Propidio (20mM en DMSO) y SYTO9 (3.34mM en DMSO). La coloración se realizó en cada pocillo de la placa de observación, agregando 10 μ L de la muestra correspondiente y 1,5 μ L de cada uno de los colorantes homogeneizando bien la mezcla con la pipeta y se fija la muestra secando a 45°C. Para realizar las observaciones se agregó un reactivo para proteger la fluorescencia (Citifluor®) sobre los preparados.

➤ *Observación de las muestras:*

Se realizó la observación de los preparados de bacterias vivas y muertas (teñidas con la combinación de colorantes) con los cubos (filtros) seleccionados para IP y para SYTO9. Todas las preparaciones se observaron con ambos filtros.

El recuento se realizó sobre 10 campos para aquellos casos en que hubo más de 10 bacterias por campo y 20 campos cuando se observaron menos de 10 microorganismos. Para las suspensiones más cargadas (más de 100 microorganismos por campo), se observaron un total de 5 campos.

Las imágenes fueron capturadas con cámara digital.

➤ *Reactivos e instrumentos:*

Microscopio:

Microscopio de epifluorescencia Olympus BX41

Características:

Área del campo de observación	39761	micras ²
Área de la foto	11637,5	micras ²
Área de cada pocillo (5mm diámetro)	19635000	micras ²

Cubos:

Cubo	Excitation filter	Barrier filter	Fluorocromo
MWIB	BP 470-490	BA 510-590	SYTO9
MWIG	BP 520-550	BA 580 IF	IP

Fluorocromos:

Fluorocromo	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
SYTO 9	482	500
Ioduro de Propidio	530	618

Nota: Los valores de longitud de onda de absorción y emisión están sujetos a un pequeño grado de variación dependiendo de las condiciones de medida.

❖ Recuento de microorganismos por métodos convencionales:

Todas las suspensiones fueron contadas en paralelo por el método de recuento en placa para evaluar los resultados obtenidos contra un método de referencia y establecer las ventajas e información proporcionadas por los métodos alternativos propuestos. Se empleó el método de recuento incorporado, sembrando 1 mL de muestra, se empleó el medio de cultivo R2A y se incubaron las placas a 32.5 ± 2.5 °C durante 5 días.

4- PCR EN TIEMPO REAL

Diseño de los ensayos:

Para evaluar la aplicación de esta metodología a sistemas de purificación de agua, se vuelve imprescindible el estudio del límite de detección del método. Para ello se planteó la realización de dos ensayos preliminares: el primero consistió en la realización de diluciones seriadas de una cantidad conocida de ADN del microorganismo en cuestión para poder determinar el límite de detección en las condiciones de trabajo. El segundo ensayo se realizó empleando una suspensión de células y realizando la lisis de las mismas, con el fin de hacer las determinaciones directamente sobre las muestras sin previa extracción de ADN. El objetivo de este segundo ensayo fue determinar el límite de detección de esta metodología aplicada directamente sobre muestras de agua conteniendo los microorganismos de interés. Para ello se realizaron nuevamente diluciones seriadas de las muestras conteniendo una cantidad conocida del microorganismo.

1- Determinación del límite de detección sobre muestras de ADN:

➤ Extracción de ADN:

Se preparó una suspensión en agua miliQ a partir de un cultivo de 24 horas en R2A de *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 17666™. A partir de esta suspensión se realizó la extracción y purificación de ADN empleando el kit comercial Applichem® *Geno/mini DNA Isolation Spin Kit* siguiendo el procedimiento establecido por este (Anexo 2).

➤ Cuantificación de ADN:

Se realizó la cuantificación del ADN producto de la extracción empleando el fluorímetro (Qubit™ Fluorometer - Invitrogen) y el kit de reactivos Quant-iT™ dsDNA BR Assay kits (Invitrogen). La cuantificación de ADN se lleva a cabo empleando el reactivo (Qubit™ dsDNA BR reagent) proporcionado por el kit, con propiedades específicas para el marcado de ADN de doble cadena y dos estándares (Standard #1: 0ng/μL y Standard #2: 100ng/μL) que permiten la calibración del fluorímetro (Anexo 7). En función de estos valores, el software asociado al equipo calcula, mediante el empleo de un algoritmo matemático, el valor correspondiente a la muestra.

El volumen de muestra empleado para la cuantificación en todos los casos fue 2μL.

El equipo proporciona el valor correspondiente a la cantidad de ADN presente en el tubo de reacción; por lo que la concentración original en la muestra debe calcularse tomando en cuenta la dilución realizada.

Una vez realizada la cuantificación de ADN en la muestra original se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración de 10ng/μL. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas de 1:10 hasta llegar a la dilución 10⁻⁶.

➤ Reacciones de PCR a tiempo real:

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron empleando el agente intercalante SYBER Green. Se emplearon los primers específicos TQF (5'-GAT CCT GGC TCA GAG TGA ACG-3') y TQR (5'-CCC ACG ACA GAG TAG ATT CCG-3') (Rios-Licea M.M. et al., 2010), que amplifican un fragmento de 134 pb (MACROGEN – Oligo™). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador a tiempo real Rotor – Gene™ 6000 (Corbett). Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 2 minutos y 30 ciclos de 94°C 15 segundos y 60°C por 30 segundos (Rios-Licea M.M. et al., 2010). En la mezcla de reacción se agregó 12.5 μL del reactivo Real Time Rotor-gene SYBER Green PCR kit™ (Quiagen); 0.5 μL de cada primer (concentración 5μM); 2μL de ADN y agua miliQ en cantidad suficiente para completar el volumen total de 25μL.

El análisis de los datos se realizó en todos los casos empleando el software Rotor-Gene Versión 1.7.73.

2- Determinación del límite de detección sobre muestras con células:

➤ Preparación de la muestra:

Se preparará una suspensión en agua miliQ estéril según el N°1 de la escala de Mac Farland a partir de un cultivo de 24 horas en R2A de *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC® 17666™. Se midió la densidad óptica a 600nm empleando el espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 y se ajustó a 0.100 de absorbancia. A esta suspensión se le llamó dilución 0 y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas de 1:10 hasta la dilución 10⁻⁷. Se realizó el recuento en placa de estas suspensiones empleando el método de siembra incorporado, sembrando 1mL en el medio R2A e incubando las placas a 32.5 ± 2.5°C durante 5 días.

El tratamiento de lisis se realizó sobre estos tubos sometidos a baño en ebullición durante 20 minutos.

➤ Reacciones de PCR a tiempo real:

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que las empleadas para el primer ensayo en las determinaciones a partir de ADN.

3- Determinación del límite de detección sobre muestras de ADN y correlación con el número de células correspondiente:

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para el segundo ensayo planteado originalmente, realizado sobre muestras con células; se diseñó un tercer ensayo que consistió en realizar las reacciones de PCR en tiempo real sobre muestras de ADN, pero conociendo la correlación existente entre el ADN en la muestra y el número de células con el que este se corresponde. Para ello se partió de una suspensión de *Stenotrophomonas maltophilia* preparada en condiciones similares a las establecidas en el segundo ensayo "Determinación del límite de detección sobre muestras con células", y se realizó el recuento de la misma por métodos convencionales. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN sobre una fracción de esta suspensión empleando el kit comercial AppliChem® *Geno/mini DNA Isolation Spin Kit* siguiendo el procedimiento establecido por este (Anexo 2).

Se realizaron dos repeticiones de esta determinación partiendo de dos suspensiones independientes.

De esta manera fue posible asignar una relación entre ADN amplificado y el número de células.

Sin embargo, al momento de establecer dicha correlación, debe tomarse en cuenta que ningún método empleado para la extracción de ADN no es 100% eficiente y que los recuentos convencionales únicamente determinan células viables, por lo que no se tomó en cuenta el ADN aportado por bacterias no viables presentes en la suspensión. Es por estas razones, que los resultados obtenidos en este ensayo sólo son válidos para las condiciones de trabajo descritas anteriormente.

➤ *Cuantificación de ADN:*

Se realizó la cuantificación del ADN presente en la muestra empleando el kit de reactivos Quant-iT™ dsDNA BR Assay kits (Invitrogen) (*Anexo 7*) y el fluorímetro Qubit™ Fluorometer (Invitrogen).

Una vez realizada la cuantificación de ADN en la muestra original se realizaron diluciones seriadas de 1:10 hasta llegar a la dilución 10^{-6} .

➤ *Reacciones de PCR a tiempo real:*

Las condiciones de la reacción de PCR fueron las mismas que las empleadas para el primer ensayo en las determinaciones a partir de ADN.

➤ *Recuentos por métodos convencionales:*

Se empleó el método de recuento en placa por siembra incorporada, sembrando 1mL en el medio R2A e incubando las placas a $32.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ durante 5 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- DISEÑO Y PUESTA A PUNTO DE MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN DE AGUA

1- Primera etapa: *Puesta a punto de la metodología de concentración para un factor de concentración de 10 empleando una suspensión de Alcaligenes sp.*

Ensayo	Recuento Solución de partida	Recuento solución final
1	8.0 E4 ufc/mL	4.8 E5 ufc/mL
2	5.6 E3 ufc/mL	2.9 E4 ufc/mL

Evaluación de la recuperación:

De acuerdo al diseño original debería haberse obtenido una suspensión 10 veces más concentrada. Si bien en ambos ensayos el número de microorganismos aumentó en un orden, en ningún caso se obtuvo una recuperación del 100%. Para el primer ensayo la recuperación fue del 60 % y para la segunda repetición fue del 52 %. Resultados reportados respecto al porcentaje de recuperación empleando diferentes metodologías de concentración, tanto comerciales como diseñadas especialmente para sistemas particulares establecen una variación entre el 30% y el 70%. Es importante tomar en cuenta que estas eficiencias en las diferentes metodologías pueden variar con la matriz y son distintas para los diferentes microorganismos (Ferguson C. et al., 2004).

De acuerdo con lo anterior podríamos considerar que los resultados obtenidos en los ensayos de prueba empleando la suspensión de *Alcaligenes sp.* dieron valores razonables como para continuar trabajando sobre muestras reales.

Mediante la determinación de la eficiencia no solamente se evaluó la capacidad del método para recuperar todas las células que fueron retenidas por el filtro, sino también cualquier posible daño que sufran las células al ser sometidas al proceso de filtración y a la agitación vigorosa que se realiza con el fin de liberar la mayor cantidad de células adheridas a la membrana. Esto es debido a que para el seguimiento se realizaron los recuentos por métodos de cultivo, por lo que únicamente se pueden determinar bacterias viables. Sin embargo no se puede conocer el efecto sobre la muestra debido a que todo el procedimiento se realizó empleando una suspensión conteniendo únicamente las células del microorganismo en cuestión.

2- Segunda etapa: Aplicación de la metodología de concentración sobre muestras reales

Muestra	Recuento Solución de partida	Recuento solución final
1	6 ufc/mL	3.5 E2 ufc/mL
2	27 ufc/mL	1.4 E3 ufc/mL
3	4 ufc/mL	3.7 E2 ufc/mL
4	46 ufc/mL	2.1 E3 ufc/mL

Evaluación de la recuperación:

En los ensayos realizados para evaluar la aplicación de la metodología de concentración sobre muestras reales se obtuvieron eficiencias entre el 45% y el 90%. Si bien estos resultados son variables, están dentro del rango de lo que se ha reportado en otros trabajos (Ferguson C. et al., 2004; Morales – Morales H.A. et al., 2003, Simmons O.D. et al., 2001). En todos los casos se logró aumentar dos órdenes la carga de microorganismos de acuerdo a lo esperado, y el porcentaje de recuperación estuvo por encima del 40% en todas las pruebas. Si bien el número de ensayos realizados no es suficiente para asignar una eficiencia a esta metodología de concentración, nos permitió realizar estimaciones al momento de diseñar las experiencias con las muestras concentradas y lograr obtener muestras con concentraciones del orden requerido para dichas determinaciones.

En cuanto a la metodología propiamente dicha, estas determinaciones permitieron evaluar la eficiencia de todo el proceso. El método de filtración por membrana además de realizar la concentración de los microorganismos puede funcionar como un método para levantar inhibiciones generadas por compuestos que pudieran estar presentes en la muestra original y que se eliminarían con el filtrado. Si bien en las muestras correspondientes a los puntos de salida de los picos la presencia de inhibidores químicos es poco probable, no es así en otros puntos del sistema donde pueden existir por ejemplo trazas remanentes de cloro y sus derivados. Con la determinación del número inicial y el número final de microorganismos no es posible determinar si hubo levantamiento de alguna inhibición o si únicamente funcionó el proceso de concentración.

