

# **ESTUDIO MICROBIOLOGICO DEL AGUA DE DIALISIS Y PERITONEODIALISIS**

**VII JORNADA DE LABORATORIO  
CLINICO  
14/11/08**

**Dra. Rossanna Camponovo  
Laboratorio Integramedica**

# Prevalencia en Chile de pacientes en Diálisis

MINISTERIO DE SALUD. *Guía Clínica Insuficiencia Renal Crónica Terminal*. 1st Ed. Santiago: Minsal, 2005.

## HEMODIALISIS

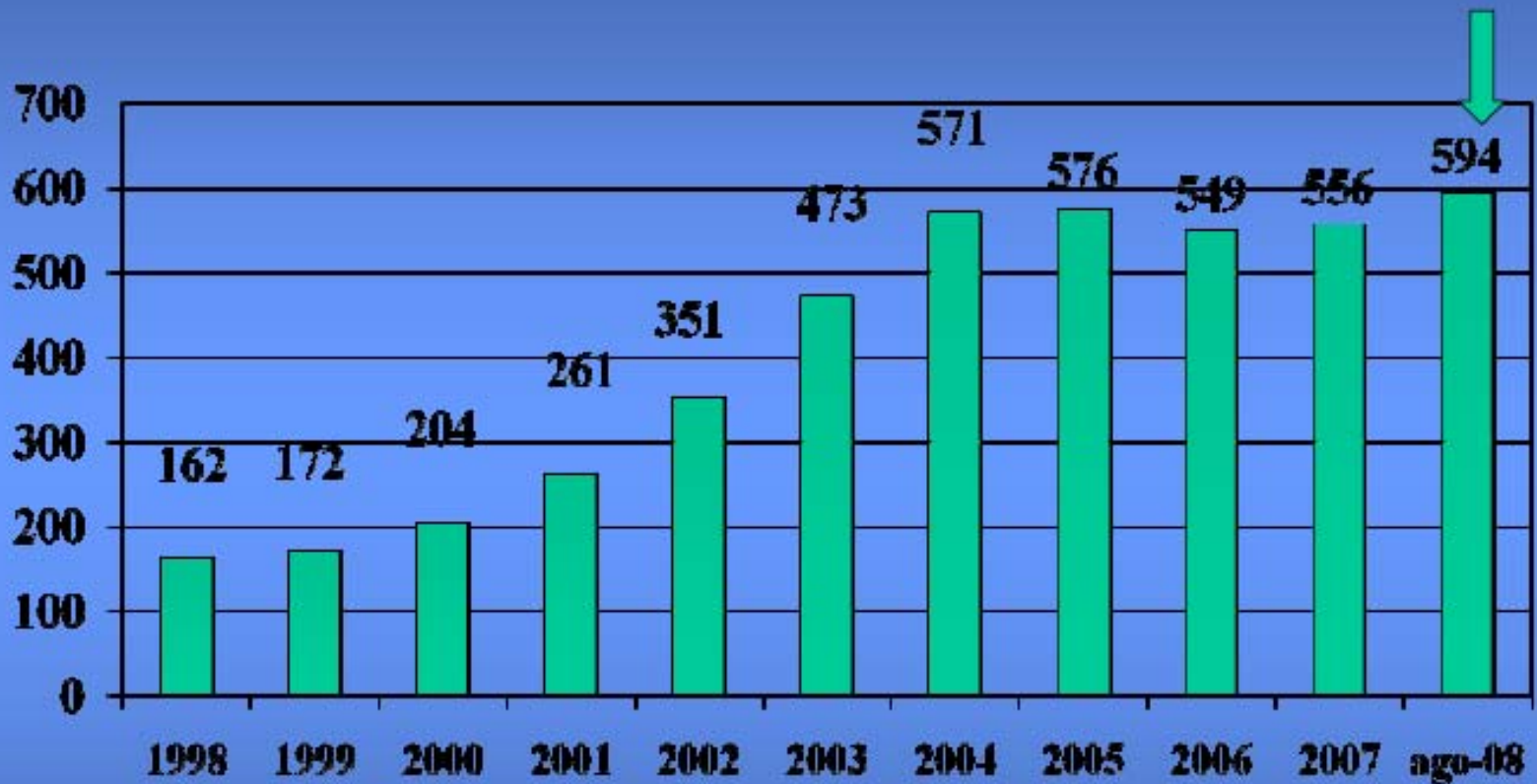
- En Agosto del 2003 la Prevalencia de pacientes en Hemodiálisis a través de los 175 centros en el país (Red pública y privada), fue de **9.139** personas, de éstas 884 reciben hemodiálisis en Hospitales Públicos, en 23 Servicios de Salud.
- Distribución Etárea:
  - 0 a 20 años: 1,7%
  - 21 a 40 años: 16,4%
  - 41 a 60 años: 35,9%
  - 61 a 80 años: 42,6%
  - > a 80 años: 3,4 %
- *Beneficiarios de FONASA 85 %*

## PERITONEODIALISIS

- La prevalencia de Peritoneodiálisis a igual fecha, fue de **427** pacientes, de éstos 76 casos corresponde a niños.
- La Red de prestadores Públicos y Privados para entregar esta modalidad de atención es de 42 centros, de los cuales 6 están en los Hospitales Públicos.

