

Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas

Immunological methods for the quick identification of bacteria and protozoa in water

MSc. Hermes Fundora Hernández,^I MSc. Yamila Puig Peña,^{II} MSc. Sergio Chiroles Rubalcaba,^I MSc. Andrea María Rodríguez Bertheau,^I MSc. Juan Gallardo Díaz,^{III} MSc. Yoslane Milián Samper^I

^I Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba.

^{II} Instituto Nacional de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba.

^{III} Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Entre las enfermedades relacionadas con el agua según su uso se encuentran las causadas por sustancias químicas y por agentes biológicos. Dentro de estas últimas, las ocasionadas por bacterias y protozoarios patógenos incrementan cada día la lista de enfermedades emergentes y reemergentes. Los métodos de ensayo para la determinación de microorganismos patógenos en el agua no han variado mucho en los últimos años, principalmente para los indicadores bacterianos de contaminación fecal, y por lo general se realizan por métodos convencionales. Sin embargo, existen situaciones, sobre todo en la aparición de brotes de enfermedades, en las que se hace necesario detectar el microorganismo patógeno en agua como posible agente causal, por lo que se ha recomendado el uso de métodos rápidos y confiables. Dentro de estos se encuentran los inmunoensayos, de los cuales los métodos por precipitación y aglutinación, los enzimoimmunoensayos, las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta y la citometría de flujo son muy útiles en la detección de microorganismos en agua. Mención aparte merece la separación inmunomagnética o inmunocaptura como paso previo a otras técnicas avanzadas. Nos proponemos con este trabajo exponer las ventajas y desventajas de estos métodos, los principios en los cuales se basan y ejemplificar algunos de los más utilizados en microbiología de aguas, así como recalcar su importancia.

Palabras clave: inmunoensayos, bacterias, protozoarios, agua, microbiología de aguas, identificación rápida.

ABSTRACT

Diseases related to the use of water may be caused by chemical substances or biological agents. Among the latter, a prominent role is played by pathogenic bacteria and protozoa, which constantly add to the list of emerging and re-emerging diseases. Assay methods to identify pathogenic microorganisms in water have not changed much in recent years, particularly with respect to bacterial indicators of fecal contamination, and tests are usually conducted by conventional methods. However, in certain situations, especially when a disease outbreak occurs, it is necessary to determine what pathogenic microorganism is the possible causal agent, and quick, reliable methods have been recommended to achieve this aim. These include immunoassays, among which precipitation and agglutination methods, enzyme immunoassays, direct and indirect immunofluorescence techniques and flow cytometry have proven very useful to detect microorganisms in water. Special mention should be made of immunomagnetic separation or immunocapture as a step preceding other advanced techniques. The present paper is aimed at presenting the advantages and disadvantages of these methods, as well as the principles on which they are based. Examples are provided of the methods most commonly used in water microbiology, highlighting their importance.

Key words: immunoassays, bacteria, protozoa, water, water microbiology, quick identification.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades relacionadas con el agua según su uso se encuentran las causadas por sustancias químicas y por agentes biológicos. Dentro de estas últimas se hallan las causadas por bacterias y protozoarios patógenos, las cuales cada día incrementan la lista de enfermedades emergentes y reemergentes.¹⁻³ Entre los principales microorganismos patógenos asociados a enfermedades de transmisión hídrica por ingestión o contacto con el agua existe un importante grupo de protozoarios y bacterias. *Havelaar* y otros destacan: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y Amebas de vida libre. El mismo grupo de trabajo destaca entre las bacterias a *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Yersinia* spp., *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* spp., micobacterias no tuberculosas, *Burkholderia pseudomallei*, *Legionella pneumophila* y *Leptospira* spp.²

Los métodos de ensayo para la determinación de microorganismos patógenos en el agua no han variado mucho en los últimos años según *Havelaar* y otros, principalmente para los indicadores bacterianos de contaminación fecal,² y por lo general se realizan por métodos convencionales.^{4,5}