Mediante la realización de una validación del proceso de concentración sería posible determinar esta característica, pero debe ser tomado en cuenta que las condiciones son diferentes para cada punto del sistema y que incluso en un mismo punto podrían variar en el tiempo dado que a medida que cambia la flora puede haber microorganismos que se comportan diferente (por ejemplo en cuanto a la capacidad de adherencia a la membrana). Algunos trabajos reportan metodologías de concentración basadas en el mismo concepto básico, pero empleando métodos más radicales para la liberación de los microorganismos retenidos en las membranas, como el empleo de ultrasonido, con el fin de independizarse de esta variable, pero sin embargo no se obtuvieron eficiencias mayores en el proceso de

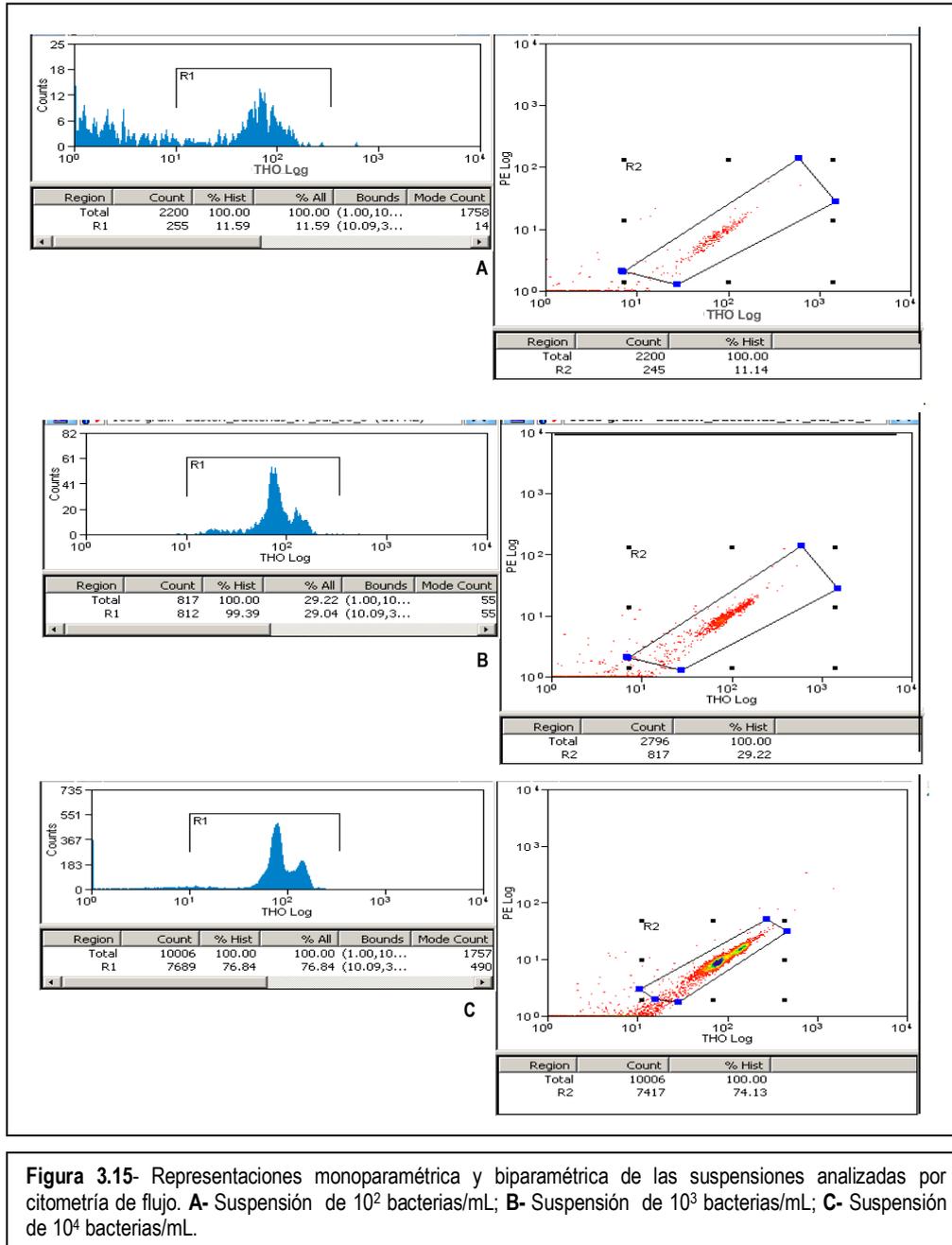
concentración (Lucena et al., 2003). Otro punto que debería ser tomado en cuenta al momento de realizar la validación es que los recuentos por métodos convencionales no son capaces de determinar la totalidad de los microorganismos presentes en la muestra, existen microorganismos no cultivables que también son retenidos por la membrana en el proceso de concentración. En algunos trabajos reportados (Ferguson C. et al., 2004), la metodología de concentración se evalúa realizando recuentos por microscopía de fluorescencia con colorantes que permiten la diferenciación entre bacterias viables y no viables; pero esto no es aplicable a cualquier sistema debido a las limitaciones que presenta la sensibilidad de dicha metodología.

2- CITOMETRÍA DE FLUJO

a- Determinación de bacterias por citometría de flujo. Puesta a punto de la metodología de trabajo:

En esta primera instancia de citometría cualitativa para determinación de bacterias se obtuvieron resultados muy satisfactorios que fueron la base para la realización de ajustes de parámetros del equipo como el Threshold y la velocidad de adquisición. Luego de realizados los ajustes, los diagramas demostraron una resolución clara al momento de delimitar las regiones de emisión correspondientes al colorante en cuestión. En la figura 3.15 se muestran los histogramas y diagramas biparamétricos correspondientes a las determinaciones realizadas. Como se explicó anteriormente, con este ensayo no es posible cuantificar el número de bacterias, dado que para ello es necesario la utilización de un estándar interno. Los resultados demostraron una relación coherente entre los eventos contados en las diluciones analizadas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la citometría de flujo, tal como está planteada en esta instancia, no detecta únicamente las bacterias viables a diferencia de los métodos tradicionales de cultivo.

El principal objetivo en esta instancia era realizar una estimación de la mayor dilución para la cual es posible detectar bacterias en las condiciones ensayadas, con el fin de diseñar la metodología de análisis para la etapa siguiente empleando en este caso citometría cuantitativa sobre muestras reales del sistema objeto de trabajo.



b- Aplicación de la metodología a muestras obtenidas del sistema:

Los ensayos realizados sobre muestras del sistema y suspensiones de bacterias preparadas en el laboratorio arrojaron resultados concluyentes acerca de la sensibilidad y condiciones óptimas para el desarrollo de esta metodología. Las muestras seleccionadas para estos ensayos, tomadas del punto TM3 del sistema (posterior al filtro de carbón activado), si bien presentan el mayor recuento, también presentan el mayor número de partículas por unidad de volumen, provocando una gran interferencia en la determinación por citometría. Este hecho nos llevó al cuestionamiento de la selección del punto de muestreo. Sin embargo, la citometría cuantitativa arrojó resultados concordantes respecto a los obtenidos

por el método convencional de recuento. La figura 3.16 muestra estos resultados, el recuento utilizando las perlas de cuantificación dio 4.0 E3 ufc/mL y el recuento en placa, realizado en paralelo, fue de 3.5 E3 ufc/mL. La interferencia provocada por las partículas presentes en la muestra fueron responsables del ruido elevado generado, lo que disminuyó la resolución de los citogramas. El estudio de los resultados obtenidos sugiere que esto se debe a que algunas bacterias (coloreadas) pueden estar unidas a las partículas y por lo tanto estas últimas serían detectadas como eventos marcados, el problema es que no es posible conocer el número de bacterias unidas por partícula y además probablemente se trate de un evento aleatorio y por lo tanto sería variable.

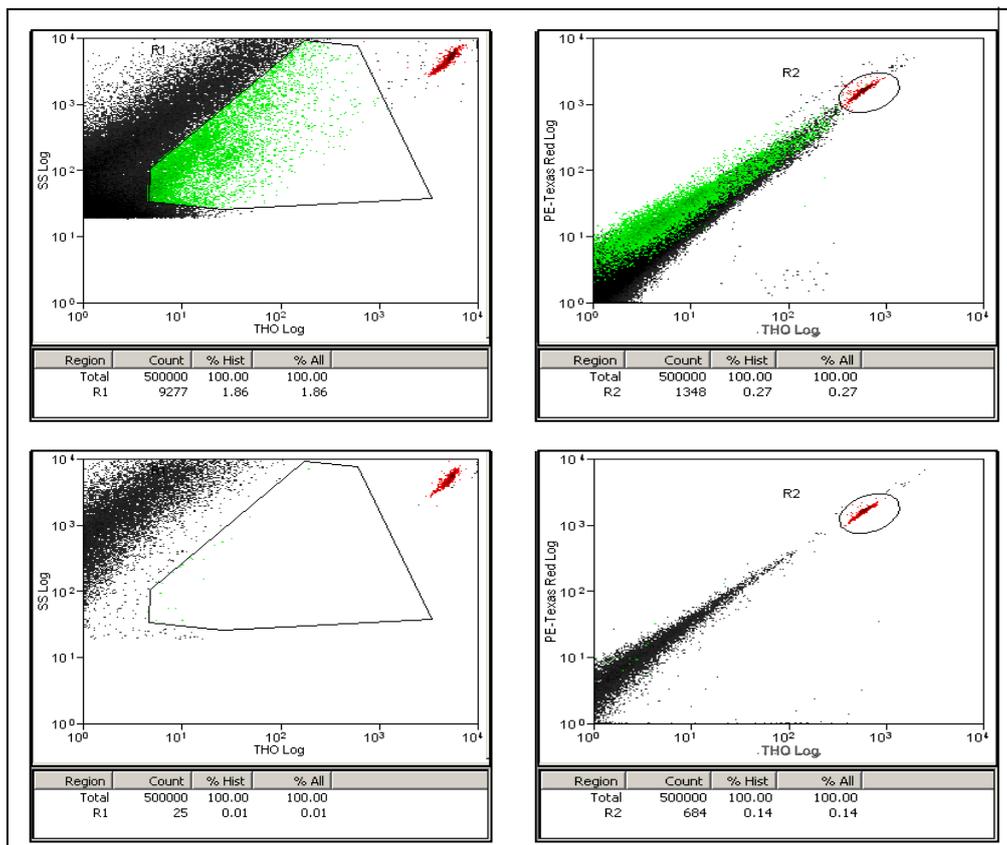


Figura 3.16- Arriba se muestra un diagrama de citometría para una muestra TM3 (concentrada 1:100) + THO + Microesferas. Abajo se representa el mismo diagrama para la muestra TM3 (concentrada 1:100) + Microesferas sin colorear. Las bacterias que aparecen en la región delimitada para THO no son detectadas.

En base a los resultados obtenidos con las muestras del punto TM3 se realizó el mismo ensayo para muestras del sistema de tratamiento y distribución, buscando disminuir esta interferencia. Los puntos seleccionados fueron TM6 (post-ósmosis) y P6 (pico de salida N°6).

Analizando los resultados, se observó en ambos casos un recuento en placa del orden de 10^3 para las muestras concentradas, pero en esta oportunidad las cuantificaciones realizadas por citometría de flujo no concordaron con los resultados del método convencional, sino que en ambos casos estos últimos recuentos fueron de uno y dos órdenes mayores para los puntos TM6 y P6 respectivamente (tabla 3.4). Este resultado puede ser razonable, tomando en cuenta que el recuento en placas de agar únicamente

cuantifica las células viables, y la cuantificación por citometría de flujo en estas condiciones se trata de un método de conteo absoluto.

A diferencia de los números obtenidos para las muestras del sistema, para la suspensión preparada en el laboratorio se obtuvieron recuentos de orden similar para ambas metodologías. En las condiciones de trabajo establecidas se obtuvieron resultados consistentes para concentraciones iguales o superiores a 10^3 microorganismos/ mL.

Tabla 3.4- Comparación de resultados obtenidos por Citometría de flujo y recuento en placa

Muestras	Resultados de recuentos por las diferentes metodologías	
	Citometría de flujo (bacterias / mL)	Recuento en placa (ufc/mL)
Suspensión <i>Alcaligenes sp.</i>	▶ 8×10^3	▶ 2×10^3
TM6 (concentrada)	1×10^4	1×10^3
P6 (concentrada)	2×10^3	1×10^1

▶ Los recuentos corresponden a la dilución 10^{-5} de la suspensión original, por lo que los recuentos reales serían 8×10^8 bacterias/mL y 2×10^8 ufc/mL para los métodos de citometría de flujo y recuento en placa respectivamente.

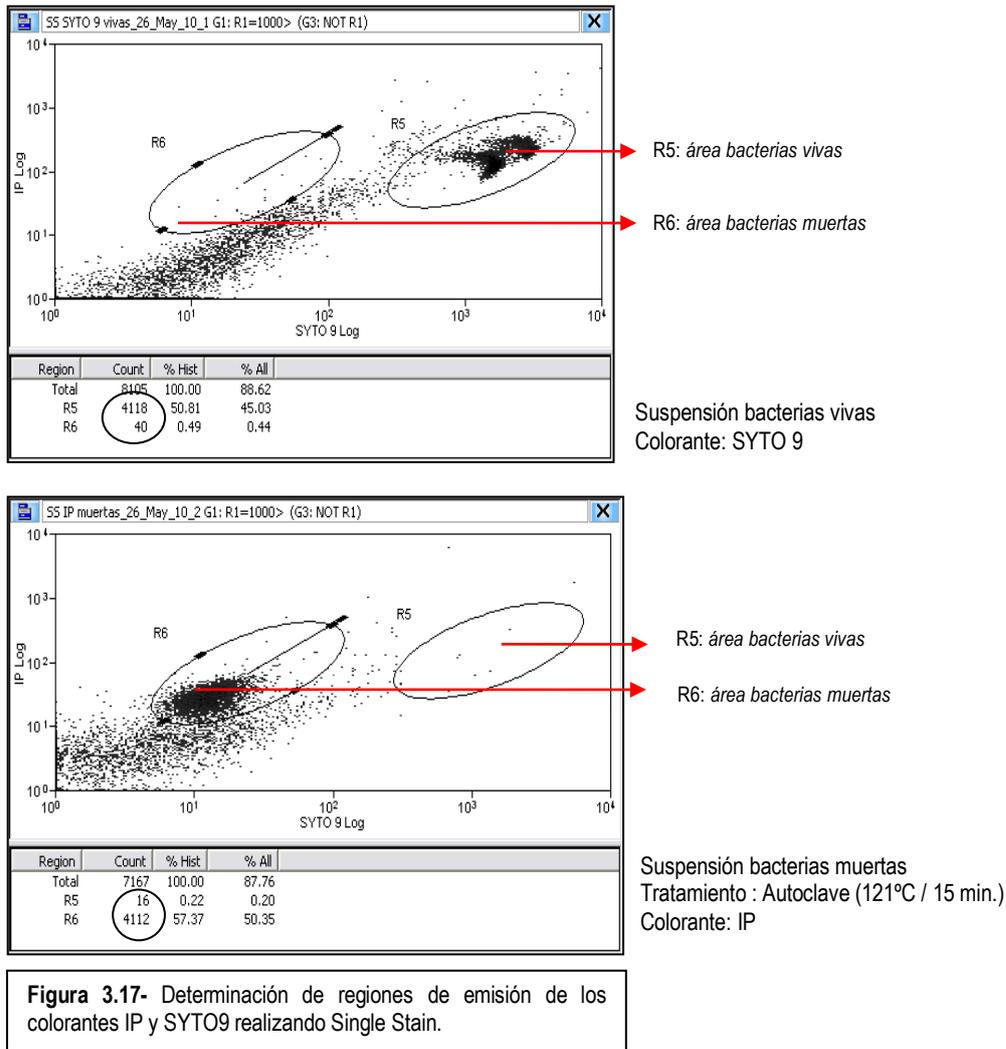
c- *Detección y cuantificación de bacterias viables y no viables. Puesta a punto y estudio del límite de detección del método:*

➤ *Evaluación del comportamiento de la suspensión de *Alcaligenes sp.*: realización de la curva de muerte.*

En todos los casos el porcentaje de recuperación de microorganismos al cabo de 48 horas osciló entre el 96% y el 100%. En base a los resultados obtenidos, se calcularon las diluciones al momento de realizar los ensayos de citometría. Esta estimación no fue considerada posteriormente al momento de analizar los resultados para evaluar las metodologías utilizadas, ya que en esta instancia se emplearon los valores reales de los recuentos sembrados al momento de la realización de los análisis.