# PERITONEO DIALISIS

# PREVALENCIA



Número de pacientes adultos al 31 de Diciembre de cada año, excepto 2008

# PREVALENCIA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS EN DP



Número de pacientes pediátricos a Diciembre de cada año, excepto 2008

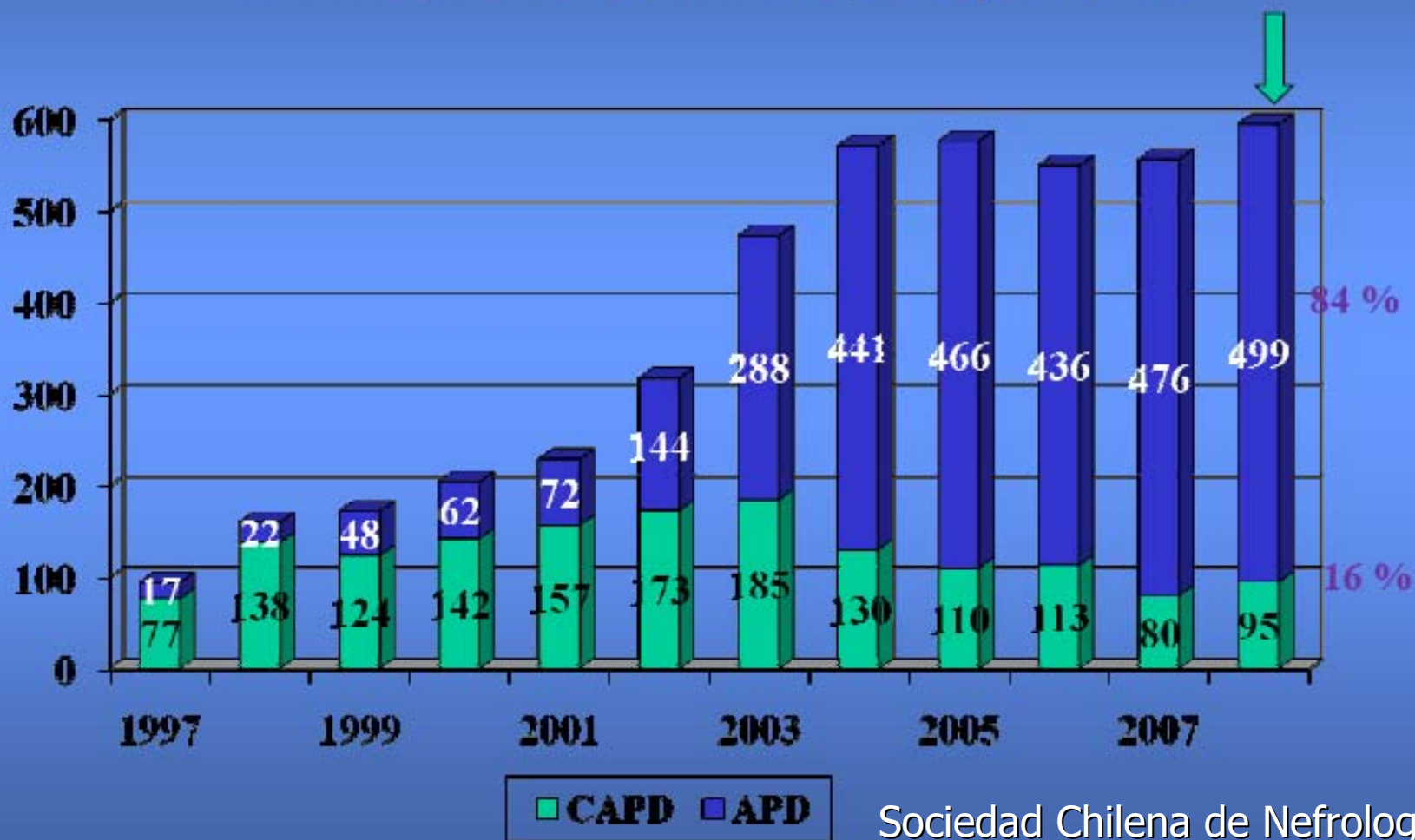
- La diálisis peritoneal trabaja con el principio de que la membrana peritoneal que rodea el intestino puede actuar como una membrana semipermeable natural.
- Se infunde líquido de diálisis especialmente formulado en la cavidad peritoneal y la membrana peritoneal funciona como membrana de diálisis

# Método de diálisis peritoneal ambulatoria

- Fluido de diálisis se infunde a peritoneo a través de un catéter permanente.
- En peritoneo hay 2 litros de liquido de diálisis todo el tiempo (limpieza de sangre constante)
- Tipos:
  - Dialisis peritoneal continua ambulatoria (Manual): CAPD
    - Fluido dializado es cambiado 4 veces al día
  - Diálisis peritoneal continua ciclada (automatizada): APD
    - Paciente se conecta a maquina cicladora durante la noche