Sin embargo, existen situaciones, sobre todo en la aparición de brotes de enfermedades, en las que se hace necesario detectar el microorganismo patógeno en agua como posible agente causal, por lo que se ha recomendado el uso de métodos más rápidos y confiables.⁴

Los métodos automatizados en microbiología de aguas requieren un tiempo reducido para la obtención de los resultados en comparación con los métodos convencionales; son fáciles de usar, precisos y económicamente rentables.⁶ Dichos métodos constituyen un área dinámica en la microbiología aplicada que estudia el desarrollo de procedimientos de aislamiento, caracterización y enumeración de microorganismos y sus productos en muestras clínicas, de alimentos, industriales y ambientales.⁷

Las pruebas microbiológicas rápidas actualmente desarrolladas ofrecen detección, identificación o enumeración de microorganismos en tiempos más cortos y llevando a efecto metodologías mucho más sencillas, comparadas con las tradicionalmente utilizadas. Con este tipo de tecnología es posible optimizar los recursos disponibles, pues se requiere de mucho menos material de laboratorio y menos número de personal técnico, lo que trae como resultado una mayor productividad.⁸

Las pruebas rápidas que se han desarrollado se han basado en métodos bioquímicos y enzimáticos, reducción de colorantes, reconocimiento de ácido nucleico, inmunoensayos, filtración por membrana e impedancia.⁹ El objetivo de este trabajo es exponer las ventajas y desventajas de los inmunoensayos utilizados con estos fines, los principios en los cuales se basan y ejemplificar algunos de los más utilizados en microbiología sanitaria.

VENTAJAS DE LOS MÉTODOS RÁPIDOS

Dentro de las ventajas de este tipo de método se encuentran la posibilidad de liberar lotes rápidamente, ahorro del costo financiero, importante disminución del trabajo manual, racionalización del recurso humano, utilización de equipos semiautomáticos o automáticos, facilidad en la ejecución de los ensayos, análisis de cantidades importantes de muestras, gran contribución en momentos de crisis, menor uso de espacios en los depósitos o almacenes, fácil eliminación de residuos biológicos, aumento en la velocidad de los análisis y en la entrega de los resultados, se dispone de paquetes sensibles, precisos y con buen límite de detección, y optimización de recursos por miniaturización.¹⁰ además, poseen mayor sensibilidad y especificidad y facilitan la determinación de factores de virulencia, según experiencias de nuestro grupo de trabajo.

DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS RÁPIDOS

Dentro de las desventajas de estos métodos se puede mencionar que aún son utilizados para confirmar los resultados positivos de microorganismos patógenos, la necesidad de enriquecer el analito que se busca antes de detectarlo, no siempre se trata de métodos flexibles, la falta de disponibilidad regular de los paquetes en el mercado y que algunos de estos métodos también detectan los microorganismos muertos.¹⁰ A través de estos métodos no se obtienen aislamientos para estudios posteriores. En ocasiones estos no son los que se encuentran recogidos en las normas internacionales. Las concentraciones de antígenos en las muestras no siempre son detectables. Se trata por lo general de métodos cualitativos, por lo que no es posible correlacionar el resultado con la intensidad de la contaminación. En el caso de las técnicas de fluorescencia hay sustratos del medio ambiente que pueden emitir fluorescencia, según experiencias de nuestro grupo de trabajo. En estos casos es preciso definir la morfología del microorganismo, lo cual depende de la experiencia del operador.

MÉTODOS DE INMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos se definen como aquellas técnicas cuyo principio se basa en la interacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac). La unión Ag-Ac es un proceso reversible en el que están involucradas interacciones no covalentes.^{11,12} Dentro de los inmunoensayos de importancia en la detección de microorganismos en aguas se encuentran los métodos de interacción secundaria: precipitación y aglutinación; y los métodos de interacción primaria: los enzimoimmunoensayos, las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta y la citometría de flujo.⁷ Si bien la interacción primaria Ag-Ac no siempre es visible, existen distintos métodos que hacen posible visualizarla.^{11,12} La estrategia consiste en marcar el Ac o el Ag mediante la unión covalente (conjugación) de determinadas moléculas, tales como fluorocromos, isótopos radiactivos y enzimas, o sencillamente partículas inertes como el látex, para poder hacer visible esa primera interacción. Dependiendo del marcador que se emplee, la técnica inmunológica recibe un determinado nombre y utiliza un sistema de detección diferente. Estas técnicas son muy sensibles, por lo que son capaces de detectar bajas concentraciones de antígenos o anticuerpos.^{11,12}

