



Detectando Patógenos Propagados a través del Agua: Un Vistazo a los Métodos Pasados, Presentes y Futuros

por Kelly A. Reynolds, MSPH, Ph.D.

Se sabe que los patógenos entéricos humanos causan enfermedades extensas propagadas a través del agua, a un costo estimado de US\$20,000 millones anuales en pérdida de productividad tan sólo en los Estados Unidos. A nivel mundial, se piensa que las enfermedades propagadas a través del agua son la causa de casi 6,000 muertes cada día, en su mayoría niños.¹ A pesar de contar con un amplio conocimiento sobre la variedad de microbios que se encuentran en nuestro ambiente y su asociación con las enfermedades, aún nos queda un largo camino por recorrer.

Los métodos de detección de microbios han progresado de gran manera desde que Anton van Leeuwenhoek construyó el primer microscopio y descubrió el mundo microbiano (cerca de 1680); sin embargo, aproximadamente la mitad de los brotes en agua potable hoy en día son causados por agentes desconocidos o no identificados. Los virus responsables por una porción significativa de las enfermedades gastrointestinales en los Estados Unidos, es decir, los calicivirus, no pueden ser cultivados en laboratorio. Además, nuevas clases de patógenos continúan emergiendo y se piensa que la incidencia de enfermedades microbianas documentadas es la punta del iceberg con respecto al verdadero impacto en la salud pública asociado con los patógenos microbianos.

La dificultad de enfocarse en un microbio específico como agente causante de un brote de enfermedad se debe en parte a una falta de metodologías apropiadas y efectivas para su detección. La incapacidad de detectar rápida y efectivamente patógenos entéricos humanos en el agua potable ha llevado al uso de organismos indicadores para monitorear la calidad del agua potable. Esto ha limitado los esfuerzos de investigación para identificar, caracterizar y evaluar directamente los riesgos al igual que los métodos de reducción de riesgo para una gran variedad de microbios que causan enfermedades.

Tan pocos patógenos, tanta agua

Los patógenos entéricos comprenden tres grupos principales—virus, bacterias y protozoos. Cada grupo es altamente diverso con respecto a su tamaño y características físicas y químicas. Los métodos convencionales de detección para identificar la presencia de patógenos entéricos en agua potable a menudo no son adecuados para el monitoreo habitual debido a su alto costo, tiempos prolongados de procesamiento o sensibilidad inadecuada. La detección de sensibilidad de varios patógenos entéricos es necesaria para la salud y seguridad pública ya que basta un solo organismo infeccioso para causar enfermedad en los seres humanos.

Los métodos típicos de detección microbiana para evaluar las fuentes de agua potable comienzan con un paso de filtración o concentración dirigido hacia aislar concentraciones pequeñas de patógenos, es decir, de una a 10 unidades infecciosas, de grandes volúmenes de agua (de cientos a miles de litros). El desarrollo de un método universal de filtración adecuado para la concentración eficiente de virus, bacterias y protozoos ha sido un gran reto,² ya que los virus tienen un rango de tamaño de 20 a 250 nanómetros (.02 a .25 micras— μm), las bacterias de 0.2 a 5.0 μm , y los protozoos de 0.5 a 100 μm .

Los filtros de fibra huecos parecen ser la tecnología más prometedora para la concentración de una variedad de patógenos de una fuente de agua. Usando los principios de ultrafiltración, el pequeño tamaño de los poros

de los filtros de fibra huecos es utilizado para separar partículas coloidales de una corriente líquida en base a valores límite de peso molecular (MWCO*). Los valores típicos de MWCO varían entre 6,000 y 100,000 daltons. El flujo tangencial es utilizado para hacer pasar la muestra de agua sobre la superficie del filtro para prevenir el taponamiento por medio de partículas suspendidas en la solución retenida. El flujo es mantenido por cartuchos que giran, celdas de filtración dinámica o agitada, u otros tipos de sistemas. Una ventaja de esta circulación de flujo transversal, en comparación con un método de filtrado con flujo tortuoso, es que los microbios concentrados no son compactados y sujetos a la disecación como es el caso al usar filtros de profundidad convencionales.

El agua ha sido filtrada... ¿Y ahora qué?