# MODALIDADES DE DP

Adultos, al 31 de diciembre, excepto 2008

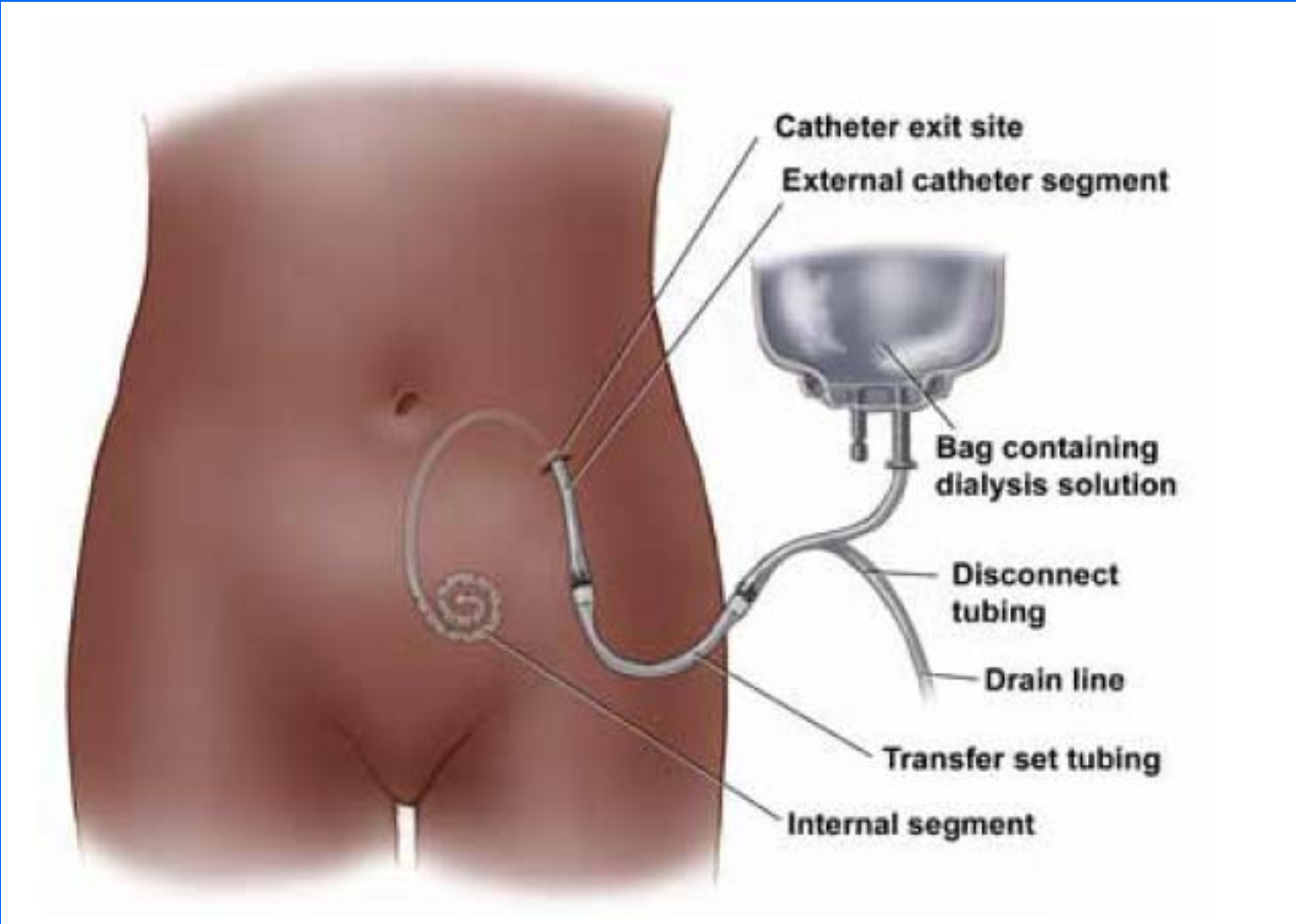


Sociedad Chilena de Nefrología



# TIPOS DE INFECCION

- Infección de orificio de salida
- Infección del túnel
- Peritonitis



## *Orificio de salida*

- *a) Profilaxis:*
  - Evaluación sistemática periódica: aspecto normal, , infección aguda.
  - Búsqueda de portadores nasales de *Staphylococcus aureus*.
- *b) Diagnóstico:*
  - Clínico: dolor, eritema, exudado, granuloma.
  - Microbiológico: tinción de Gram, cultivo, antibiograma.

## *Túnel*

- *a)* Diagnóstico:
  - Clínico: dolor, eritema, exudado, palpación dolorosa y/o fluctuación.
  - Microbiológico: tinción de Gram, cultivo, antibiograma.
  - Ecográfico: visualización de absceso.

Puede preceder a peritonitis

- ***Peritonitis***

- Complicación que contribuye al fracaso de la técnica → Hemodialisis
- Presenta morbilidad específica y mortalidad no despreciable,
- Afecta calidad de vida;
- Costo económico alto
- Principal causa de hospitalización

# INCIDENCIA DE PERITONITIS

- **Variable de centro a centro**
  - 1 episodio cada 24 meses paciente
  - 1 episodio cada 60 meses paciente

GES: 427 pacientes → 5124 meses paciente al año  
85 a 213 episodios de peritonitis al año GES  
Soc nefro 682 → 8184 meses paciente al año  
136 a 341 de peritonitis al año

# PREVENCION

- Manejo aséptico recambio de bolsa
- Técnica supervisada estrechamente por enfermera
- Portación de *S. aureus* nasal.

Aumenta la frecuencia de peritonitis

# DIAGNOSTICO

- Dolor abdominal
- Liquido turbio
- Recuento de leucocitos  $> 100 \text{ mm}_3$
  
- Fiebre
- Calofríos
- Nausea, vómitos , diarrea



# VIAS DE INFECCION

- **Microorganismos de la piel:**
  - Acceso por lumen cateter
  - Acceso por espacio periluminal
- **Microorganismos intestinales**
  - Vía transmural
- **Hematógena**
  - M tuberculosis
- **Vaginal ascendente**
  - Levaduras
- **Medioambiente**
  - *M. chelonae*, *S. maltophilia* y otras Pseudomonas

# ETIOLOGIA MICROBIOLOGICA DE PERITONITIS

- ORGANISMOS GRAM POSITIVOS 60 – 80%
- *Staphylococcus epidermidis* (Mas frecuente)
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus spp.*
- *Difteroides*
- ORGANISMOS GRAM NEGATIVOS 15 – 30%
- *E coli*
- *Klebsiella spp*
- *Enterobacter spp*
- *Proteus spp.*
- *Pseudomonas spp.*

# ETIOLOGIA MICROBIOLOGICA DE PERITONITIS (2)

- **MENOS FRECUENTES**
- *Acinetobacter spp*
- *Candida albicans*
- Bacterias anaerobias
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium atípicos*
- *Aspergillus fumigatus*
- *Nocardia asteroides*
- *Fusobacterium spp*

# PERITONITIS

episodio paciente año

	Nº	%
<b>Cultivo (-) 17,7 %</b>		
<b>Cultivo (+) 82,3 %</b>		
Cultivos (+)		
<i>Stapylococcus coagulasa (-)</i>	19	27 %
<i>Stapylococcus aureus</i>	23	32 %
<i>Streptococcus (salivaris, miti...)</i>	9	13 %
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	7 %
<i>Echerichia coli</i>	6	8 %
<i>Acinetobacter</i>	2	3 %
<i>Campilobacter</i>	2	3 %
<i>Klebsiella</i>	2	3 %
	3 (1)	4 % <i>Candida</i>
	1 + 3	4 % Polimicrobiano

2007

# ESTUDIO MICROBIOLÓGICO PERITONEO DIALISIS

# COLECCIÓN Y TRANSPORTE

- Colección
  - Bolsa con liquido que este a lo menos 2 horas en abdomen
- Transporte
  - Colocar bolsa de dializado en bolsa grande plástica y llevarla dentro de un contenedor al laboratorio
  - Transportar a temperatura ambiente dentro de 1 hora a laboratorio
  - Si el tiempo de transporte es mayor a 1 hora se debe refrigerar. No congelar