Existen inmunoensayos de uso más rutinario como son: precipitación, los métodos de aglutinación y los métodos de látex. Por otra parte, se encuentran técnicas más sensibles, específicas y con posibilidad de automatización y uso de equipos: inmunoensayos ligados a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia y citometría de flujo.¹¹ En la tabla se pueden apreciar algunas características de los inmunoensayos más frecuentemente utilizados en los estudios microbiológicos.

Tabla: Inmunoensayos utilizados con frecuencia en microbiología de aguas

Método	Precipitación	Aglutinación	ELISA	Inmunofluorescencia	Citometría de flujo
Principio inmunológico	Reacción Ag-Ac	Reacción Ag-Ac	Reacción Ag-Ac	Reacción Ag-Ac	Reacción Ag-Ac
Uso de equipos para detectar la señal	No	No	Espectrofotómetro (lector de placas de ELISA)	Microscopio de fluorescencia	Citómetro de flujo
Ejemplos de su utilidad en microbiología de aguas	No	<i>Salmonella</i> spp. <i>Vibrio cholerae</i> <i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp <i>Escherichia coli</i> enterotoxinas estafilocóccicas <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Campylobacter</i> cianotoxinas verotoxinas	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Leptospira</i> spp. <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Giardia lamblia</i>	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>
Interacción primaria o secundaria	Interacción secundaria	Interacción secundaria	Interacción primaria	Interacción primaria	Interacción primaria

Fuente: Laboratorio de Inmunología-Bioquímica Aplicadas, del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología.

Los ELISA utilizan como marcador una enzima y el espectrofotómetro como sistema de detección devenido lector de microplacas.¹³ Por su parte, las técnicas de inmunofluorescencia utilizan como marcador un fluorocromo y necesitan como sistema de detección el microscopio de fluorescencia.¹⁴ La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se les hace pasar a través de un

rayo de luz. Para su análisis, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido. Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este y causan dispersión de la luz. Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de estas.

Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se colocan las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, se pueden evaluar cuáles células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados. Se usa como sistema de detección el citómetro de flujo. El uso de moléculas fluorescentes diferentes con distintos colores permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea.¹⁵

Los métodos inmunológicos son ampliamente utilizados en la detección de patógenos en áreas clínicas, agrícolas y ambientales. Según experiencias de nuestro grupo de trabajo, un diagnóstico inequívoco depende de la afinidad y especificidad del Ac utilizado, lo que permite realizar la detección de bajas concentraciones de un patógeno.

MÉTODO POR PRECIPITACIÓN

Al mezclar cantidades suficientes de un antígeno soluble con anticuerpos específicos, la interacción Ag-Ac puede dar lugar a una red capaz de ser visualizada como un precipitado. Esta estará constituida por grandes complejos inmunes formados por la interacción Ag-Ac. Cuando se agregan concentraciones crecientes de antígeno soluble a una cantidad fija de suero que contiene anticuerpos específicos, a medida que la cantidad de antígeno agregado aumenta, la cantidad de precipitado se incrementa hasta alcanzar un máximo, luego del cual declina.¹⁶

En un extremo de la curva de precipitación, cuando se agregan pequeñas cantidades de antígeno, los complejos inmunes se forman en exceso de Ac. En el otro extremo, al agregar grandes cantidades de Ag, los complejos inmunes se forman en exceso de Ag, son pequeños y probablemente están constituidos por una molécula de Ac y dos de Ag. Entre estas dos situaciones extremas se encuentra la zona de equivalencia, en donde la relación Ag-Ac permite la formación de grandes redes de complejos inmunes que precipitan.¹⁶

Estos métodos pueden ser desarrollados en medios líquidos o en geles y han demostrado una notable eficacia para individualizar y purificar los antígenos dotados de diferencias particulares. La unión Ag-Ac se traduce por la formación de un precipitado insoluble con la condición de que los reactivos se encuentren a concentración equivalente.¹⁶

No contamos con experiencia en la identificación de bacterias y protozoarios en agua por métodos de precipitación; sin embargo, comentamos los principios en que se basan por su importancia al introducir los métodos de aglutinación.