➤ *Determinación de las diferentes regiones de emisión para las condiciones de ensayo establecidas:*

La determinación de la región de emisión de los colorantes se realizó en una instancia preliminar a la realización de los ensayos mediante la realización del "Single stain" logrando posicionar la región de emisión de bacterias vivas y muertas de acuerdo a lo que muestra la figura 3.17.



➤ *Estudio del límite de detección del método:*

El análisis de las muestras por citometría de flujo permitió la determinación de bacterias viables y no viables en cada una de las muestras procesadas (suspensiones de microorganismos). Los recuentos de bacterias viables realizados sobre las suspensiones preparadas sin tratamiento térmico, obtenidos por citometría de flujo fueron de órdenes similares a los resultados de los recuentos en placa para las diluciones 1:10 y 1:100 de la suspensión original, resultado que estaría indicando que la sensibilidad del método es adecuada para una carga de microorganismos del orden de 10^6 bacterias / mL (Tabla 3.5). Este resultado implica una diferencia importante respecto a los resultados obtenidos en las determinaciones de células bacterianas empleando TO, un colorante que no tiene la propiedad de unirse selectivamente a las bacterias. Por lo tanto si bien es importante la información que puede obtenerse realizando determinaciones cuantitativas de células muertas y vivas de forma diferencial en una misma muestra, el límite de detección de la metodología resultó menor.

Otro punto importante a evaluar en la determinación del límite de detección del método es el ruido, la figura 3.18 muestra una serie de diagramas de citometría obtenidos en el análisis de diluciones seriadas,

en el que se observa claramente el aumento del ruido a medida que disminuye la carga de bacterias en la muestra. Este fenómeno que se observó en todas las experiencias realizadas, ocurre porque al diluir la muestra disminuye la intensidad de la señal y por lo tanto la relación señal/ruido es menor.

El aumento del ruido provoca que el área de emisión esté menos definida aumentando la variabilidad cuando se fija dicha región y por lo tanto se parte desde el inicio con un error inherente a la propia región.

Tabla 3.5- Ensayos de sensibilidad, determinación de bacterias viables en suspensión de *Alcaligenes sp.*

Muestra	Ensayo 1		Ensayo 2	
	Citometría de flujo (bacterias/mL)	Recuento en placa (ufc/mL)	Citometría de flujo (bacterias/mL)	Recuento en placa (ufc/mL)
Suspensión original	8.0×10^8	3.5×10^8	5.7×10^8	3.2×10^8
Dil. (1:10)	3.9×10^7	3.5×10^7	2.9×10^7	3.2×10^7
Dil. (1:100)	4.2×10^6	3.5×10^6	3.9×10^6	3.2×10^6

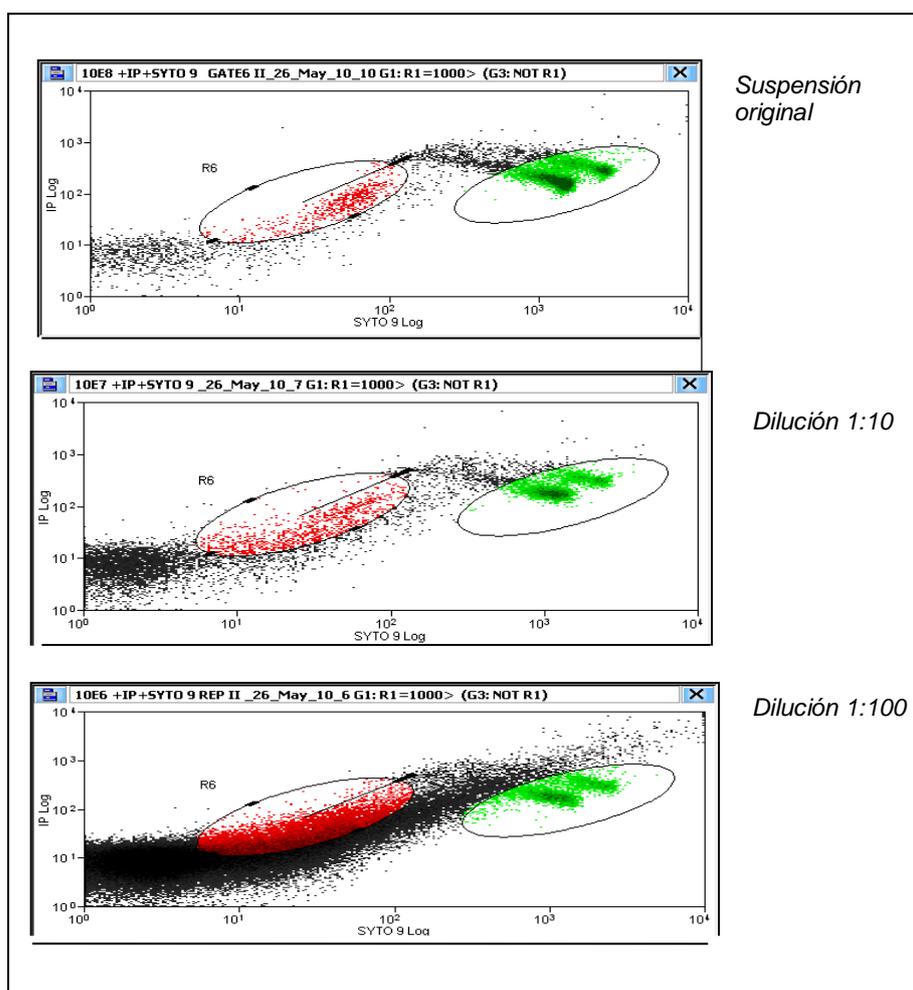


Figura 3.18- Determinaciones cuantitativas de bacterias viables (verdes) y bacterias no viables (rojas) en diluciones seriadas de una suspensión de *Alcaligenes sp.* por citometría de flujo.

3- MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La tabla 3.6 muestra los resultados obtenidos en los análisis de las muestras por microscopía de fluorescencia. Se realizó la cuantificación de bacterias coloreadas con Ioduro de propidio y con SYTO9 sobre las suspensiones de bacterias viables y las que fueron sometidas a tratamiento térmico. Esta metodología permitió observar la presencia de bacterias coloreadas con ambos fluorocromos en una misma muestra, es decir las bacterias vivas y muertas (figura 3.19). Los recuentos realizados por el método de recuento en placa sobre las mismas muestras permitieron cuantificar las bacterias viables.

Tabla 3.6- Resultados obtenidos en los recuentos por microscopía de fluorescencia y por el método convencional

Muestra	Dilución	Recuento en placa (ufc/mL)	Microscopía de fluorescencia (bacterias/mL)	
			MWIG (IP)	MWIB (SYTO9)
Suspensión original (viables)	0	5×10^7	1×10^6	5×10^7
	10^{-2}	5×10^5	4×10^5	4×10^6
	10^{-3}	6×10^4	1×10^5	2×10^5
	10^{-4}	5×10^3	**	**
Suspensión c/tratamiento térmico (no viables)	0	< 10	1×10^8	**
	10^{-2}	< 1	1×10^7	**
	10^{-3}	< 1	7×10^5	**
	10^{-4}	< 1	**	**

** Los recuentos de estos preparados no arrojaron resultados concluyentes, dado que se trataba de recuentos muy bajos con presencia de interferencias, lo que dio resultados no reproducibles.

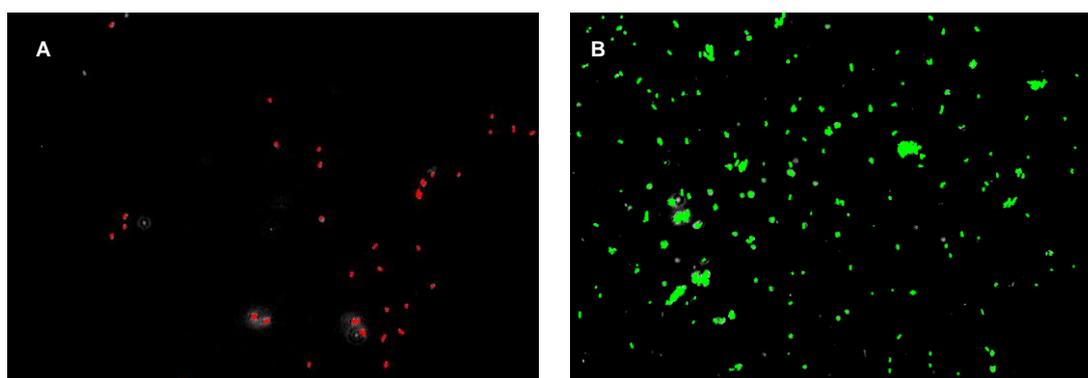


Figura 3.19- Fotografías obtenidas en la microscopía de fluorescencia.
A- Observación con filtro MWIG (IP). B- Observación con filtro MWIB (Svto9).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad del método para realizar un estudio cuantitativo de una población clasificando los microorganismos presentes en función de su viabilidad. El estudio del límite de detección de esta metodología aplicada a este tipo de muestras indica que es posible evaluar una población con una carga del orden de 10^5 microorganismos/ mL, lo que coincide con el límite de detección preestablecido para el método de recuento microscópico directo.

Los recuentos por microscopio de fluorescencia de bacterias viables fueron mayores a los obtenidos por el método convencional de recuento en placa, pero coherentes entre sí; este efecto podría atribuirse al porcentaje de microorganismos viables pero no cultivables presentes en la muestra. La observación microscópica de las suspensiones sometidas a tratamiento térmico concuerda con los resultados esperados. Se realizó además la observación y recuento de bacterias muertas (coloreadas con IP) presentes en las suspensiones de bacterias viables. Se obtuvieron números altos, lo que sugiere la gran cantidad de microorganismos no viables presentes en las suspensiones, que podrían ser potenciales generadores de endotoxinas y sin embargo no serían detectados por los métodos clásicos de recuento. Estos últimos resultados podrían justificar las diferencias encontradas entre los recuentos de bacterias vivas y los recuentos de bacterias muertas por microscopía de fluorescencia ya que en el segundo se estarían detectando la totalidad de los microorganismos.

4- ANÁLISIS POR PCR EN TIEMPO REAL

1- Determinación del límite de detección sobre muestras de ADN:

➤ *Cuantificación de ADN:*

[ADN](ng/μL) en muestra original	[ADN](ng/μL) para reacción de PCR
153	10

➤ *Reacciones de PCR a tiempo real:*

La tabla 3.7 lista los resultados obtenidos en la reacción de PCR a tiempo real y su representación gráfica se puede observar en las Figuras 3.20 y 3.21.

Tabla 3.7- Resultados de la reacción de PCR en tiempo real

Muestra	[ADN]/dilución (ng/μL)	[ADN]/tubo (ng/μL)	Ct	Tm
 B				
 0	10	1	16,49	86,2
 10 ⁻¹	1	0,1	18,31	86,2
 10 ⁻²	0,1	0,01	20,97	86,2
 10 ⁻³	0,01	0,001	24,03	86,3
 10 ⁻⁴	0,001	0,0001	28,67	85,5
 10 ⁻⁵	0,0001	0,00001		

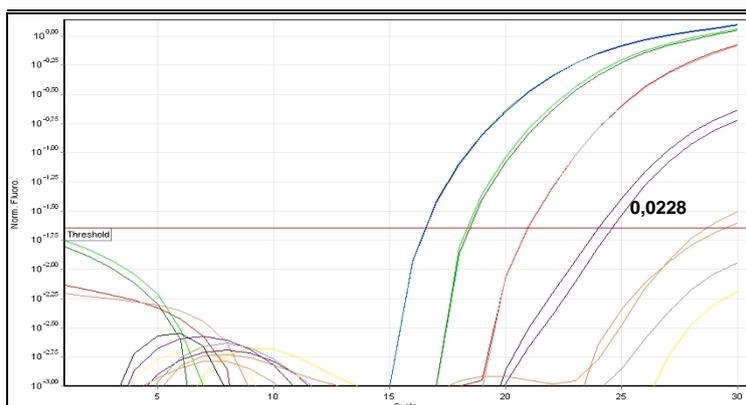


Figura 3.20- Curva de amplificación. Determinación del Ct para cada una de las muestras.