# PREPARACION DE LA MUESTRA

1. Mezclar contenido de bolsa invirtiéndola 10 a 20 veces
2. Desinfectar la entrada con povidona yodada. Dejar secar
3. Tomar 5ml de liquido en tubo tapa roja para recuento celular
4. Tomar 100 ml de liquido y colocar en 2 tubos de centrifuga de 50 ml. Centrifugar por 15 minutos a 3000 x g
5. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante de cada tubo
6. Realizar Tinción de Gram del sedimento
7. Vortear y resuspender el sedimento con 5 ml de suero fisiológico estéril para cultivo
8. Guardar sedimento resuspendido de 2do tubo en refrigerador por 5 días (por solicitud de cultivo en diferido o necesidad de resiembra)

# PROCESAMIENTO MUESTRA

- **EXAMEN MICROSCOPICO**
  - 1. Tinción de Gram
  - 2.- Tinción de Z. Neelsen (optativo)
- **CULTIVO**
  - **Cultivo bacteriano**
    - Corriente
    - Anaerobio (excepcional)
  - **Cultivo Micobacterias y hongos**
    - Paralelo
    - Diferido



# EXAMEN MICROSCOPICO

## ● 1. Tinción de Gram

- Se prepara a partir del sedimento
- Si se detecta microorganismo se debe informar inmediatamente
  - Positividad: 9 al 40% de los episodios → predice etiología en el 85%
  - Aun cuando su positividad es baja sigue siendo útil en el apoyo de terapia inicial

# EXAMEN MICROSCOPICO

- 2. Tinción de Zeehl Neelsen
  - Se prepara a partir del sedimento
  - Su utilidad es muy limitada para predecir peritonitis por *Mycobacterieum sp*
  - Peritonitis tuberculosa es una muy rara complicación
  - Mycobacterias no tuberculosas han sido asociadas a peritonitis (*M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*)

# CULTIVO

## 1. Bacterias

- Placas: Agar sangre, Agar chocolate, Agar Mc Conkey
  - ❖ 1 gota de sedimento en cada placa
  - ❖ Incubar 5% CO<sub>2</sub> a 35°C por 48 horas
- Caldo: Frasco de hemocultivo
  - ❖ 5 ml de sedimento. Incubar por 5 a 7 días

## 2. Micobacterias y Hongo

- Sembrar de inmediato si a las tinciones se observaron elementos sugerentes. A 2 temperaturas
- **En DIFERIDO:** El sedimento es guardado refrigerado por 5 días. Si cultivo bacteriano es negativo y el paciente no responde a terapia puede ser solicitado por medico

# ¿COMO SE HA MEJORADO LA SENSIBILIDAD?

- **Volumen adecuado**
- **Concentración de microorganismos**
- **Dilución o remoción de antibióticos presentes**
- **Lisis de células para liberar microorganismos intracelulares**
- **Paralelo o diferido cultivo para bacteria, hongos y micobacterias**

# INTERPRETACION CULTIVO POSITIVO

- **Descartar contaminación**
  - Los microorganismos de la piel son la causa mas frecuente
  - La enfermedad se caracteriza por bajo nivel de microorganismos ( $< 1/\text{ml}$ )
- **Cuantificación:**
  - Cualquier recuento puede ser significativo
    - Informar semicuantitativo en placa
    - No informar recuento y colocar nota cuando solo hemocultivo es positivo

# INTERPRETACION CULTIVO POSITIVO

- **Correlación clínica:**
  - Líquido turbio y recuento  $>$  a 100 cel/ml
  - Peritonitis bacteriana: Predominio neutrófilo
  - Peritonitis por micobacterias: Predominio mononuclear (lo mas frecuente)
  - Respuesta clínica

# CULTIVO NEGATIVO

Se da en un 20% aprox.

- **Efecto de dilución**

El gran volumen de dializado puede disminuir la concentración a niveles bajo los límites de detección del método

- **Substancias inhibitorias**

Presencia de antibióticos

Secuestro por células fagocíticas

Factores del huésped

- **Microorganismos con factores de crecimiento exigentes**

# CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA EN HEMODIALISIS



# REQUERIMIENTO DE AGUA DE EXELENTE CALIDAD

Hemodialisis utiliza membranas actualmente mas permeables  
Hemodialisis de alto flujo (<6 lt a 15 a 30 lt)

Paciente sometido a hemodiálisis tiene riesgo de:

- Desarrollar reacción a pirógeno mediada por endotoxinas
- Sepsis con bacteremia a gram negativo
- Síndrome de respuesta inflamatoria crónica
  - Relacionados a contaminación con bacilos gram negativos de agua y dialisado

# EFECTO DE LA ACTIVACION DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

- Alteraciones de la respuesta inmunitaria
- Amiloidosis asociada a diálisis
- Disminución a la respuesta a eritropoyetina
- Arteriosclerosis
- Debilidad muscular
- Pérdida de masa ósea

# ORIGEN DE PUNTOS DE CORTES

## Liquido de diálisis (post)

Favero en 1975 demuestra una directa relación entre reacción a pirogenos y numero de microorganismos presentes en liquido de diálisis

<2000 UFC/ml

## AGUA (PRE)

Se decide 1 log menos

< 200 UFC/ml

	AGUA UFC/ML	ENDOTOXI NA UE/ml	DIALISADOUF UFC/ML	ENDOTOXINA UE/ml
ANSI/AAMI RD5-1982	200	NE	2000	NE (5 REUSO)
ANSI/AAMI RD5-1992	<b>200</b>	<b>NE</b>	<b>2000</b>	<b>NE</b>
ANSI/AAMI RD52-2004 Diálisis convencional	200 (50) acción	2 (1) acción	200 (50) acción	2 (1) acción
ANSI/AAMI RD52-2004 Dialisado ultrapuro	0.1 ufc/ml	<0.03	0.1 ufc/ml	<0.03
FARMACOPEA EUROPEA	100	0.25	100	0.25