La concentración de cientos de litros de agua en menos de 50 mililitros resulta a menudo en la acumulación de compuestos que impiden su detección por medio de metodologías posteriores, requiriendo procedimientos de purificación adicionales para aislar los patógenos de interés de la interferencia de fondo. El problema es que los esfuerzos adicionales por limpiar la muestra están invariablemente asociados a una pérdida del patógeno de interés. Los esfuerzos de purificación deberán ser cuidadosamente balanceados con las eficiencias absolutas de recuperación de patógenos.

Después de la filtración, existen una variedad de opciones para la detección de patógenos específicos, incluyendo metodologías de cultivo, microscopía, métodos inmunoquímicos y métodos moleculares. Cada cual tiene sus propias ventajas y desventajas particulares en relación a patógenos específicos. Los métodos de cultivo, por ejemplo, pueden ser apropiados para la detección de algunas bacterias, pero son muy costosos y toman mucho tiempo cuando se trata de analizar virus. No hay una sola línea de células que pueda usarse para todos los virus entéricos y algunos crecen muy lentamente (por ejemplo, HAV, astrovirus) o producen resultados dudosos en cultivos de laboratorio; otros ni

Para Saber Más

Agua y Bioterrorismo

El Programa de Verificación de Tecnología Ambiental (ETV*), el cual es supervisado por NSF Internacional para la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EE.UU. (USEPA, en inglés), está involucrado en establecer protocolos y evaluar dispositivos de tratamiento de agua de punto de uso y punto de entrada para su eficacia en reducir el terrorismo biológico potencial y los agentes químicos relacionados.

Para Saber más, consulte:
www.nsf.org/etv/ o www.epa.gov/etv/
Información adicional puede encontrarse en: <http://yosemite.epa.gov/oswer/ceppoweb.nsf/content/ct-publ.htm>

siquiera crecen. De igual manera, los patógenos protozoos y muchos patógenos bacterianos crecen lentamente y requieren un medio específico para crecer, haciendo de las técnicas de cultivo una técnica poco probable para un método universal de detección.

La microscopía se elimina rápidamente como un método para la detección de patógenos múltiples ya que los virus son demasiado pequeños como para ser vistos con microscopios normales, requiriendo el uso de microscopios de electrón especializados. Además, la microscopía no es adecuada para examinar un concentrado de agua para la presencia de un número reducido de organismos, ya que la interferencia de fondo haría que este método fuese tedioso para el monitoreo de patógenos.

Las metodologías inmunoquímicas han demostrado ser muy prometedoras para la purificación de microbios de interés sin interferencia de fondo. Estos inmunoensayos utilizan sitios receptores en la superficie de los microbios (antígenos) que se ligan a sitios receptores huéspedes (anticuerpos) para detectar posteriormente la presencia del microbio. Desafortunadamente, estos métodos no son lo suficientemente sensitivos como para proveer una detección directa de patógenos de muestras de agua potable, requiriendo un número mínimo de 10,000 microbios de interés para proveer una detección de confianza. Sin embargo, al ser combinados con métodos de cultivo, los inmunoensayos son útiles para la detección de patógenos que se reproducen lentamente y son difíciles de detectar. Además, este método puede ser automatizado y adecuado para una variedad de microbios, pero ha sido criticado debido a su incapacidad de distinguir entre organismos infecciosos y no infecciosos.

Un sistema universal

El mejor método para el monitoreo directo del agua potable para identificar patógenos proporcionaría una método no técnico, automático, y rápido para la detección, identificación, enumeración y caracterización del organismo de interés. Muchos científicos están de acuerdo en que un enfoque molecular es el más prometedor para el desarrollo de un sistema unificado para la detección de múltiples patógenos propagados a través del agua.²

A mediados de la década de los 80s, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR*) estaba ingresando en la escena microbiológica. PCR es un método de amplificación para la detección de microbios utilizando su ácido nucleico (secuencias de genes). Debido a que las secuencias de ácido nucleico son como

huellas digitales para un tipo particular de microbios, este método puede ser diseñado para detectar e identificar objetivos específicos. El método es muy sensible, detectando teóricamente una partícula singular infecciosa. El problema es que el método puede producir resultados falsos negativos debido a la presencia de compuestos inhibidores, o resultados falsos positivos, de no ser optimizado cuidadosamente. Además, los métodos moleculares pueden detectar organismos no infecciosos y poner en duda la importancia para la salud pública de un resultado positivo de PCR.