MÉTODOS POR AGLUTINACIÓN

Las reacciones de aglutinación involucran una interacción entre el Ag y el Ac que llevará a la aparición de un aglutinado que se visualiza como grumos, gránulos de aglutinado o agregado; consisten en hacer reaccionar cantidades equivalentes de los reactantes (Ag y Ac). Los principios fisicoquímicos que gobiernan la formación de estos aglutinados son los mismos que rigen la de un precipitado.¹⁷

La gran diferencia entre las reacciones de precipitación y las reacciones de aglutinación radica en las características del Ag: mientras que en las reacciones de precipitación se emplean antígenos solubles, en las reacciones de aglutinación el Ag es particulado. Con un Ag soluble, también es posible diseñar una reacción de aglutinación gracias a que es posible utilizar distintas partículas (partículas inertes, ejemplo: látex) y realizar un pegado químico o fisicoquímico del Ag soluble a dichas partículas, para generar un "Ag particulado" útil para fines de identificación.¹⁷

Las reacciones de aglutinación desde el punto de vista de su utilidad en el laboratorio tienen la ventaja de ser muy sencillas de realizar, no requieren de ningún equipamiento para su lectura, son rápidas y fáciles de implementar.¹⁷ Además, presentan una mayor sensibilidad que las reacciones de precipitación, por lo que las han sustituido en muchos casos. Sin embargo, cabe mencionar que las reacciones de aglutinación presentan una menor sensibilidad que otras reacciones, tales como ELISA e inmunofluorescencia indirecta; son menos específicas, pues tienen la desventaja de depender grandemente de los factores físico - químicos, tales como concentración de electrolitos, pH, temperatura y tiempo de reacción. No obstante, las ventajas enumeradas hacen de estas una valiosa herramienta para la detección de antígenos en colonias bacterianas obtenidas a partir de muestras de agua.¹⁷

Aglutinación por método del látex

Está basado en la prueba de aglutinación. Los anticuerpos son adheridos a partículas de látex. Al enfrentarse el látex sensibilizado con el Ag específico se produce la agregación entre estas esferas y los antígenos. Esta prueba ha sido usada principalmente en bacteriología y en virología.¹⁷ En nuestro grupo de trabajo se han desarrollado con éxito métodos por aglutinación de látex para *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae* y *E. coli*.

ENZIMOINMUNOENSAYOS

Los inmunoensayos han sido usados por varias décadas en la detección y caracterización de microorganismos y sus componentes en microbiología. El método más popular es el ELISA. Su principal ventaja consiste en el corto período de tiempo que se necesita para identificar al agente patógeno.^{7,8}

La técnica de ELISA utiliza anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa) para visualizar la reacción Ag-Ac, la cual es utilizada tanto para la determinación de antígenos como de anticuerpos.¹⁴ En el caso que nos ocupa (identificación de microorganismos) se utiliza para la determinación de antígenos. Este tipo de sistema permite tanto la detección de bacterias patogénicas como de toxinas en muestras ambientales, con una sensibilidad 1-5 UFC/25 mL de muestra y una especificidad de 95 - 99 %, lo cual ofrece resultados en tiempos más cortos que los métodos tradicionales.^{7,8}

Determinación de antígenos por ELISA

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA "sandwich" directo. En este modelo, el Ac específico para el Ag

de interés se encuentra adsorbido en un soporte sólido sobre el cual se añadirá la muestra biológica. En el caso de que en dicha muestra se encuentre el Ag, quedará capturado en la placa y será puesto en evidencia tras la adición de otro Ac específico conjugado con la enzima. Por último, se añade el sustrato incoloro que, por acción de la enzima, dará un producto coloreado que producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro.¹⁴