AAMI: Association for the Advancement of Medical Instrumentation

ANSI: American National Standards Institutes

# CULTIVO

## DIALISIS AMERICANA v/s EUROPEA

	AMERICANA	EUROPEA
RECUENTO AGUA Y DIALIZADO (CONVENCIONAL)	200 (ACCION 50)	100
MEDIO CULTIVO	TSA	R2A TGEA
TIEMPO INCUBACION	48 HRS	5 A 7 DIAS
Tº INCUBACION	35°C	22 °C

# COMPARACION MEDIOS DE CULTIVO

## R2A (gr/L)

Extracto levadura	0.5
Peptona	0.5
Hidrolizado ac de caseina	0.5
Dextrosa	0.5
Almidón soluble	0.5
Fosfato di potasico	0.3
Sulfato de magnesio	0.024
Piruvato de sodio	0.3
Agar	15

## Agar tripticasa de soya (gr/l)

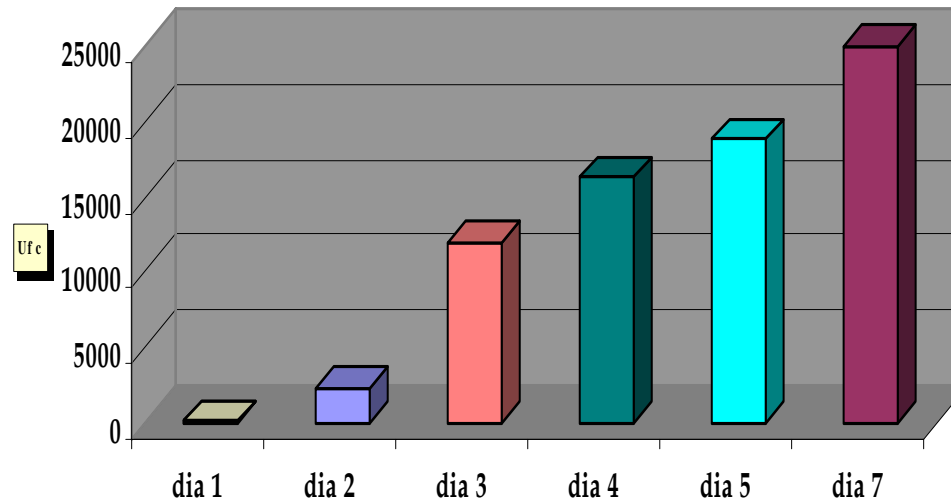
Caseina pancratica	15
Digerido papainico soya	5
NaCl	5
Agar	15

## TGEA (gr/l)

Caseina pancreatica	5
Extracto de carne	3
Dextrosa	1
Agar	15

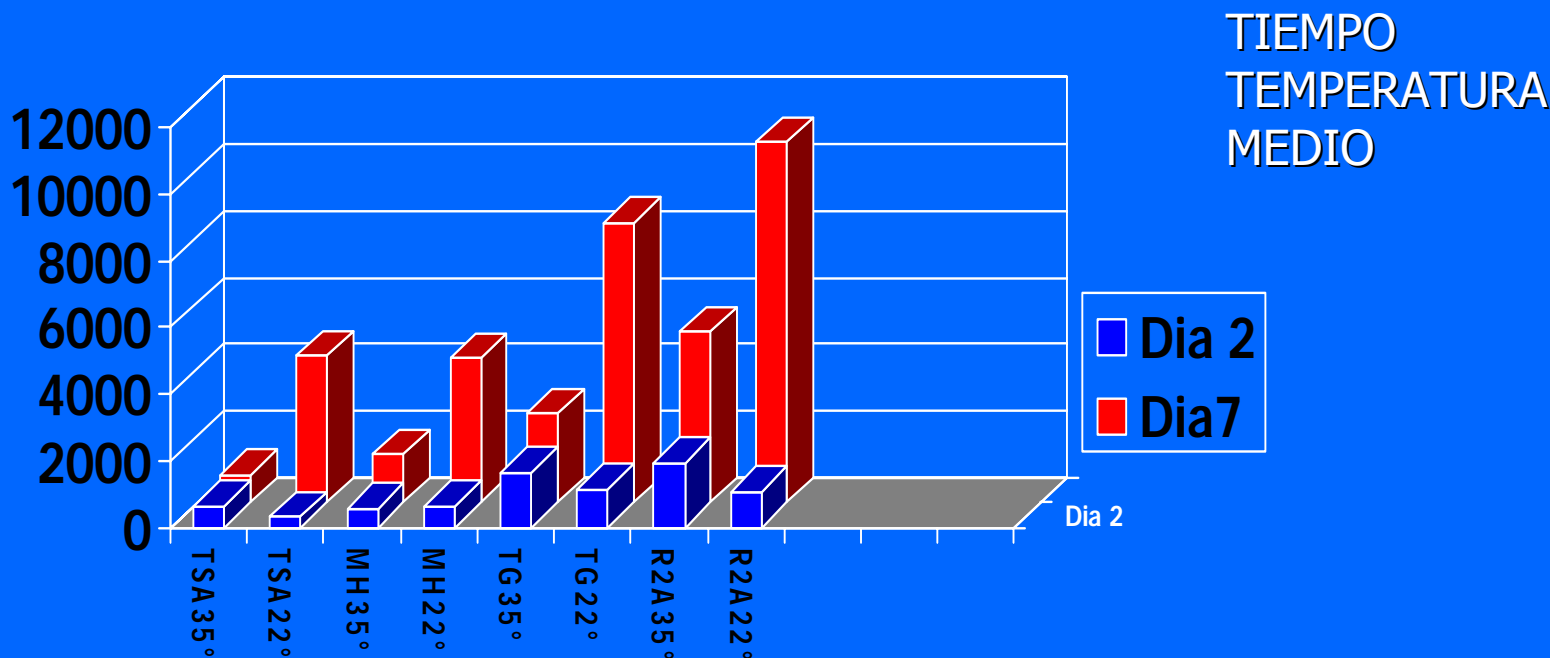
# SUMATORIA DE UFC/ML DE 18 AGUAS SEMBRADAS EN 4 MEDIOS A 35°C Y 22°C

Progresión del N° de UFCs según día de cultivo.