Dadas estas limitaciones, la investigación se ha enfocado anteriormente en la optimización de la reacción PCR para superar los efectos de los compuestos inhibidores. Asimismo, se crearon métodos para combinar metodologías de cultivo y moleculares. Por ejemplo, la detección de virus entéricos viables mejoró drásticamente con el uso combinado de enfoques de cultivo y moleculares. Al colocar virus en un cultivo de células mamarias por un período de tiempo limitado, toma lugar un paso de amplificación del cultivo que es posteriormente detectado por la metodología rápida y específica de PCR. El método completo puede llevarse a cabo en horas, y no semanas, como sería el caso con el uso de métodos convencionales de cultivo por sí solos.³

Aunque los nuevos métodos moleculares pueden ser problemáticos y pueden producir resultados dudosos relacionados con riesgos inciertos, estos sirven frecuentemente como herramienta rápida de selección a ser verificada más adelante con el uso de métodos tradicionales siempre que surge una duda. A pesar de sus limitaciones, los métodos de PCR han sido utilizados exitosamente para identificar el agente causante de brotes propagados a través del agua cuando no ha podido cultivarse ningún otro agente.

Un vistazo hacia adelante a los métodos

La meta de desarrollar métodos de detección de patógenos debe incluir un enfoque en línea, sensible. Métodos prometedores que utilizan automatización, detección en tiempo real y tecnología molecular han sido utilizados en ámbitos clínicos e industriales, y están siendo adaptados al monitoreo de muestras ambientales.

El método de microarreglos es un método molecular que se encuentra rápidamente en evolución y que parece tener aplicaciones para el monitoreo del agua. Al igual que PCR, esta

Muchos científicos están de acuerdo en que un enfoque molecular es el más prometedor para el desarrollo de un sistema unificado para la detección de múltiples patógenos...

tecnología está basada en el modelo de Watson y Crick de moléculas de ADN/ARN de doble hebra híbrida que se unen en un orden definido. Los microarreglos utilizan chips genéticos, es decir, sondas atadas a portaobjetos de vidrio o nylon. Cada casilla de un microarreglo tiene la intención de hibridarse a una secuencia de interés específica. Usando la robótica automatizada, decenas de miles de casillas pueden ser colocadas en un solo arreglo. Estas sondas de alta densidad pueden ser utilizadas para la detección de secuencias múltiples y han sido usadas para la detección directa de ARN sin un paso de amplificación de PCR. Los expertos están tratando de desarrollar esta tecnología con enfoques de monitoreo en tiempo real para una multitud de patógenos microbianos en el agua.

Quizás el mayor impulso para desarrollar un monitoreo y diagnóstico rápido de patógenos en el agua potable sea el potencial de eventos de terrorismo biológico (ver *Para Más Información*). Actualmente, un gran reto para responder a un ataque de terrorismo biológico es la manera de identificar cuándo ha sucedido un evento. Para hacer esto, el medio ambiente debe ser monitoreado habitualmente para determinar la presencia de una gran variedad de patógenos.

Investigaciones iniciales

Desde el reciente ataque de ántrax, el Servicio Postal de los EE.UU. inició investigaciones sobre la fabricación de un sistema de detección de peligros biológicos que identifique rápidamente los patógenos biológicos, por ejemplo, los sistemas GeneXpert de Cepheid. Estos sistemas están diseñados para detectar cantidades traza de ADN de ántrax y otros agentes propagados en el aire. Utilizando una tecnología de PCR de tiempo real e instrumentos de análisis automatizado, estos nuevos sistemas pueden detectar la presencia de un patógeno de interés en 30 minutos o menos.⁴

Se han desarrollado sistemas de PCR portátiles—por ejemplo, el “Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device” (Dispositivo Avanzado Robusto para Identificación de Patógenos) de Idaho Technology Inc.—que permiten el monitoreo directo de un sitio sin la necesidad de tener que recolectar y transportar muestras de vuelta al laboratorio. Esto ahorra tiempo valioso que

No se pierda entre la multitud....