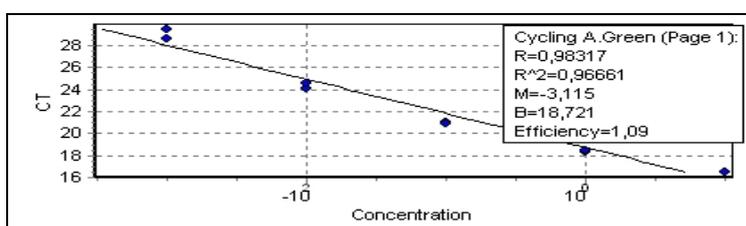


Figura 3.21- Curva de estándar. Determinación de Ct en función de la concentración de la muestra.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede apreciar que el límite de detección de ADN en las condiciones del ensayo corresponde a la dilución 10^{-4} . Esta es la mayor dilución de la muestra para la cual la curva de amplificación alcanza valores por encima del umbral. Al momento de analizar los resultados es importante considerar todas las características de la reacción; en nuestro caso la detección del producto de amplificación se realizó mediante el empleo de agentes intercalantes, esto no hace la reacción más específica que una PCR convencional, dado que estos compuestos se unen a cualquier dímero de ADN presente en el medio de reacción y por lo tanto el análisis de las curvas de disociación se vuelve fundamental (Bustin S.A. et al., 2004). Los resultados obtenidos a partir de las curvas de disociación de los productos de amplificación (“melting”) (Figura 3.22), concuerdan con los resultados arrojados por las curvas de amplificación; obteniéndose en todos los casos buena reproducibilidad entre los duplicados.

Los controles negativos permitieron validar la experiencia dado que arrojaron valores por debajo del umbral y no presentaron curva de melting. Es importante destacar además que se obtuvo una buena eficiencia para la reacción.

El límite de detección determinado en las condiciones del ensayo se corresponde con una concentración de ADN de $0,001 \text{ ng}/\mu\text{L}$ en la muestra original.

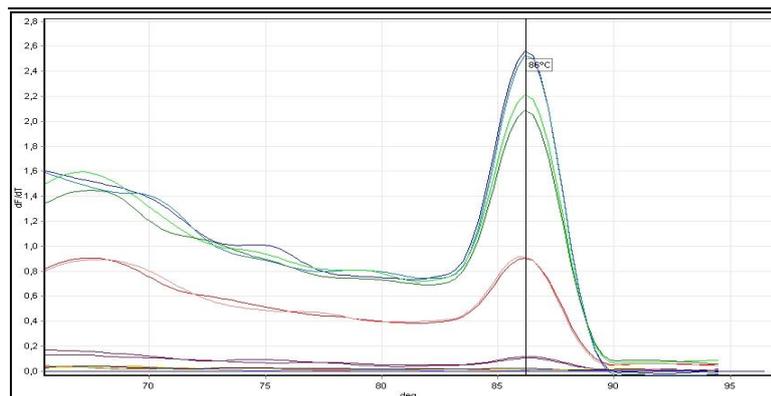


Figura 3.22- Curva de disociación de los productos de amplificación. El pico representa la Tm.

2- Determinación del límite de detección sobre muestras con células:

En la tabla 3.8 se detallan los resultados obtenidos en la reacción de PCR en tiempo real sobre la muestra de células.

Tabla 3.8- Resultados de la reacción de PCR en tiempo real

Muestra	Número de células (ufc/mL) en la muestra sometida a tratamiento de lisis ♣	Ct	Tm
■ B			
■ 0	4.8 E8	16,46	86,6
■ 0	4.8 E8	16,94	86,5
■ 10 ⁻¹	4.8 E7	20,07	86,7
■ 10 ⁻¹	4.8 E7	19,88	86,5
■ 10 ⁻²	4.8 E6	23,45	86,5
■ 10 ⁻²	4.8 E6	22,86	86,5
■ 10 ⁻³	4.8 E5	27,76	86,2
■ 10 ⁻³	4.8 E5	26,66	86,5

♣ Este número se corresponde con el recuento de bacterias en el tubo original (que fue sometido al tratamiento de lisis), se debe tomar en cuenta que para la reacción de real time sufre una dilución de 10⁻¹

Como se despliega de los resultados de la figura 3.23, la dilución 10⁻³ es la mayor para la cual se obtienen valores por encima del umbral, lo que se corresponde con un número de células de 4.8 E5 ufc/mL. Este resultado concuerda también con las curvas de disociación obtenidas en la reacción (figura 3.24). El límite de detección para este ensayo en las condiciones de reacción planteadas es superior a los resultados reportados para muestras de naturaleza clínica, por el método de real time PCR para la determinación de cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, en los que el límite se considera en 10⁴ ufc/mL (Rios-Licea M.M. et al., 2010).

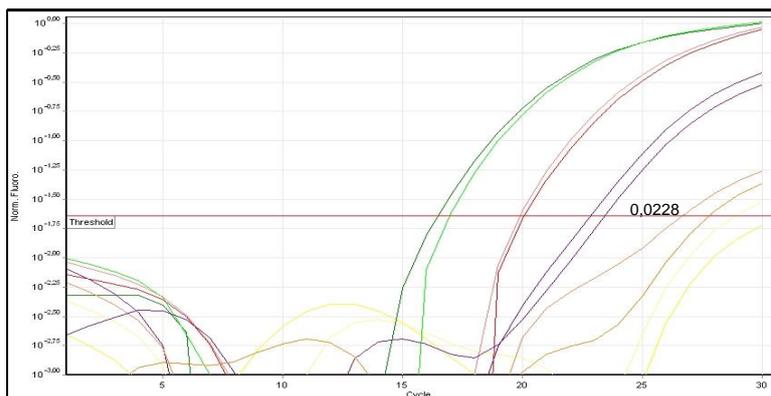


Figura 3.23- Curva de amplificación. Determinación del Ct para cada una de las muestras

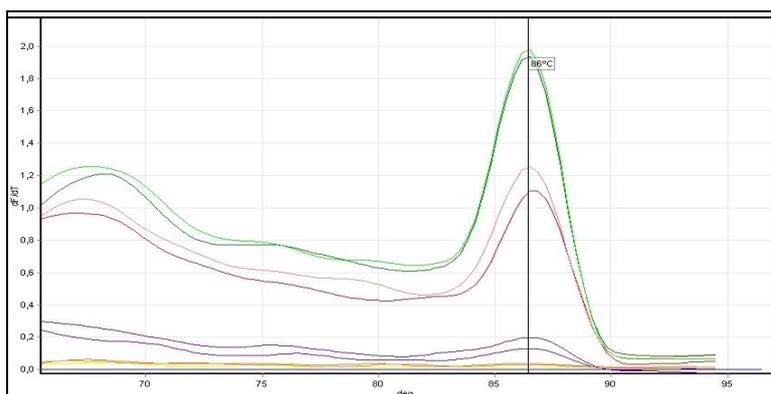


Figura 3.24- Curva de disociación de los productos de amplificación. El pico representa la Tm.

Con base en estos resultados se planteó la realización de las determinaciones a partir de ADN, pero correlacionando previamente la cantidad de ADN con el número de células. Esta propuesta surge a partir de la hipótesis de que los restos de lisis celular en el medio de reacción para las determinaciones realizadas directamente sobre la muestra con células estarían afectando la pureza de la muestra y generando interferencias en las determinaciones. La realización de los ensayos sobre ADN evitaría la presencia de dichas interferencias, permitiendo correlacionar posteriormente el límite de ADN detectado con el número de células correspondiente.

3- Determinación del límite de detección sobre muestras de ADN y correlación con el número de células correspondiente:

➤ *Cuantificación de ADN:*

Recuento de bacterias (ufc/mL) en la muestra original	[ADN](µg/mL) en muestra original	[ADN](µg/mL) para reacción de PCR	Relación * Número de células:ADN
1.7 E9	25.1	25.1	1 célula:0.015 pg ADN
2,3 E9	48,7	48,7	1 célula:0.021 pg ADN

* La relación *Número de células:ADN* es válida exclusivamente para las condiciones en que se realizaron dichas determinaciones, tomando en cuenta el método utilizado para la extracción de ADN y que el número de células corresponde a número de bacterias viables (ufc).

Existen reportes que establecen la relación existente entre el número de microorganismos, determinada por métodos convencionales y el contenido de ADN correspondiente (Jofre J. et al., 2010; Lucena F. et al., 2003; Gregory TR., 2001). El contenido de ADN varía entre los grupos de microorganismos (hongos, protozoarios, bacterias y virus). Para el caso de nuestro trabajo era importante conocer la relación entre el número de microorganismos de una determinada suspensión y la cantidad de ADN obtenida a partir de esa suspensión; más que la relación real existente entre el número de células y su contenido de ADN. Por lo tanto fue necesario determinar la correlación existente en la situación de trabajo, considerando que existen variaciones que son inherentes al método de extracción utilizado. Por otra parte, en el sistema objeto de trabajo, existen además variaciones que son propias del mismo y su condición en el momento del análisis, por ejemplo la presencia de microorganismos no viables que persisten en el agua por períodos variables de tiempo, pueden retener de manera intacta sus componentes y son detectados por métodos moleculares. Sin embargo, se ha reportado que la variación en el número de microorganismos viables no solamente está presente en los sistemas reales, sino que además puede estar presente también en las suspensiones de cultivos puros de bacterias. Se han descrito diferencias importantes entre el número de bacterias totales y el número de bacterias cultivables presentes en cultivos puros, incluso en cultivos que se encuentran en la fase de crecimiento exponencial (Barcina I. et al., 1989; Jofre J. et al., 2010). La determinación del ADN correspondiente tanto a microorganismos viables como no viables presentes en el sistema aporta una información más completa acerca de los riesgos para la salud, dado que se consideran también los restos de bacterias que podrían ser causantes de reacciones adversas en los pacientes. Sin embargo este tipo de metodologías no brindan información sobre la eficiencia de los procesos de desinfección cuya función es la destrucción de los microorganismos (Jofre J. et al., 2010).

En el presente trabajo se realizaron dos determinaciones independientes para establecer la correlación existente entre el número de células y la cantidad de ADN obtenido en la extracción mediante la metodología empleada (Anexo 2). Los resultados obtenidos en ambas determinaciones resultaron de un orden similar. De todas maneras, para establecer una correlación *Número de células:ADN* en las condiciones de trabajo para estimar el número de células presentes exclusivamente por PCR en tiempo real, deberían hacerse más determinaciones para establecer un factor de correlación definitivo.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron sobre la muestra conteniendo 25.1 µg de ADN / mL de muestra, por lo que la relación *Número de células:ADN* considerada para realizar el análisis de los resultados de la reacción de PCR fue 1 célula:0.015 pg ADN para *Stenotrophomonas maltophilia*.

➤ *Reacciones de PCR a tiempo real:*

En la tabla 3.9 se detallan los resultados obtenidos en la reacción de PCR en tiempo real, a partir de los ciclos de amplificación y en los de disociación (“melting”). Las figuras 3.25, 3.26 y 3.27 muestran las curvas correspondientes.

Tabla 3.9- Resultados de la reacción de PCR en tiempo real

Muestra	[ADN]/dilución (µg/mL)	[ADN]/tubo (µg/mL)	Ct	Tm
■ B				
■ B				
■ 10 ⁻¹	2,51	0,251	17,91	86,0
■ 10 ⁻¹	2,51	0,251	17,88	86,0
■ 10 ⁻²	0,251	0,0251	20,98	86,2
■ 10 ⁻²	0,251	0,0251	20,91	86,0
■ 10 ⁻³	0,0251	0,00251	23,92	86,0
■ 10 ⁻³	0,0251	0,00251	24,11	86,2
■ 10 ⁻⁴	0,00251	0,000251	26,85	86,3
■ 10 ⁻⁴	0,00251	0,000251	27,92	86,3

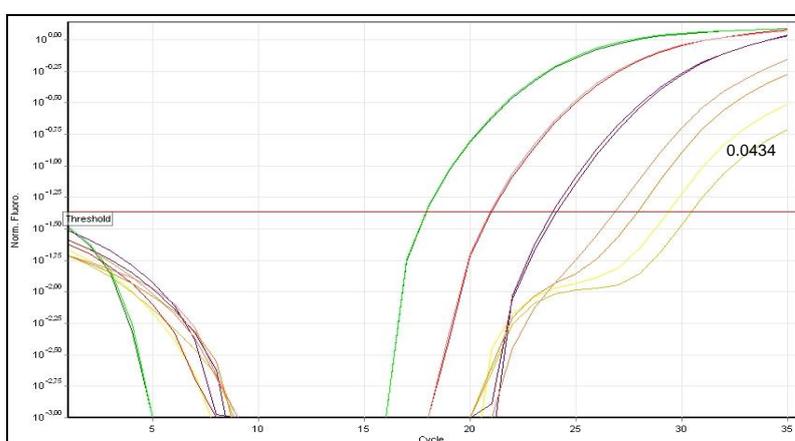


Figura 3.25- Curva de amplificación. Determinación del Ct para cada una de las muestras.

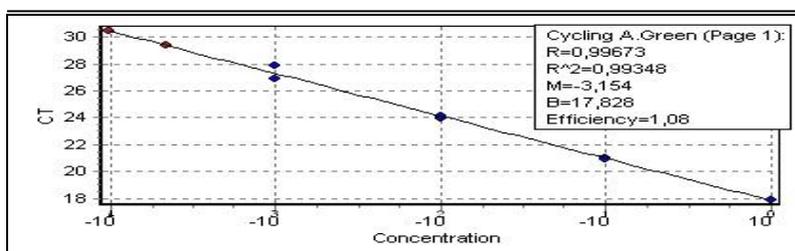


Figura 3.26- Curva de estándar. Determinación de Ct en función de la concentración de la muestra.