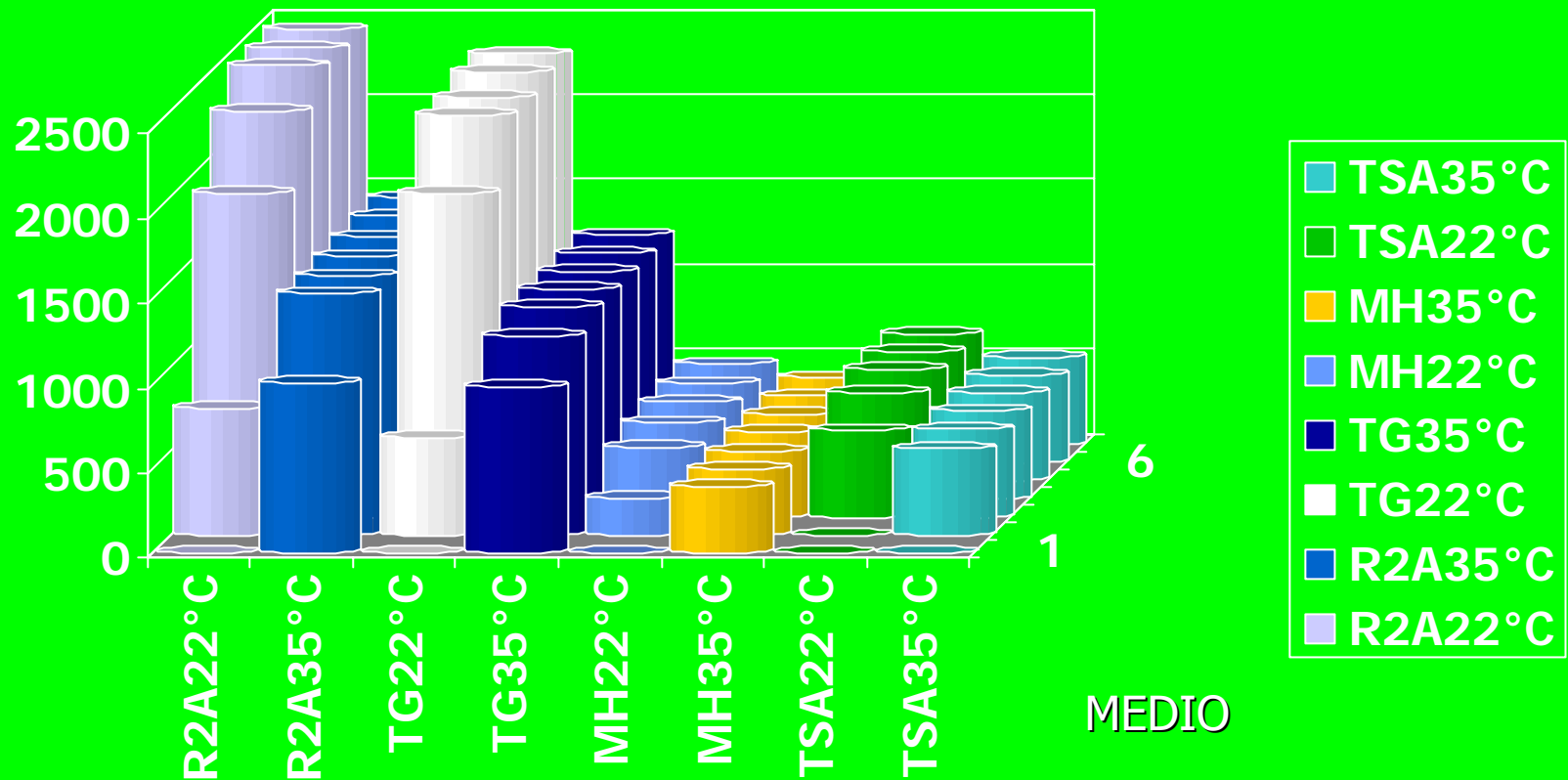
TIEMPO

# COMPARACION DE RECUENTO DE UFC/ML DE 18 AGUAS A LOS 2 Y 7 DIAS DE INCUBACION SEMBRADAS EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO A 35°C Y 22°C