Únase al pabellón de WQA/USA en **Aquatech 2004** Septiembre 28-Octubre 1, 2004.

Aquatech 2004 es el principal evento Europeo/Medio Oriente para exhibir sus productos y servicios.

Beneficios del Pabellón:

- Amplifica el mensaje de nuestra industria.
- Asegura que los asistentes encuentren su puesto de exhibición.
- Elimina la preocupación del manejo de fletes; WQA servirá como banco de liquidación.
- Hace sencillo para los asistentes poder encontrar su puesto de exhibición; se colocarán cartelones y letreros en lugares estratégicos para llamar la atención de los asistentes..

Inscríbese hoy mismo para reservar su puesto de exhibición. Los puestos serán asignados dándose preferencia a quien los solicite primero, así que ¡no se demore! Llame hoy mismo al +1 630 505 0160 para obtener más información.



Water Quality Association
International Headquarters and Laboratory
4151 Naperville Road
Lisle, Illinois 60532-3696 USA
Telephone 630 505 0160
Facsimile 630 505 9637
Web site www.wqa.org
Una organización sin fines de lucro

puede ser utilizado para responder a, y contener un evento de contaminación.

Un sistema de bajo costo, portátil, con "chip" de ADN también se encuentra siendo desarrollado a través del sistema BioDetect de Integrated Nano-Technologies. Enfocándose en posibles agentes de terrorismo biológico, tales como ántrax, viruela y SARS, este sistema puede proporcionar resultados precisos en minutos y es extremadamente liviano (12 libras). El sistema utiliza una tecnología de microchip para enfocarse en cientos de patógenos de manera simultánea.

Mientras que estos recientes avances tecnológicos son prometedores, no debe asumirse que las aplicaciones de tiempo real son a prueba de tontos. Aún hay varios problemas que deben ser resueltos, tales como las interferencias de fondo, señales falsas-positivas y falsas-negativas, y el asunto de la necesidad de pruebas en gran volumen, lo cual es un problema inherente en el análisis de agua potable, particularmente para los sistemas municipales.

Conclusión

Aunque se han desarrollado nuevos métodos moleculares para la detección de patógenos humanos en aguas potables y de manantial que superan los enfoques tradicionales, muchos de ellos aún no han sido

evaluados en la microbiología ambiental donde los componentes naturales pueden interferir con la eficacia y sensibilidad del método. El problema con tantos nuevos métodos es que, a pesar de ser mejores que los métodos convencionales, no son aceptados universalmente. Por lo tanto, su significado desde un punto de vista de análisis de riesgo, no se conoce. Para expandir la aceptación y aumentar el desarrollo de nuevas metodologías, deben seguir aplicándose métodos para reunir datos para ser utilizados en estudios de incidencia y exposición, al igual que en modelos de análisis de riesgo para que puedan desarrollarse protocolos de validación consistentes. El futuro promete ser interesante. □

* Por sus siglas en inglés.

Referencias

1. OMS/UNICEF, "Global water supply and sanitation assessment 2000 report," Water For People, 2000: www.water4people.org
2. Straub, T.M., y D.P. Chandler, "Towards a unified system for detecting waterborne pathogens," *Journal of Microbiological Methods*, 53: 185-197, 2003.
3. Reynolds, K.A., et al., "Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR

procedure," *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1424-1427, 1996.

4. Frederickson, R.M., "Building biohazard detectors," *Bio-IT World*, 2003: www.bio-itworld.com/archive/equipped/072103.html

Acerca de la autora

La Dra. Kelly A. Reynolds es una microbióloga y científica de investigación en la Universidad de Arizona. El enfoque de sus investigaciones es la elaboración de métodos rápidos para detectar virus patogénicos humanos en el agua potable. Ella posee una maestría de ciencias en salud pública (MSPH) de la Universidad del Sur de la Florida y un doctorado en microbiología de la Universidad de Arizona. La Dra. Reynolds también ha sido miembro del Comité de Revisión Técnica de WC&P desde 1997 y escribe la columna "On Tap" para WC&P. Este artículo apareció inicialmente en la edición de noviembre 2003 de WC&P.