Se han desarrollado varios paquetes diagnósticos basados en este tipo de método para la identificación de patógenos y toxinas tales como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, enterotoxinas estafilocócicas, entre otros. El sistema VIDAS (bioMérieux, Hazelwood, MO) consiste en un sistema automatizado que se basa en la técnica de ELISA. El ensayo transcurre entre 45 minutos y dos horas. A través de esta tecnología se pueden identificar patógenos como: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *E. coli* O157, enterotoxina estafilocócica y *Campylobacter* spp.¹⁸

Otro método novedoso es aquel en el cual se combina la inmunocaptura y el crecimiento del patógeno con el método de ELISA. Un ejemplo de este método es el paquete *BioControl 1-2 Test* (BioControl, Bellevue, WA) para la detección de *Salmonella* spp. La muestra que ha sido incubada durante la noche es introducida en una cámara que contiene medio de crecimiento. Si este patógeno está presente migrará. Los anticuerpos anti-H en la segunda cámara reaccionan con la bacteria, y se forma una inmunobanda visible, la cual evidencia la presencia de *Salmonella* spp. en la muestra.⁷

Se han desarrollado métodos de ELISA para determinación de antígenos de *Entamoeba histolytica*, cianobacterias tales como *Microcystis aeruginosa*, verotoxinas de *Escherichia coli*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*.^{6,7}

INMUNOFLUORESCENCIA

La presencia del Ac conjugado con el fluorocromo no necesita de ninguna reacción química para hacerse evidente. Los fluorocromos emiten luz de una determinada longitud de onda luego de ser excitados por un haz de luz de longitud de onda menor.¹⁹ Cada fluorocromo es capaz de emitir luz dentro de un determinado espectro de longitud de onda. Por ejemplo, el fluorocromo denominado isotiocianato de fluoresceína (FITC, siglas en inglés) emite en la gama del verde, mientras que la ficoeritrina emite en la gama del rojo. El hecho de que existan distintos fluorocromos capaces de emitir a diferentes longitudes de onda, permite que puedan detectarse antígenos diferentes en un mismo microorganismo.^{14,19} La visualización de la reacción puede realizarse utilizando un microscopio de fluorescencia (para colonias de microorganismos fijadas en portaobjetos) o por citometría de flujo (para microorganismos en suspensión).¹⁴

Inmunofluorescencia en la detección de bacterias

- *Legionella pneumophila*.

La microscopía directa con anticuerpos fluorescentes (inmunofluorescencia directa) es un método rápido y fue el primer método diagnóstico usado para detectar *Legionella pneumophila* en tejido pulmonar y secreciones respiratorias.²⁰ Asimismo, es de gran utilidad en la identificación de colonias obtenidas por cultivo a partir de muestras de agua. La inmunofluorescencia directa es un procedimiento de tinción que permite detectar con rapidez la

presencia de *Legionella pneumophila* en muestras clínicas. Se realiza con reactivos polivalentes, algunos de los cuales están disponibles comercialmente. Estos reactivos contienen anticuerpos monoclonales capaces de reconocer todos los serogrupos de *Legionella pneumophila*. Los anticuerpos, marcados con fluoresceína se unen a los antígenos de la pared del microorganismo. Un posterior lavado elimina los anticuerpos no fijados y al examinar la extensión con un microscopio de fluorescencia se puede observar la fluorescencia en la pared de estas bacterias.²¹

La identificación de *Legionella pneumophila* a través de estos métodos demora unas tres horas, aunque el método descrito tiene la limitante de que parte del aislamiento. La identificación de *Legionella pneumophila* a través de los métodos convencionales demora entre 15 y 21 días según experiencias de nuestro grupo de trabajo. La sensibilidad del método oscila entre el 25 y el 75 % y la especificidad es del 95 %. Es un método que debe interpretarse con cautela: un resultado negativo no excluye la posibilidad de que estemos en presencia de *Legionella pneumophila* y un resultado positivo debe considerarse como un diagnóstico presuntivo.²¹

- *Vibrio cholerae* O1 y *Vibrio cholerae* O139.