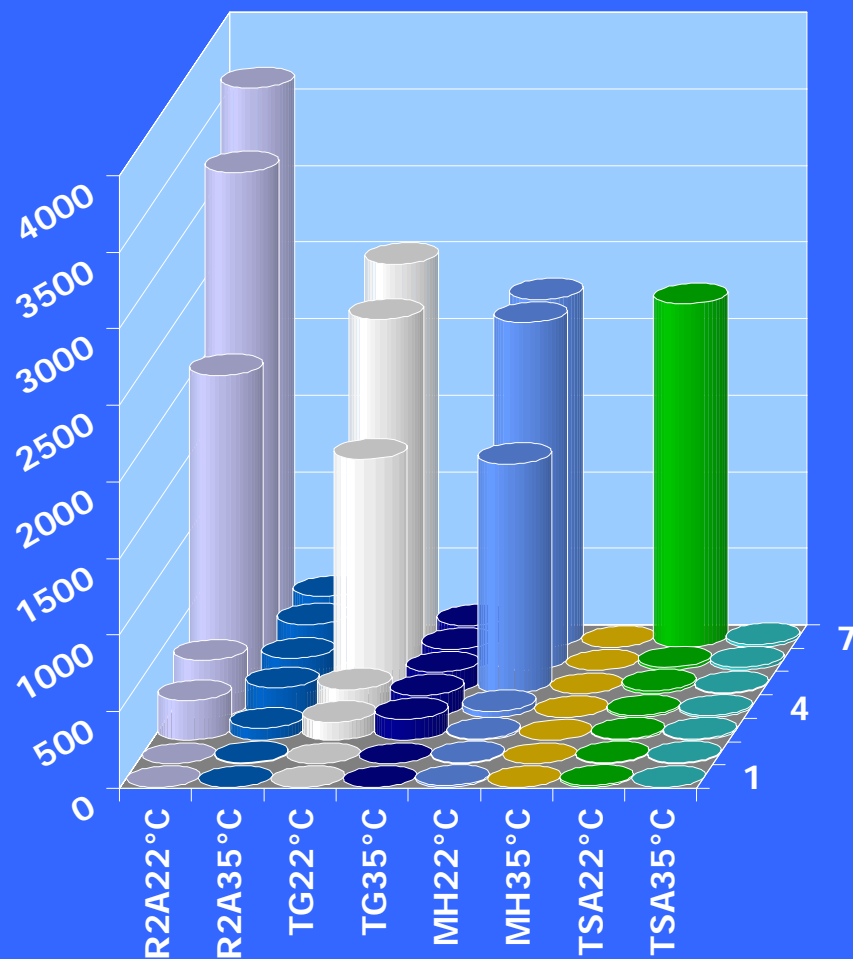




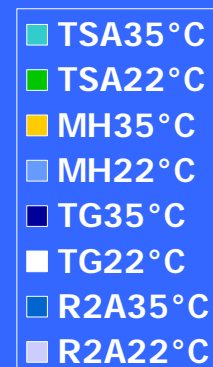
# CULTIVO DE AGUA DE POST TRATAMIENTO SEMBRADA EN 4 MEDIOS A 35°C Y 22°C



# CULTIVO DE AGUA DE PRE TRATAMIENTO SEMBRADA EN 4 MEDIOS A 35°C Y 22°C



TIEMPO Y T° BAJA



# CULTIVO AGUA HEMODIALISIS



# REGLAMENTOS SOBRE CENTROS DE DIALISIS

Ministerio de Salud Septiembre 1994

## ARTICULO 11. PUNTO 5

### Controles microbiológicos

Debe hacerse, a lo menos, semestralmente

El recuento bacteriológico no deberá ser mayor de **200 ufc/ml** en al agua tratada, tomada la muestra en la llave de alimentación de las maquinas y no mayor de **2000 ufc/ml** en el liquido de diálisis, después del dializador, al final de la hemodialisis".

#### -No especifica

Número y forma de tomar

Medios de cultivo ni tiempo de incubación

Acciones a tomar

#### -No incluye

Endotoxinas

# PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO

Clinical Microbiology Procedures Handbook  
Henry D. Isenberg  
Second Edition 2004  
ASM

# FRECUENCIA Y MOMENTO

## NORMA AMERICANA

- **Rutina** (sin problemas de contaminación ni infección)  
Recolectar muestra al menos mensualmente
- **Repetición**  
Cuando cultivo excede estándares establecidos  
Recultivar semanalmente hasta obtener resultados aceptables
- **Ad Hoc**  
Cuando se sospecha reacción a pirogenos y/o complicaciones septicás
- **Momento**  
Tomar muestras siempre antes de sanitización/desinfección de sistema tratamiento de agua y máquinas de diálisis  
Si sistema fue desinfectado debe hacer "flush" del sistema completo hasta que desinfectante residual no se detecte y luego tomar muestra

# Toma de muestra

## RECOLECCION

- **Agua de diálisis**
  - 1.-Punto inmediatamente posterior a sistema de tratamiento de agua. Ej
    - Sistema osmosis reversa
    - Unidades deionización y otros
  - 2.- Estanque de almacenamiento (si es usado)
  - 3.- Muestra justo antes de entrada maquina de diálisis o **proporcionador central**
- **Dializado**

Salida de maquina de diálisis

Al menos 2 maquinas al mes. Todas las maquinas testeadas a lo largo año

## VOLUMEN:

Tomar un minimo de 50 ml. (hacer "flush" de 60 seg previo)  
Si procesa endotoxina debe ser contenedor libre de endotoxina

## TRANSPORTE

- Temperatura ambiente: 30 minutos
- Refrigerado a 4°C : 24 horas

# ANSI/AAMI RD 52-2004

- Cultivo de agua mensualmente
- Tomar de varios lugares del sistema pre dialisis
- Monitoreo semanal en equipos nuevos hasta establecer un patrón
- Si realiza métodos de cultivo interno debe tomar muestra en duplicado y enviar a laboratorio externo como CONTROL CALIDAD
- Cultivo de dialisado debe ser de al menos 2 maquinas por mes, cada maquina debe ser testeada a lo menos 1 vez año
- Si crecimiento de cultivo sobrepasa estándares se debe cultivar semanalmente hasta obtener resultados adecuados



# CULTIVO

## SIEMBRA

-Mezclar agua agitando o con vortex

-Sembrar: TSA (R2A o TGEA)

0.1 y 1 ml en centro de cada placa,

10 ul (3ra placa en dializado)

Diseminar con varilla plástica estéril en L

## INCUBACION

- 35°C por 48 hrs

( 7 días a temperatura ambiente (22°C a 24°C)

- Nota: Dializado con ultrafiltración 0.5 - 1 Lt de muestra sembrado con método filtración de membrana

# INFORME

- **RECUENTO DE COLONIAS**

0.01 ml (10 ul) → N° x 100 (UFC/ML)

0.1 ML → N° x 10 (ufc/ml)

1 ml → N° (ufc/ml)

- **IDENTIFICACION**

No requerida

Guardar cepa por si requiere identificación y antibiograma

# ENDOTOXINA

## Norma Americana

Agua de diálisis y dializado:

2UE/ml. Acción con 1 U/ml

**Norma Europea:** 0.25 UE/ml

Agua de diálisis y dializado: 0.25 UE/ml

Dializado ultrapuro: <0.03 UE/ml

# TEST ENDOTOXINA BACTERIANA

**Limulus ameocyte lysate**

**LAL**

Son LPS componentes de la membrana externa de bacterias gram negativa

- Componente toxico : Lipido A
- Polisacarido : soluble en agua

**Contribuye al Síndrome de respuesta inflamatoria crónica**

El uso de LAL para la deteccion de endotoxina se baso en la observacion que en la infección por bacterias gram negativas del cangrejo en Herradura (*Limulus polyphemus*) se produce una *coagulación intravascular fatal producto de una reacción enzimática catalizada por endotoxina*