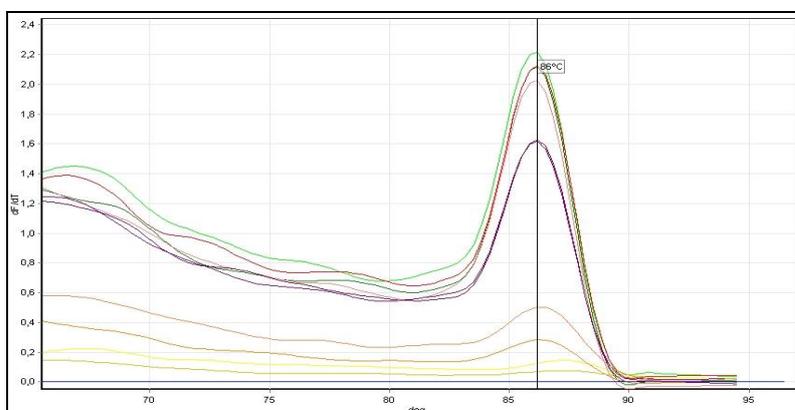


Figura 3.27- Curva de disociación de los productos de amplificación. El pico representa la Tm.

Los resultados obtenidos establecen el límite de detección para esta técnica en 0.0025 µg de ADN/ mL. Este resultado concuerda con el obtenido en el primer ensayo, en el que se determinó el límite de detección del método para ADN y dio como resultado 0.001 µg/ mL; por lo tanto estaríamos hablando de órdenes similares.

Si tomamos en cuenta la correlación entre el número de células y la cantidad de ADN, el límite de detección establecido en 0.0025 µg de ADN/ mL, se corresponde con 1,7 E5 células/ mL; resultado que también es concordante con el obtenido en el ensayo realizado directamente sobre células sometidas al tratamiento de lisis, en el que el límite de detección correspondió a un orden de 10⁵ ufc/mL.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El desarrollo de este trabajo permitió generar aportes al conocimiento de estos sistemas:

El sistema fue estrictamente controlado de acuerdo con los planes establecidos por el centro durante el período de monitoreo establecido. De la totalidad de los controles realizados, ninguno arrojó resultados por encima del límite de acción establecido y únicamente en una oportunidad un punto del sistema de tratamiento arrojó resultados que superaron el límite de alerta, hecho que pone de manifiesto que la situación general del sistema se encuentra bajo control.

En cuanto a la población planctónica, todos los microorganismos recuperados ya han sido reportados en sistemas de esta naturaleza, y muchos de estos fueron identificados también como parte de los biofilms asociados a las cañerías.

Se realizó la sustitución de cañerías que formaban parte del sistema de tratamiento y distribución, por disposición del organismo regulador en nuestro país (FNR). Este cambio de cañerías no fue consecuencia de nuestros resultados sino debido a lo establecido por dicha institución en función del tiempo de vida útil determinado para las mismas.

En los análisis realizados sobre los diferentes sectores de las cañerías extraídas del sistema, las muestras correspondientes a canillas, codos y caños posteriores al UV no arrojaron crecimiento, lo cual sugiere que el sistema para destruir microorganismos empleados en el mantenimiento ha resultado eficiente.

En los controles realizados posteriormente a esta instancia se constató que el número de microorganismos recuperados se correspondió en todos los casos con valores por debajo de las especificaciones establecidas.

Se realizó la comparación de la recuperación de microorganismos entre los diferentes medios de cultivo empleados. Los organismos reguladores aún no han logrado una armonización en cuanto las condiciones de cultivo para análisis microbiológico en agua para hemodiálisis que estos proponen. El medio de cultivo más frecuentemente empleado es el TSA, propuesto por la AAMI, Farmacopea Europea y la Farmacopea de Estados Unidos, sin embargo en nuestro país, las guías del FNR proponen como medio alternativo el PCA, dejando la selección entre ambos medios a criterio de cada institución. A pesar de esto, se han reportado en múltiples trabajos las ventajas del empleo del medio R2A para sistemas de tratamiento de agua (Gomila M. et al, 2005; Kulakov L. et al., 2002; Van der Linde K. et al., 1999), en los que muchas bacterias pueden haberse adaptado a un medio con pocos nutrientes. El R2A tiene la característica de que su composición simula mejor las condiciones nutritivas de este tipo de sistemas. Los resultados del trabajo reflejan que los recuentos en R2A Y PCA no arrojaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que el uso de R2A no parece dar mayores garantías desde el punto de vista sanitario. De la misma manera no se encontraron diferencias en la recuperación de microorganismos tras la incubación a $22.5 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, durante 5 días adicionales, tal cual se plantea en ciertas normativas (Italian Society of, N., 2005; ISO 13959: 2009). Sin embargo, se debe destacar la importancia de prolongar el tiempo de incubación,

dado que esta condición sí arrojó resultados diferentes en los recuentos independientemente del medio de cultivo empleado.

En el capítulo dos se describen actividades realizadas con importancia clínica, se realizaron estudios para determinar la eficiencia de la actividad de la solución empleada para la desinfección y conservación de los dializadores de reuso, y también determinaciones para evaluar la presencia de pirógenos y su posible correlación con los recuentos de microorganismos.

En las determinaciones realizadas en paralelo de recuento de la población bacteriana y ensayo de LAL en los puntos del sistema, la prueba de LAL dio positiva para el punto TM5, aunque los recuentos en este punto dieron por debajo de los límites establecidos. En este caso la concentración de endotoxinas bacterianas detectables por el ensayo de LAL (Gel- clot) se encontró por encima de 0.125 UE/mL. Este resultado refuerza la no correlación existente entre los resultados de LAL y el número de bacterias viables. Por lo tanto, es esencial cumplir con las exigencias establecidas para ambos parámetros a los efectos de garantizar la calidad del tratamiento de hemodiálisis.

En todos los casos de episodios de chuco en los que se realizó la determinación de endotoxinas bacterianas el resultado fue negativo. Es importante destacar que la cantidad de endotoxinas bacterianas no está ligada únicamente al número de microorganismos viables y no viables, sino también al tipo de microorganismos y por lo tanto, en el sistema dinámico con el cual trabajamos se dificulta aún más llegar a conclusiones. En cuanto a la generación de endotoxinas por parte de la exposición a radiación ultravioleta, los resultados fueron concluyentes en cuanto a que este factor está ligado a la carga bacteriana que es sometida a dicha radiación, arrojando resultados seguros para las condiciones de sistemas de purificación de agua que cumplen con las especificaciones. Así se puede concluir la importancia de la calidad del agua que ingresa al sistema y el sólido concepto de que la mejor manera de mantener el sistema bajo control es mantener controlado cada punto del sistema mediante el seguimiento de protocolos y controles establecidos que aseguran la calidad del agua durante todo su procesamiento.

Evaluación de la actividad de solución de conservación de dializadores:

Como era de esperar se comprobó la eficiencia de la solución de conservación en los ensayos realizados en tubo directamente con la suspensión de microorganismos. Cuando se realizaron las pruebas de la eficiencia de la solución de conservación sobre los dializadores se presentaron dificultades metodológicas. Los ensayos sobre dializadores nuevos fueron concluyentes respecto a la eficiencia de la actividad, en ninguna fracción se recuperaron microorganismos luego del tratamiento establecido. Sin embargo, cuando se realizaron los ensayos sobre dializadores usados, todas las fracciones obtenidas de la sección interna de los dializadores no eran filtrables debido a la presencia de interferencias provenientes del dializador usado y por lo tanto no fue posible obtener los resultados correspondientes a estas muestras, incluso después de las modificaciones realizadas sobre el diseño de los experimentos. A pesar de estos inconvenientes, los resultados son consistentes al momento de asegurar la eficiencia de la actividad de la solución de conservación en la sección externa de los dializadores, incluso frente a cargas

tan altas de microorganismos como las ensayadas, que superan ampliamente al número que podría estar presente en este tipo de sistemas. Este resultado es importante dado que sección externa del dializador es la que entra en contacto directo con el líquido de diálisis y es donde podrían haber accedido los microorganismos provenientes del sistema, y no así en la sección interna del dializador. De todas maneras se podría buscar la manera de mejorar el diseño de estos ensayos para poder analizar también la sección interna del dializador.

La tercera parte del trabajo consistió en evaluar métodos alternativos de análisis y su aplicabilidad al sistema en cuestión.

Citometría de flujo:

Desde una perspectiva práctica, los resultados obtenidos empleando el método de recuento en placa tienen una incertidumbre $> 30\%$ comparado con la citometría de flujo con un error estándar $< 5\%$ (Hammes F. et al., 2008). El recuento en placa puede llevar hasta 7 días para obtener los resultados definitivos, mientras que la citometría de flujo requiere 20 minutos. Sin embargo, para evaluar una metodología de desinfección como la radiación UV, la cual no destruye físicamente las células; debería tomarse en cuenta que la determinación del número total de células resulta un parámetro insuficiente (Berney M. et al., 2006; Hammes F. et al., 2008). Esta limitante podría salvarse empleando el kit Live / Dead BacLight™ Bacterial Viability and Counting kit, que diferencia el estado de las células en base a la permeabilidad de la membrana a colorantes, propiedad que si se ve afectada por este tipo de procesos. A pesar de ello, no fue posible demostrar una alta sensibilidad del método para el sistema en nuestras condiciones de trabajo, característica que se vuelve fundamental cuando se trata de sistemas cuyas aplicaciones implican cargas muy bajas de microorganismos y con una tendencia que apunta a minimizar estas poblaciones. Es importante destacar que nuestros resultados no excluyen a la citometría de flujo como método aplicado a determinaciones de microorganismos en sistemas limpios, de hecho existen múltiples publicaciones al respecto (Hammes F. et al., 2008; McHugh I.O.L. et al., 2007; Hoefel D. et al., 2003). En el caso de nuestro trabajo, si bien fue posible realizar determinaciones diferenciales que permitieron discriminar bacterias viables y bacterias no viables, no se lograron límites de detección mejorados respecto a los que se obtienen empleando los métodos tradicionales de cultivo.

Como metodología general la citometría demuestra muchas ventajas frente al recuento convencional, como el tiempo que implican los análisis y la posibilidad de discriminación de células en función de diferentes propiedades, como ser la viabilidad de las mismas. Sin embargo presenta también ciertas desventajas como el alto costo de equipo, mantenimiento y reactivos; así como operadores especializados. Además, para nuestro sistema y condiciones de trabajo en particular no fue posible lograr la sensibilidad deseada. Estos aspectos dificultan la aplicación de esta metodología como parte del control rutinario de sistemas de esta naturaleza, cuya finalidad es obtener un producto de alta calidad, lo que implica una población microbiana baja.

Microscopía de fluorescencia:

Esta metodología, al igual que la citometría de flujo se basa en la detección de células en base a su capacidad de tinción con diferentes colorantes fluorescentes en función de diferentes propiedades o estados celulares como son la viabilidad y la tinción al Gram. A pesar de que ambas metodologías parten del mismo principio, presentan grandes diferencias ya que el empleo del microscopio de fluorescencia permite observar los preparados tratados con los fluoróforos y por lo tanto es posible distinguir bacterias teñidas de partículas presentes en la matriz de la muestra que puedan haber sido teñidas, y que por citometría de flujo serían contadas de forma indiscriminada. La observación de las muestras es una ventaja que presenta esta metodología porque permite al operador observar la situación para poder evaluarla, pero sin embargo se trata de una técnica mucho más trabajosa lo que conlleva a un mayor tiempo de análisis. El límite de detección esperado para esta técnica es del orden de 10^5 microorganismos/ mL, lo que coincide con la sensibilidad preestablecida para el método de recuento microscópico directo y lo que resultó concordante con nuestros resultados. Dado que el límite de detección obtenido en los análisis por citometría de flujo fue de un orden similar, sería posible establecer una correlación entre ambas metodologías, para los distintos puntos del sistema en cuestión, para validar los ensayos de citometría y en caso de ser necesario un conteo diferencial de células poder emplear esta técnica de análisis (más rápida y menos trabajosa), con la seguridad de que realmente se están valorando bacterias y no posibles interferencias.

Técnicas de PCR en tiempo real:

Las técnicas basadas en la amplificación y caracterización de ácidos nucleicos tienen un enorme potencial para confirmar cultivos presuntivos, identificar aislamientos de cultivos por métodos convencionales y aportar datos de microorganismos e información de la presencia de patógenos circulando en determinadas áreas del sistema.

Sin embargo estos métodos continúan teniendo pocas aplicaciones al momento de considerarlos como herramienta para el control rutinario de estos sistemas. En este trabajo se buscó realizar un análisis crítico de las perspectivas de uso de métodos de biología molecular basados en la amplificación de ácidos nucleicos para el monitoreo de sistemas de agua.

Los organismos encargados de la regulación de la calidad de agua usualmente recomiendan los métodos estándar de cultivo para el análisis microbiológico. Los métodos alternativos para determinar parámetros microbiológicos únicamente deberían usarse cuando es posible demostrar que los resultados obtenidos mediante el empleo de estas técnicas aportarán información más relevante que los métodos establecidos por dichos organismos (Jofre J. et al., 2010).

En el caso particular de los resultados obtenidos en este trabajo por PCR en tiempo real para *Stenotrophomonas maltophilia*, si bien no sería aplicable a la cuantificación en el sistema real (por la baja sensibilidad), podría emplearse para la rápida identificación o confirmación de un aislamiento de este microorganismo debido a la especificidad de los primers utilizados.