Vibrio cholerae muestra una gran diversidad serológica en base a su Ag somático O, y se conocen al menos 200 serogrupos.²² De estos, solo el O1 y, más recientemente, el O139 han causado epidemias de cólera.²³ Estudios del medio acuático han mostrado que *Vibrio cholerae*, incluyendo los serotipos O1 y O139, forma parte de la microbiota normal de superficies acuáticas, sobrevive y se multiplica en asociación con el zooplancton y fitoplancton, independientemente de la aparición de infecciones humanas.²⁴

La *New Horizons Diagnostics Corporation, USA* ha desarrollado un paquete para la detección rápida de *Vibrio cholerae* O1 en muestras de agua y heces. Este utiliza un Ac monoclonal específico del Ag A del lipopolisacárido O1 de la membrana externa del microorganismo, el cual ha sido conjugado con FICT para la detección rápida y simple de *Vibrio cholerae* O1 en agua y heces.²⁵ El paquete está conformado por el Ac monoclonal específico de *Vibrio cholerae* O1 conjugado a FITC (*Cholera* DFA) y dos reactivos de control (positivo y negativo). Las muestras de agua son previamente concentradas y luego se depositan sobre el portaobjetos. Posteriormente las muestras a analizar y los controles son incubados junto al reactivo *Cholera* DFA. Si la muestra contiene *Vibrio cholerae* O1, el Ac monoclonal conjugado a FITC se une a *Vibrio cholerae* O1. Después de las etapas de lavado la lámina es examinada usando el microscopio de fluorescencia.²⁵

La *New Horizons Diagnostics Corporation, USA* ha desarrollado además un paquete para la detección rápida de *Vibrio cholerae* O139 en muestras de agua y heces. El paquete está conformado por el Ac monoclonal específico de *Vibrio cholerae* O139 conjugado a FITC (*Bengal* DFA) y dos reactivos de control (positivo y negativo). Las muestras de agua son previamente concentradas y luego se depositan sobre el portaobjetos. Posteriormente las muestras a analizar y los controles son incubados junto al reactivo DFA. Si la muestra contiene *Vibrio cholerae* O139, el Ac monoclonal conjugado a FITC se une a *Vibrio cholerae* O139. Concluidas las etapas de lavado la lámina es examinada mediante el microscopio de fluorescencia.²⁶

La identificación de *Vibrio cholerae* a través de estos métodos demora unas dos horas y treinta minutos, lo cual ofrece una gran ventaja en cuanto al tiempo para la toma de decisiones por las autoridades de Salud Pública, sobre todo en situaciones de epidemia. La identificación de *Vibrio cholerae* a través de los métodos convencionales demora entre cinco y siete días según experiencias de nuestro grupo de trabajo.

Inmunofluorescencia en la detección de protozoarios

La detección de ooquistes se realiza mediante microscopía de fluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales marcados con FITC, lo que permite incrementar la capacidad de visualizar los ooquistes y diferenciarlos de materiales inespecíficos y algas microscópicas (microalgas) presentes en ambientes acuáticos.²⁷

La microscopía de inmunofluorescencia es el método estándar para la detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en aguas, tanto para el método 1622/1623 en los EE. UU. como para el Protocolo Operacional Estándar en Australia y el Reino Unido. En este método se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con FITC. Sin embargo, se ha determinado que existen diferencias significativas en cuanto a la avidéz y especificidad de los anticuerpos disponibles comercialmente.²⁸ Diversos estudios han demostrado que la detección de *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia* en aguas es más eficiente cuando se emplean anticuerpos monoclonales de tipo IgG1, los cuales poseen mayor avidéz y especificidad que los anticuerpos policlonales u otras clases de anticuerpos monoclonales como IgG3 e IgM. Estas observaciones fueron confirmadas en muestras de agua utilizando dos clases diferentes de anticuerpos monoclonales (IgG1 e IgM) marcados con FITC.²⁸ La aplicación del Ac monoclonal IgG1 (EasyStain, BTF Precise Microbiology, Australia) produjo mucho menos fluorescencia de trasfondo y la unión del Ac a los ooquistes fue más específica que con el Ac IgM (Waterborne Inc, New Orleans, EE. UU.). La distinción fue más evidente en muestras de agua que contenían altos niveles de microalgas y partículas minerales.^{27,28}