*Limulus polyphemus*  
(Cangrejo en herradura)



# Limulus amoebocyte lysate (LAL)

Extracto acuoso de la células de la sangre (amebocitos) provenientes del cangrejo reacciona con las endotoxinas

Desarrollo de varios test: (cualitativos o cuantitativos)

- Gel-clot
- Turbidimetrico
- Cromogenico

**Sensibilidad recomendada: 0.03 UI/ml**

# Toma de muestra para endotoxina

- Contenedor libre de endotoxina  
Si es vidrio: Esterilizar a 180°C por 4 horas
- pH de la muestra: 6.0 a 7.5
- Conservación: 2 a 8°C por 24 hrs → -20°C

# Gel-clot (coagulo)

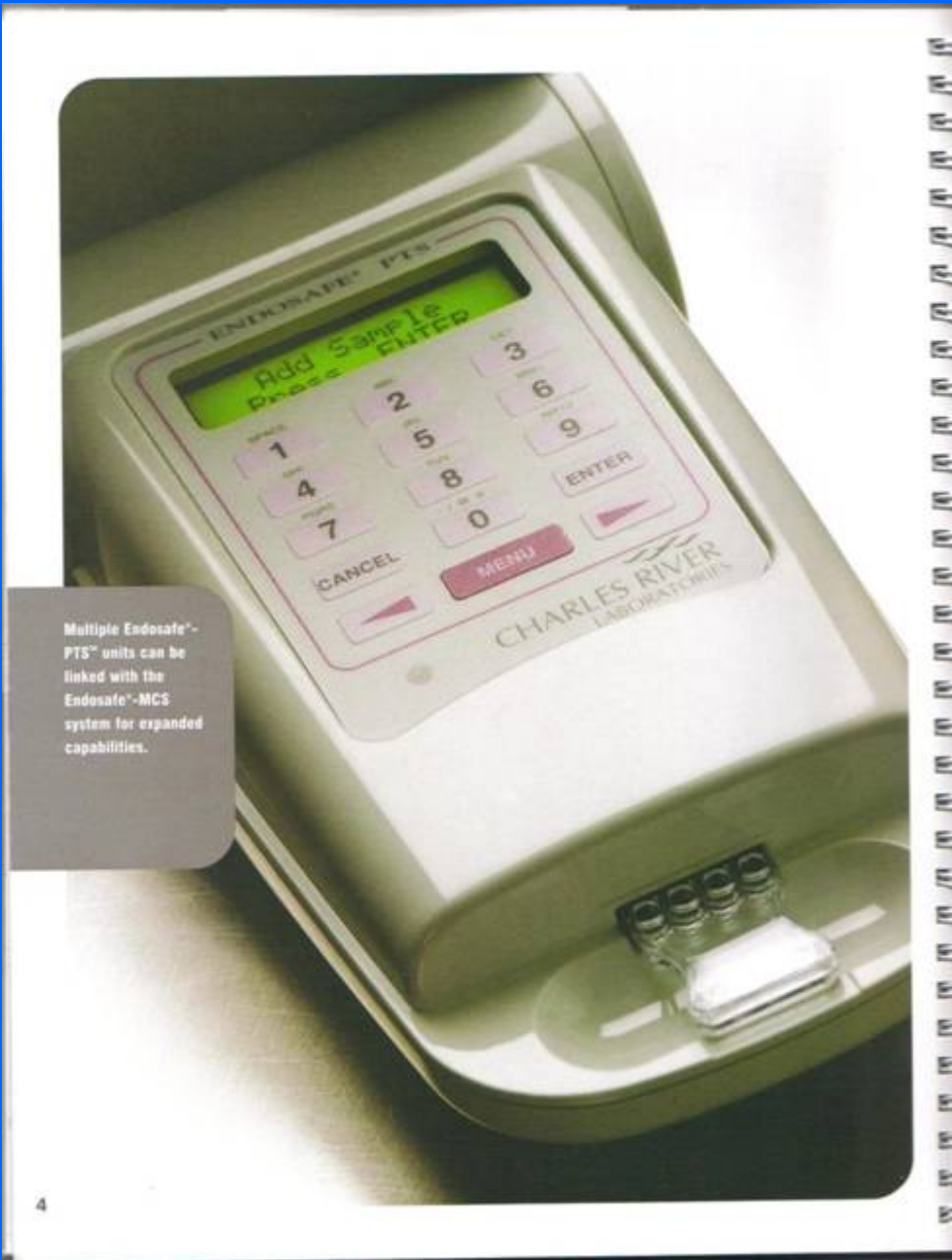
- Tubo trae un liofilizado de LAL el que se hidrata con la muestra por 1 minuto
- Se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 60 minutos  $\pm 2$
- Si es positivo se forma un coagulo que permanece integro al fondo del tubo al ser invertido.
- La concentración será igual o superior a la sensibilidad del test.  $E_j \geq 0.25$



# Gel-clot (coagulo)

- Requiere :
  - Control positivo
  - Control negativo
  - Control de inhibicion de la prueba
    - (Control positivo + muestra)
  - La muestra en duplicado

Agradecimiento:  
Sra Victoria Leyton  
Sub Gerente de area  
Agua y riles DICTUC  
d



Multiple Endosafe<sup>®</sup>-PTS<sup>®</sup> units can be linked with the Endosafe<sup>®</sup>-MCS system for expanded capabilities.

## METODO CROMOGENICO CUANTITATIVO

Portable

Simple

Adiciona 25 ul de la muestra en 4 canales

Resultado en 15 minutos

Detecta entre

0.05-5 UL/ml

0.1 -10 UL/ml

# LIMITACIONES

- Requiere de un ph optimo
- Muestras que inhiban LAL
- Componentes metales, surfactantes, carga ionica alta pueden dar falsos + o -
- Muestras que contiene sustancias que reaccionan con reactivo de LAL (celulosa)
- Resultados discordantes entre cultivo y endotoxinas