Perspectivas planteadas:

- Evaluar el potencial de generación de biofilms de los microorganismos aislados de las cañerías y también de los microorganismos recuperados en hemocultivos.
- Estudiar nuevas alternativas metodológicas para el análisis del compartimiento interno de dializadores usados, con la finalidad de lograr resultados experimentales que respalden la eficiencia de la solución de conservación en estas condiciones.
- Realizar el análisis de actividad de la solución de conservación sobre *Methylobacterium radiotolerans*, que se trata de un microorganismo Gram negativo esporulado que encuentra asociado crónicamente al sistema.
- En el desarrollo del trabajo, todos los métodos alternativos de análisis que fueron ensayados no lograron límites de detección mejorados respecto a los que se obtienen empleando los métodos tradicionales de cultivo. Se plantea el diseño y la implementación de metodologías de concentración de muestras de agua que permitan alcanzar cargas microbianas suficientes para la aplicación de dichas metodologías. Una posibilidad implica el procesamiento grandes volúmenes, lo cual significa un desafío para la aplicación práctica.

ANEXOS

ANEXO 1

Composición de los medios de cultivo:

TSA (Difco™ Tryptic Soy Agar)

Formula por litro:

Digerido pancreático de Caseína	15.0 g
Digerido Enzimático de Soja	5.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

PCA (Difco™ Plate Count Agar)

Formula por litro:

Digerido Pancreático de Caseína	5.0 g
Extracto de Levadura	2.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g

R2A (Difco™ R2A Agar)

Formula por litro:

Extracto de Levadura	0.5 g
Proteasa Peptona No. 3	0.5 g
Casaminoácidos	0.5 g
Dextrosa	0.5 g
Almidón soluble	0.5 g
Piruvato de Sodio	0.3 g
Fosfato bipotásico	0.3 g
Sulfato de Magnesio	0.05 g
Agar	15.0 g

MacConkey Agar (Difco™ MacConkey Agar)

Formula por litro:

Peptona	17.0 g
Proteasa Peptona	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares No. 3	1.5 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo Neutro	0.03 g
Cristal Violeta	1.0 mg

ANEXO 2

Protocolo para extracción de ADN (AppliChem®)

AppliChem (Geno/mini DNA Isolation Spin-Kit – A5185): Kit comercial para la purificación de ADN genómico empleando mini columnas.

Introducción:

Este kit se basa en la propiedad del ADN de ser adsorbido en la superficie de la sílica en presencia de sales caotrópicas. Las células son lisadas empleando una solución de lisis que contiene sales caotrópicas (Total Lysis buffer AC), conjuntamente con la Proteinasa K. A continuación, el lisado, conteniendo el ADN, se pasa a una columna. El ADN es adsorbido en la superficie de filtro de sílica mientras que los contaminantes pasan a través sin ser adsorbidos. Luego del lavado, el ADN es eluido en GU o buffer de baja concentración salina.

Componentes del kit:

Solución de lavado (AC1)

Buffer Tris ACTB

Buffer de lisis (AC)

Solución de Proteinasa K

Columnas (Spin AC mini columns)

Tubos de 2mL

Preparación del material:

1. Transferir la muestra* a un tubo de centrifuga y centrifugar durante 10 min. a 7000rpm
2. Remover el sobrenadante
3. Suspender el pellet en 100µL de Buffer Tris ACTB (Tris.HCl 10mM, pH8.5, suplementado)
4. Agregar 200µL de buffer de lisis AC y 20µL de Proteinasa K.
5. Agitar con vortex durante 20 segundos
6. Incubar a 37°C por 20 minutos
7. Transferir la muestra a 70°C e incubar por 5 minutos
8. Agitar con vortex por 20 segundos
9. Seguir el protocolo de aislamiento

Obtención de la muestra*:

La muestra se prepara directamente en un tubo eppendorf. Se prepara una suspensión a partir de un cultivo puro del microorganismo en cuestión en medio R2A en 1 mL de suero fisiológico y luego se centrifuga.

Protocolo de aislamiento:

1. Centrifugar la muestra por 2 minutos a 10.000 – 14.000 rpm
2. Transferir el sobrenadante a la columna
3. Centrifugar por 1 minuto a 10.000 – 14.000 rpm
4. Abrir la columna y agregar 500µL de la Solución de lavado AC1
5. Centrifugar por 2 minutos a 10.000 – 14.000 rpm
6. Para fluir el ADN, transferir la columna a un nuevo tubo de reacción (1.5mL) y agregar 100 - 200µL de Buffer Tris ACTB o agua (precalentado a 75°C).
7. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
8. Centrifugar 1 minuto a 10.000 – 14.000 rpm.
9. Remover y descartar la columna.

ANEXO 3

Protocolo para la determinación de endotoxinas bacterianas (ensayo de LAL):

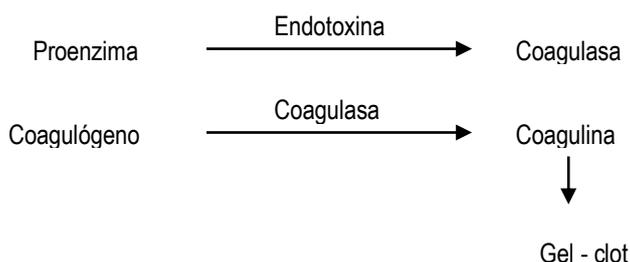
Limulus Amebocyte Lysate (LAL), PYROGENT® Ultra (Lonza) :

Introducción:

El ensayo se basa en la propiedad de coagulación de la sangre del *Limulus polyphemus* en presencia de bacterias Gram negativas. Dicha propiedad es resultado de la reacción entre las endotoxinas que forman parte de la membrana externa de los gérmenes Gram negativos y una proteína coagulable de los amebocitos presentes en la sangre del *Limulus*. El reactivo de LAL consiste en un lisado de estos amebocitos (LONZA, PYROGENT®).

Principio de la reacción:

Las endotoxinas de las bacterias Gram negativas catalizan la activación de una proenzima presente en el Lisado de Amebocitos de Limulus. La enzima activada (coagulasa) hidroliza enlaces específicos de la proteína (coagulígeno) también presente en el Lisado de Amebocitos de Limulus, resultando en una estructura (coagulina) con capacidad de asociación entre sí, formando un coágulo gelatinoso (gel – clot).



Componentes del kit:

1. Lisado de Amebocitos de Limulus, liofilizado.
2. Endotoxina de E.coli O55:B5. Stds. de endotoxina.

El kit cuenta con 5 viales cada uno de los cuales contiene soluciones líquidas de concentraciones establecidas de endotoxina: 2λ, λ, 1/2λ, 1/4λ y un quinto vial que contiene una concentración de 10 x 2λ (empleado para la preparación de los controles positivos). λ representa la sensibilidad del kit y está declarada para cada kit.

Preparación de la muestra:

Durante la recolección y preparación de la muestra debe evitarse la contaminación microbiana o por endotoxinas de la misma, por lo que es imprescindible tener la precaución de emplear durante toda la manipulación material estéril y libre de pirógenos.

Es estrictamente necesario ajustar el pH de la muestra a un rango comprendido entre 6.0 y 8.0 (empleando NaOH y/o HCl libre de pirógenos), esta operación siempre debe hacerse sobre soluciones buffereadas.

Las muestras deben almacenarse a una temperatura de 2-8°C por un período no superior a 24 hs. o en caso contrario deben congelarse.

Preparación de reactivos:

1. Preparación del Lisado de Amebocitos de Limulus:
 - A. Reconstituir el vial conteniendo el liofilizado con 5.2mL de agua para LAL. Mezclar suavemente durante 30 segundos.
 - B. El lisado reconstituido puede almacenarse durante 24hs. sin pérdida de sensibilidad, o puede dividirse en volúmenes convenientes y almacenarse a -10°C durante 4 semanas. El reactivo debe descongelarse inmediatamente antes de ser usado y no puede volver a congelarse.
2. Preparación de los Stds. de endotoxina:
 - A. Permitir que los viales alcancen temperatura ambiente e incubarlos a 37±1°C.
 - B. Invertir los viales al menos 5 veces para homogeneizar el contenido
 - C. Almacenar de 2-8°C durante 4 semanas. No congelar.

Procedimiento e interpretación del test:

1. Transferir cuidadosamente (para evitar contaminación) a un tubo de reacción 100µL de cada una de las diluciones del estándar y la muestra.

Es importante incluir todo el rango de concentraciones de estándar para construir la curva y verificar la sensibilidad del reactivo.
2. De manera similar, añadir en un tubo de reacción 100µL de agua para LAL (control negativo).
3. Agregar a cada uno de los tubos 100µL de lisado reconstituido, comenzando por el blanco y continuando por la menor concentración hasta la mayor concentración de endotoxina. Mezclar vigorosamente luego del agregado.
4. Incubar los tubos en baño sin agitación a 37±1°C. El tiempo de incubación debe medirse exactamente desde el momento en que los tubos se colocan en el baño y estos no deben moverse durante el período establecido.
5. Incubar exactamente 60±2 minutos.
6. Retirar los tubos del baño y examinar cada tubo para ver la formación del coágulo.
7. Interpretación:

Una reacción positiva se indica por la formación de un gel que se mantiene firme al invertir el tubo 180°.

Una reacción negativa se caracteriza por la ausencia de un coágulo firme luego de invertir el tubo. Incluso se puede observar turbidez o viscosidad incrementada pero aún así debe considerarse negativo.

ANEXO 4

BD BBL Enterotube II

Principios y explicación del procedimiento

BBL Enterotube II es un sistema de identificación listo para usar que se emplea en la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram negativos con resultado negativo a la oxidasa, basado en las reacciones bioquímicas. Se trata un tubo de plástico integrado con compartimientos formado por 12 medios diferentes que permiten la determinación de 15 reacciones bioquímicas (glucosa, producción de gas a partir de glucosa, descarboxilasa de lisina, descarboxilasa de ornitina, H₂S, indol, adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol, Voges-Proskauer (VP), dulcitol, desaminasa de fenilalanina (PA), urea y citrato). La combinación de reacciones resultante, junto con la guía de interpretación (libro de códigos), permite la identificación de la *Enterobacteriaceae*. Se obtiene un total de los números positivos comprobados y luego se sitúa el número compuesto en la guía de interpretación. Donde se enumeren dos o más organismos, también se indican las pruebas de confirmación necesarias para su identificación adicional.

Materiales y reactivos

Tubo de reacciones (Enterotubo)

Reactivos reveladores: - Reactivo de Kovacs (para prueba de indol)
- Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Bloc de resultados y gráfico de reacciones de colores para BBL Enterotube II.

Guía de interpretación

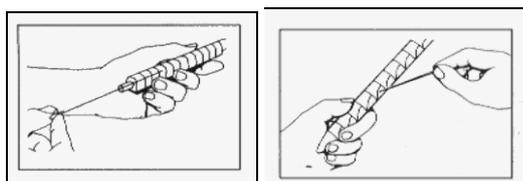
Procedimiento de análisis

1. El cultivo utilizado para la inoculación debe tener por lo menos 18 horas, pero en general no más de 48 horas. Es necesario asegurarse de que la cepa aislada que debe identificarse con BBL Enterotube II proceda de un cultivo puro de un bacilo gram negativo que sea negativo a la oxidasa.
2. Seleccionar una colonia bien aislada directamente con la punta de la guía de inoculación. Se debe observar una cantidad visible de inóculo en la punta y en el costado de la guía. No tocar el agar con la guía.
3. Inocular BBL Enterotube II primero retorciendo la guía y luego retirando la guía por todos los compartimientos y aplicando un movimiento giratorio.
4. Volver a insertar la guía (sin esterilizar) en el tubo, utilizando un movimiento giratorio en todos los compartimientos, hasta que la muesca de la guía se alinee con la abertura del tubo. La punta de la guía debe estar visible en el compartimiento de citrato. Cortar la guía en la muesca mediante torsión. La parte de la guía restante en el tubo mantiene las condiciones anaerobias necesarias para una verdadera fermentación de la glucosa, la producción de gas y la descarboxilación de lisina y ornitina.
5. Con la parte restante de la guía, hacer orificios a través del papel metalizado que cubre las entradas de aire de los últimos ocho compartimientos (adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol, Voges-Proskauer,

dulcitol/PA, urea y citrato) para favorecer el crecimiento aerobio en los mismos. Volver a colocar las tapas.

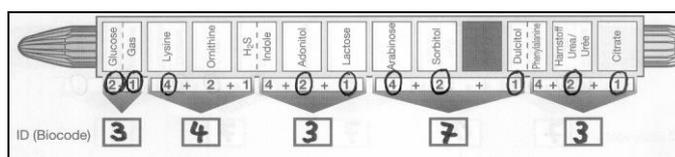
6. Incubar a 35 o 37 °C durante 18 - 24 horas sobre una superficie plana o en posición vertical. Permitir la circulación de aire entre los tubos incubados.
7. Efectuar la interpretación y registrar todas las reacciones con excepción de indol y Voges-Proskauer.
8. Para realizar la prueba de indol: Añada 3-4 gotas de reactivo de Kovacs al compartimiento H₂S/indol y permita que el reactivo contacte con la superficie del medio. Una prueba positiva se indica por la aparición de color rojo en el reactivo añadido al cabo de 10 segundos.
9. Para realizar la prueba de Voges-Proskauer (VP): Añadir 3 a 5 gotas de reactivo A de VP y de 1 a 2 gotas de reactivo B de VP. Una reacción positiva se indica por el cambio del color a un rojo cereza en 5–15 minutos. Una decoloración de color cobre o marrón se interpreta como reacción negativa. No espere más de 15 minutos para leer los resultados.

Nota: Al utilizar los reactivos preparados en laboratorio añadir dos gotas de solución de hidróxido de potasio al 20% con 0,3% de creatina y tres gotas de alfa-naftol al 5% en alcohol etílico puro. Una prueba positiva se indica por la aparición de un color rojo a los 20 min. No espere más de 20 minutos para leer los resultados.



Resultados

1. Después de 18 – 24 horas de incubación, efectuar la lectura de las reacciones de manera secuencial, comparando los colores de los medios en el tubo después de la incubación con aquellos que se suministran en el esquema de colores en la cubierta del bloc de códigos.
2. Indicar cada resultado de prueba positivo marcando con un círculo el número que aparece debajo del compartimiento apropiado en el bloc de resultados.
3. Sumar los números marcados con un círculo en la sección entre corchetes e ingresar la suma en el espacio suministrado debajo de las flechas.
4. Buscar el número de cinco dígitos en la guía de interpretación (libro de códigos) y encontrar la o las mejores respuestas en la columna denominada “ID Value“ (valor de ID).



ANEXO 5

BD BBL Oxi/Ferm Tube II

Principios y explicación del procedimiento

BBL Oxi/Ferm Tube II es un sistema de identificación listo para usar en bacterias gram negativas fermentadoras positivas a la oxidasa y no fermentadoras gram negativas. Consiste en un tubo de plástico integrado con compartimientos, formado con 12 medios diferentes que permiten la determinación de 14 reacciones bioquímicas. La guía de inoculación adjunta permite la inoculación de todos los compartimientos en un paso. Después de 48 h de incubación, se efectúa la lectura de los resultados y se registran todas las reacciones positivas. El bloc de resultados y el gráfico de reacciones de colores permiten una comprobación rápida de las reacciones positivas obtenidas. Se obtiene un total de los números positivos verificados y luego se sitúa el número compuesto en el BBL Oxi/Ferm Tube II Biocode Manual para identificar los organismos.

Reactivos

Cuadro de reacciones bioquímicas

Medio	Reacción
1	Ana-Gluc
2	Arginina
3	Lisina
4	Lactosa/N2
5	Sacarosa/Indol
6	Xilosa
7	Aer-Gluc
8	Maltosa
9	Manitol
10	PA (Fenilalanina)
11	Urea
12	Citrato

Procedimiento

Materiales y reactivos

Tubo de reacciones

Reactivos reveladores: - Reactivo de Kovacs (para prueba de indol)
- Reactivo de Oxidasa

Bloc de resultados y gráfico de reacciones de colores para BBL Oxi/Ferm Tube II.

Guía de interpretación (Biocode Manual).

Procedimiento de análisis

1. Para la inoculación de BBL Oxi/Ferm Tube II, se debe utilizar el crecimiento de medios no selectivos. El cultivo utilizado para la inoculación debe tener por lo menos 18 horas, pero generalmente no más de 48 horas. Sólo en casos muy raros, los organismos pueden tardar más tiempo en producir un crecimiento suficiente para la inoculación.
2. Antes de la inoculación se debe realizar una prueba de oxidasa.
3. Quitar las dos tapas. La punta de la guía de inoculación se encuentra debajo de la tapa blanca. Sin someter la guía al calor, seleccionar una colonia bien aislada con la punta de la guía. No realizar punciones en el agar.
4. Inocular retorciendo primero la guía, luego extrayéndola por todos los compartimentos y aplicando un movimiento giratorio
5. Volver a insertar la guía (sin esterilizar) hasta que su muesca quede alineada con la abertura del tubo. La punta de la guía debe estar visible en el compartimento de citrato. Cortar la guía en la muesca mediante torsión. La porción de la guía restante en el tubo mantiene las condiciones anaerobias necesarias para una verdadera fermentación.
6. Con la parte cortada de la guía, hacer orificios por el papel metalizado que cubre las entradas de aire en los siguientes compartimentos: sacarosa/indol, xilosa, glucosa aerobia (Aer-Gluc), maltosa,
7. manitol, PA, urea y citrato. Volver a colocar las tapas.
8. Incubar a 35 – 37 °C durante 48 horas. Permitir la circulación de aire entre los tubos incubados.

Nota: Tener en cuenta que se requiere el examen del compartimento de urea después de 18 – 24 horas de incubación, dado que esta información puede ser necesaria como prueba de confirmación "rapid urease test".

Resultados

1. Después de 24 horas de incubación, se debe efectuar la lectura de solamente la reacción de urea y registrar un resultado positivo que pueda necesitarse como prueba complementaria para este aislado (prueba rápida de ureasa).
2. Después de 48 horas de incubación, realizar la interpretación de todas las reacciones. Excepto para el indol, efectuar la lectura de las reacciones de manera secuencial, comparando los colores de los medios en el tubo después de la incubación con los suministrados en el esquema de colores en la cubierta del bloc de códigos.
3. Indicar cada resultado de prueba positiva, incluido un resultado positivo de urea de 48 horas, marcado con círculo el número que aparece debajo del compartimento apropiado en el bloc de resultados.

4. Para realizar la prueba de indol: añada 3-4 gotas de reactivo de Kovacs al compartimento sucrose/indole. Permita que el reactivo contacte con la superficie del medio. Una prueba positiva se indica por la aparición de color rojo en el reactivo añadido al cabo de 10 segundos.
5. Sumar todos los dígitos marcados con círculos dentro de cada sección entre corchetes e ingresar
6. esta suma en el espacio debajo de las flechas.
7. Buscar este número de cinco dígitos en el BBL Oxi/Ferm Tube II Biocode Manual. Dicha cifra se
8. utiliza para identificar el género y/o la especie del organismo.
9. Si aparecen varios organismos después del número de perfil, se deben realizar las pruebas de confirmación indicadas el manual de biocódigo para diferenciar estos organismos.

ANEXO 6

Qubit™ dsDNA BR Assay Kits

Componentes del kit:

Material	Cantidad	Concentración	Almacenamiento	Estabilidad
Qubit™ dsDNA BR reagent (Component A)	250 µL 1.25 mL	200X concentrate in DMSO	<ul style="list-style-type: none"> • Room temperature • Desiccate • Protect from light 	When stored as directed, kits are stable for 6 months
Qubit™ dsDNA BR buffer (Component B)	50 mL 250 mL	NA	<ul style="list-style-type: none"> • Room temperature 	
Qubit™ dsDNA BR standard #1 (Component C)	1 mL 5 mL	0 ng/µL in TE buffer	<ul style="list-style-type: none"> • ≤4°C 	
Qubit™ dsDNA BR standard #2 (Component D)	1 mL 5 mL	100 ng/µL in TE buffer		

NA = Not applicable

Principio del kit:

El kit Qubit™ dsDNA BR Assay fue diseñado para ser usado en con un fluorímetro (Qubit® 2.0 Fluorometer).

El kit provee el reactivo de ensayo concentrado, el buffer para las diluciones y las soluciones de estándares de ADN.

El ensayo se lleva a cabo a temperatura ambiente y la señal es estable por 3 horas.

Para su uso simplemente se debe preparar la dilución indicada de la muestra (Figura 1) y leer la concentración empleando el fluorímetro Qubit® 2.0. Previamente debe hacerse una calibración con los dos estándares proporcionados por el kit.

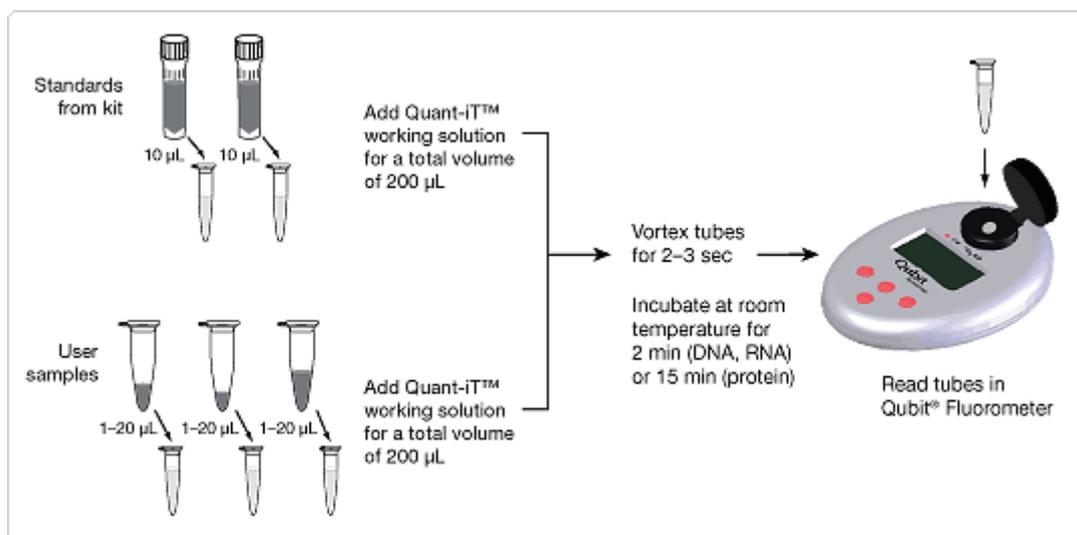


Figura 1. Esquema de trabajo para Quant-iT™.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrysiak P., Varughese P.M., 2002. Design Requirements for a Water Distribution System in a Hemodialysis center. *Dialysis and transplantation*; 31(10): 683-690.
- Antón D., Araque Y., De Donato M., Medina B., Marcano M. 2005. Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Kasmera*; ISSN 0075-5222. v33 n.2.
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), Standards for hemodialysis systems. ANSI/AAMI RD52, 2004.
- Barcina I., Gonzalez JM., Iriberry J., Egea L. 1989. Effect of Visible Light on Progressive Dormancy of *Escherichia coli* Cells during the Survival Process in Natural Fresh Water. *Applied and environmental microbiology*; Vol. 55, No. 1, p. 246-251.
- Baumeister U., Vienken J., Daum V. 1989. High-flux dialysis membranes: endotoxin transfer by backfiltration can be a problem. *Nephrology Dialysis Transplantation*; 4: 89-93.
- BD Biosciences. Bacterial detection and Live/Dead Discrimination by Flow Cytometry. Application Note.
- Bereschenko L.A.; Heilig G.H.J.; Nederlof M.M; van Loosdrecht M.C.M; Stams A.J.M.; Euverink1 G.J.W. 2008. Molecular Characterization of the Bacterial Communities in the Different Compartments of a Full-Scale Reverse-Osmosis Water Purification Plant. *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 74, No. 17: 5297-5304.
- Bereschenko L.A., Stams A.J.M., Euverink1 G.J.W., van Loosdrecht M.C.M. 2010. Biofilm formation on reverse osmosis membranes is initiated and dominated by *Sphingomonas spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.01998-09
- Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H.U., Egli T. 2007. Assessment and Interpretation of bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*; 73 (10): p.3283 – 3290.
- Binding N., Jaschinski S., Werlich S., Bletz S., Witting U. 2003. Quantification of lipopolysaccharides (endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids. *Journal of Environmental Monitoring*; 6:65-70.
- Bueno Montanari L., Garcia Sartori F., de Oliveira Cardoso M.J., Dutra Varo S., Pires R.H., Fujimura Leite C.Q., Karina Prince K., Gomes Martins C.H. 2009. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*; 51(1): 37-43.
- Burmølle M., Webb J.S., Rao D., Hansen L.H., Sørensen S.J., Kjelleberg S. 2006. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and environmental microbiology*; Vol. 72, No. 6, p. 3916-3923.
- Bustin S.A., Nolan T. 2004. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Molecular Techniques*; 15: 155 – 166.
- Canadian Standards Association, 2003. Water treatment Equipment and Water quality Requirements for haemodialysis; Z364.2.2-03, Toronto, ON.
- Centro de Diálisis del Hospital Evangélico. 2009. Recuperación y conservación del circuito extracorpóreo. Procedimiento interno.
- Chen C.L., Liu W.-T., Chong M.-L., Wong M.-T., Ong S.-L., Seah H., Ng W.J. 2004. Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 63:466-473.

- Contreras L., Calvo M., Segovia E., Luppi M., Barriga F. 2003. Tratamiento de las infecciones asociadas a catéteres venosos centrales. *Revista Chilena de Infectología*; 20 (1): 70-75.
- Costa J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*; 22(5):299-305.
- Davey H.M., Kell D.B. 1996. Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses. *Microbiological Reviews*, Vol.60 (4): 641 – 696.
- De Francisco A.L.M., Pérez García R. 2001. Ultrapure dialysate and its effect on patients outcome. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*; 12(3): 406-412.
- Dehus O., Hartung T., Hermann C. 2006. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Journal of Endotoxin Research*; Vol. 12; N° 3, 171-180.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Reboledo C.W. Infostat versión 2009. GrupoInfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Donlan R.M., Costerton J.W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*; 15(2): p. 167-193.
- European Pharmacopeia 7.0. 2010. Haemodialysis solutions, concentrated, water for diluting; <1167>, 2135.
- Ferguson C., Kaucner C., Krogh M., Deere D., Warnecke M. 2004. Comparison of methods for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from raw waters. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 675–682 (2004).
- Fondo Nacional de Recursos. Vigilancia en Hemodiálisis. 2005.
- Genome Diagnostics Pvt. Ltd. <http://www.realtimepcrkits.com/useful-links.html>
- Gomila M., Gascó J., Busquets A., Gil J., Barnabeu R., Buades J.M., Lalucat J. 2005. Identification of culturable bacteria present in hemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 101-114.
- González B.H. 2006. La prueba de Shapiro & Wilk para verificar la normalidad de un conjunto de datos proveniente de muestras pequeñas. Área de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Universidad Rafael Landívar. Guatemala C.A. Publicación octubre 2006, p 1-14.
- Gregory R., 2001. Coincidence, coevolution, or causation? DNA content, cell size, and the C-value enigma. *Biological Reviews*; 76; p. 65 - 101.
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Köster O., Egli T. 2008. Flow cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water research*; 42: 269-277.
- Hiraishi A., Furuhashi K., Matsumoto A., Koike K.A., Fukuyama I., Tabuchi K. 1995. Phenotypic and Genetic Diversity of Chlorine-Resistant *Methylobacterium* Strains Isolated from Various Environments. *Applied and Environmental Microbiology*; Vol. 61, No. 6, p. 2099–2107.
- Hoefel D., Grooby W.L., Monis P.T., Andrews S., Saint C.P. 2003. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: A comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods*; 55:585–597.
- Huang B., Bates M., Zhuang, X.. 2009. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual Review of Biochemistry*; 78:993–1016.
- Invitrogen Life Science. 2010. Fluorescence Fundamentals. Molecular Probes: The Handbook.
- Invitrogen, Molecular Probes. 2005. CountBright™ Absolute counting Vidas for flow Cytometry. Product Information.

- Invitrogen, Molecular Probes. 2004.LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability and Counting kit. Product Information.
- International Organization for Standardization, ISO 11663: 2009 “Quality of diálisis fluid for haemodialysis and related therapies”.
- International Organization for Standardization, ISO 13959: 2009. Water for haemodialysis and related therapies.
- Italian Society of Nephrology. 2005. Guidelines on water and solutions for dialysis. *Giornale Italiano di Nefrologia*; 22: p. 246-273.
- Jofre J., Blanch A.R. 2010. Feasibility of methods based on nucleic acid amplification techniques to fulfil the requirements for microbiological analysis of water quality. *Journal of Applied Microbiology*; ISSN 1364-5072.
- Kontana A., Papadimitriou C.A., Samaras P., Zdragas A., Yiangou M. 2009. Effectiveness of ozonation and chlorination on municipal wastewater treatment evaluated by a battery of bioassays and biomarkers. 2009. *Water Science & Technology*; 60.6,1497 - 1505.
- Kulakov L.A., McAlister M.B., Ogden K.L., Larkin M.J., O’Hanlon J.F.2002. Analysis of bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Applied and Environmental Microbiology*; p.1548-1555.
- Laboratorios de microfotónica, Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma de Madrid (http://www.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm).
- Lasa I., del Pozo J.L., Penadés J.R., Leiva J. 2005. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*; V.28 (2), p. 163 – 175.
- Layman-Amato R., 1995. Disinfection of an RO System: Clearing the Issues. *Dialysis and Transplantation*, Volume 24 (5): 244.
- Lee M., Ten L.N., Lee H., Woo Oh H., Im1 W., Lee S. 2008. *Sphingopyxis ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 58, 2342–2347
- Lerín I., Salazar R., Suñé M.J., Ticó J.R. 1999. Introducción a los sistemas de tratamiento de agua en la industria Farmacéutica. *Tecnología Industrial*; p. 97-107.
- Liu W.-T. 2010. Biofilms in drinking wáter distribution systems – from sampling to microbial diversity analysis. University of Illions at Urbana-Champaign.
- Lonnemann G. 1998. Assessment of the quality of dialysate. *Nephrology Dialysis Transplantation*; V. 13, Suppl 5: 17-20.
- LONZA. Limulus Amebocyte Lysate (LAL) PYROGENT® Ultra Gel Clot LAL Assay. Cat. N°: N594-03, N594-06, N594-125.
- Lucena F., Me´ndez X., Morón A., Calderón E., Campos C., Guerrero A., Cárdenas M., Gantzer C., Shwartzbrood L., Skraber S., Jofre J. 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Journal of Applied Microbiology*; 94; 808–815.
- Magalhaes M., Doherty C., Govan J.R.W., Vandamme P. 2003. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients; *Journal of Hospital Infection*; 54, 120-123.
- Matas Parra C. 1997. Análisis mediante citometría de flujo de la respuesta de los espermatozoides de verraco a diferentes medios de incubación. Tesis de maestría. Facultad de Veterinaria. Patología Animal. Universidad de Murcia.
- McHugh I.O.L., Tucker A.I. 2007. Flow Cytometry for the Rapid Detection of Bacteria in Cell Culture Production Médium. *Cytometry Part A. Journal of the International Society for Analytical Cytology*; 71A: 1019 - 1026.

Medina J., Rodríguez M., Artesiano R., Savio E., González F., Bazet C., Seija V. 2006. Conducta frente a la sospecha de infección relacionada a catéter venoso central para hemodiálisis. *Revista Médica del Uruguay*; 22: 29-35.

Monserrat J. 2009. Fundamentos y aplicaciones analíticas y separativas de la inmunofluorescencia y la citometría de flujo. Unidad mixta CSIC/UAH (http://www2.uah.es/curso_jorge_monserrat/Clases/clase%20fundamentos2009.pdf)

Morales-Morales H.A., Vidal G., Olszewski J., Rock C.M., Dasgupta D., Oshima K.H., Smith G.B. 2003. Optimization of a Reusable Hollow-Fiber Ultrafilter for Simultaneous Concentration of Enteric Bacteria, Protozoa, and Viruses from Water. *Applied and environmental microbiology*; Vol. 69, No. 7, p. 4098 – 4102.

Morales Vallejo P. 2009. Introducción al Análisis de Varianza. Facultad de Ciencias Humanas y Sociales.

Mueller L.N., de Brouwer J.F.C., Almeida J.S., Stal J.S., Xavier J. 2006. Análisis de una marina fotótrofa biofilm por microscopía de escaneo láser confocal utilizando la nueva imagen de la cuantificación de software PHLIP. *BioMed Central (BMC) Ecology*, 6: 1-1.

Oliveira Lima J.R., Garcia Marques S, Guedes Gonçalves A, Salgado Filho N, Cruz Nunes P, Sousa Silva H, Gomes Monteiro S, Lopes Costa J.M. 2005. Microbiological analyses of water from hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*; 36:103-108.

Ormerod M.G. 1990. *Flow Cytometry – A Practical Approach*. The Institute of Cancer Research. The Haddow Laboratories, Sutton, Surrey, UK.

Ouyang J., Pei Z., Lutwick L., Dalal A., Yang L., Cassai N., Sandhu K, Hanna B., Wiczorek R.L., Bluth M., Pincus M.R. 2008. *Paenibacillus thiaminolyticus*: A New Cause of Human Infection, Inducing Bacteremia in a Patient on Hemodiálisis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*; 38:393-400.

Pasmore M., Czamecki D. 2011. Controlling Biofilms in Pharmaceutical Water Systems: Lessons Learned from Clinical Water Systems. *Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter*. Vol. 17 (2): 2-12. 2011.

Pearson F.C., Bohon J., Lee W., Bruszer G., Sagona M., Jakubowski G., Dawe R., Morrison D., Dinarello C. 1984. *Characterization of Limulus amoebocyte lysate-reactive material from hollow-fiber dialyzers*. *Applied and Environmental Microbiology*; 48(6): 1189-1196

Perdomo R., Montero V. 2003. Validación de un ciclo de despirogenización por calor seco con el empleo del ensayo del lisado de amebocitos de limulus. *Revista Cubana de Farmacia*; 37(3).

Pérez-García R., Anaya F., Chisvert J., Valderrábano F. 1995. Association of high-flux dialysers and bacterial contamination of dialysate induced chronic release of cytokines in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 11: 2.164-2.166.

Pérez García R., González Parra E., Ceballos F., Escallada Cotero R., Gómez-Reino M.I., Martín-Rabadán P., Pérez García A., Ramírez Chamond R., Sobrino P.E., Solozábal C. 2004. Guías de Gestión de Calidad del Líquido de Diálisis. *Nefrología*; Vol. XXIV (II):1- 42.

Pérez García R, Rodríguez Benítez P, Ayala JA. 1999. Tratamiento del agua para hemodiálisis. Características del líquido de diálisis. Capítulo 5. En *Tratado de Hemodiálisis*. Ed. F. Valderrábano. Editorial Médica JIM S.S.L. p.75-90.

Pérez-García R, Rodríguez Benítez P. 2000. Why and how to monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrology Dialysis Transplantation* 15: 760-764.

Pértiga S., Pita S. 2001. Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. t de Student Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España) *Cad. Aten. Primaria*; 8: 37-41.

Pertosa G., Gesualdo L., Bottalico D., Schena F.P. 1995. Endotoxins modulate chronically tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 release by uraemic monocytes. *Nephrology Dialysis Transplantation*; 10: 328-333.

- Petti C.A.. 2007. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*; 44: 1108-1114.
- Rajal V.B., McSwain B.S., Thompson D.E., Leutenegger M., Kildare B.J., Wuertz S. 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Science Direct; Water Research*; 41:1411-1422.
- Reasoner D.J., Blannon J.C., Geldreich E.E., and Barnick J. 1989. Nonphotosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*; 55:912-921.
- Recursos., F.N.d., *Guía de Gestión de Calidad del Agua para Diálisis*. Primera ed. 2007: Fondo Nacional de Recursos. 55.
- Reis, J.D.P.; Faria, N.C.; Filter, A. Qualidade bacteriológica da água para hemodiálise do Distrito Federal. 1998. *Rev. Saúde Distrito Federal*, 9 (2).
- Rice E.W., Reasoner D.J., Johnson C.H., DeMaria L.A. 2000. Monitoring for *Methylobacteria* in Water Systems. *Journal of clinical microbiology*; Vol. 38, No. 11: 4296-4297.
- Rios-Licea M.M; Bosques F.J.; Arroliga A.C.; Galindo-Galindo J.O.; Garza-Gonzalez E. 2010. Quadruplex real-time quantitative PCR assay for the detection of pathogens related to late-onset ventilator-associated pneumonia. A preliminary report. *Journal of Microbiological Methods*; 81: 232-234.
- Rodicio M.C., Mendoza M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*; 22(4):238-45.
- Rodríguez A., Novoa M.C., Mieres M.A., Herrera R., González Y. 2003. Determinación de coliformes totales y *E.coli* en aguas utilizando el Fluorocult LMX (MERCK) I: Comparación con los medios de cultivo tradicionales. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, Vol. XXIV, No. 3, P. 15 - 20.
- Rodriguez C., Wachlin A., Altendorf K., García F., Lipski A. 2007. Diversity and antimicrobial susceptibility of oxytetracycline-resistant isolates of *Stenotrophomonas* sp., and *Serratia* sp. Associated with Costa Rica crops. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
- Sancho-Chust J.N., Andreu A.L., Chiner E. 2010. *Ralstonia pickettii* y exacerbación de EPOC. *Archivos de Bronconeumología*; Volumen 46, Número 01, 46-48.
- Santos, F.; Santos, A.G.; Biernat, J.C.; Souza, M.E.L.; Raubach, A.; Aguirre, A.; Antoniazzi, V.R.; Scorsatto, K.; Seibel, I.; Demin, S.S.; Hickmann, A.C.; Oliveira, F.P.; Borba, E.V.; Simon, S.; Santos, S.S. 2000. Detecção de endotoxina pelo teste do limulus amoebocyte lysate (LAL) em unidades de hemodiálise. *Revista Virtual de Medicina*; V1, N6.
- Schiffli H., Lang S.M., Stratakis D., Fischer R. 2001. Effects of ultrapure dialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. *Nephrology Dialysis Transplantation*; 16: 1863 - 1869.
- Schulte S., Wingender J., Flemming H.-C. 2005. Efficacy of biocides against biofilms. *Directory of microbicides for the protection of material and processes*; p. 90-120.
- Simmons O.D., Sobsey M.D., Heaney C.D., Schaefer F.W., Francy D.S. 2001. Concentration and Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Surface Water Samples by Method 1622 Using Ultrafiltration and Capsule Filtration. *Applied and environmental microbiology*; Vol. 67; No. 3; p. 1123 - 1127.
- Sociedad Española de Nefrología. *Guías de Gestión de Calidad del Líquido de Diálisis (LD)*. 2006.
- Sociedad Uruguaya de Nefrología, Fondo Nacional de Recursos. Centro de Nefrología - Hospital de Clínicas - UdelaR. 2008. Registro Uruguayo de Diálisis. Informe Anual 2008.

Souza A.V.; Moreira C.R.; Pasternak J.; Hirata M.deL.; Alves Saltini I.; Caetano V.C; Ciosak S.; Azevedo F.M.; Severino P.; Vandamme P.; Magalhaes V.D. 2004. Characterizing uncommon Burkholderia cepacia complex isolates from an outbreak in an haemodialysis unit. Journal of Medical Microbiology; 53: 999-1005.

Stocks S.M. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. Cytometry; 61(2):189-195.

Su F., Luo M., Zhang F., Li P., Lou K., Xing X. 2009. Performance of microbiological control by a point-of-use filter system for drinking water purification. Journal of Environmental Sciences; 21, 1237–1246.

Takeuchi M., Hamana K., Hiraishi A. 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ;51, 1405–1417

Tokajian S., Al-Medawar S., Hashwa F. 2008. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region for the molecular typing of sphingomonads. Canadian Journal of Microbiology; 54:668-676.

Torregrosa I., Pérez A., Giménez M. 1998. Tratamiento del agua para hemodiálisis. Nefrología; Vol. XVIII (1): 14 - 21.

United States Pharmacopeia., <85> Prueba de endotoxinas bacterianas. USP 34, 2011.

United States Pharmacopeia, <1230> Water for health applications. Water for haemodialysis. USP 34, 2011.

Valasek M. A., Repa J.J., 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education 29: 151-159.

Van der Linde K., Lim Bing T., Rondeel Jan M.M., Antonissen Lea P.M.T, De Jong Gijs M.T. 1999. Improved bacteriological surveillance of Hemodialysis fluids: a comparison between Tryptic Soy Agar and Reasoner's 2A media. Nephrology Dialysis Transplantation, 14: 2433-2437.

Varela C., Márquez E., 2003. Diseño del sistema de tratamiento de agua para Hemodiálisis para un caso dado. Sociedad Cubana de Bioingeniería, artículo T_0100.

Wright H.B., Cairns W.L. 2001. Water Disinfection by Ultraviolet Light. Trojan Technologies Inc.