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es un procedimiento altamente eficiente para caracterizar poblaciones celulares (microorganismos) que se encuentren en suspensión.²⁹ En un principio, se utilizaba fundamentalmente para identificar el fenotipo celular, es decir, la expresión diferencial de antígenos en la membrana plasmática; pero actualmente son muchos los parámetros estructurales y funcionales que se pueden medir por citometría de flujo. Entre las muchas ventajas que presenta en relación con la microscopía de fluorescencia se encuentran la posibilidad de analizar un número muy elevado de células (microorganismos) en pocos segundos y la posibilidad de cuantificar la intensidad de fluorescencia. La principal desventaja radica en el alto costo de la adquisición del citómetro de flujo y su mantenimiento.³⁰

En Australia fue desarrollado un método para la detección y enumeración selectiva de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* que aplica citometría de flujo con activadores fluorescentes capaces de clasificar las células según la fluorescencia y el tamaño. Este método mejora sustancialmente el proceso de detección, especialmente cuando se utilizan anticuerpos monoclonales de tipo IgG1 conjugados con FITC y ficoeritrina. Los anticuerpos monoclonales conjugados con estos fluorocromos disminuyen la fluorescencia inespecífica, por lo que facilitan la visualización de muestras ambientales bajo el microscopio.³¹

En la citometría de flujo los microorganismos se hacen fluir uno a uno a través de un rayo láser. Esto hace posible la determinación de múltiples medidas de manera simultánea (alrededor de seis parámetros). Este método permite además la identificación de microorganismos a partir de muestras ambientales, por lo que brinda un diagnóstico presuntivo que puede posteriormente ser confirmado por otras técnicas.³⁰⁻³²

Un aspecto de gran valor en la citometría de flujo es su capacidad de análisis rápido. El análisis por sí solo puede ser completado de tres a cinco minutos. Este es un aspecto que hace a esta técnica muy útil en el monitoreo de rutina de microorganismos de interés que incluyen una variedad de indicadores o microorganismos patógenos y en ocasiones de bacterias viables pero no cultivables. La aplicación de la citometría de flujo es muy amplia; sin embargo, su aplicación para el monitoreo de agua de consumo humano es limitada.³⁰⁻³²

El instrumento básico necesario es el citómetro de flujo, el cual requiere de un operador muy bien entrenado. El reactivo más importante en orden de costos es el Ac monoclonal primario. Por tanto, una de las limitaciones del uso de esta tecnología es su alto costo. El gran número y la variedad de reactivos de laboratorio específicos que deben ser usados es otra limitación del sistema. Además, muchos de los microorganismos patógenos a ser determinados se encuentran en aguas de consumo a concentraciones muy bajas. Esto dificulta el alcance de los niveles de sensibilidad requeridos.³⁰⁻³²

SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA (SIM) O INMUNOCAPTURA

La técnica de SIM directa se basa en la incubación de esferas magnéticas que están recubiertas con anticuerpos específicos para determinado microorganismo en un medio de células suspendidas. Después de dicha incubación y la mezcla efectiva de las partículas con la muestra, las células objeto de estudio se unen a las esferas magnéticas. Las partículas así formadas pueden entonces ser separadas del resto de la suspensión con la ayuda del separador de partículas magnéticas y los lavados correspondientes.^{6,7}

Los métodos de inmunoafinidad en combinación con la SIM han sido usados para el aislamiento de un número de diferentes microorganismos a partir de muestras de agua; por ejemplo, virus de la hepatitis A, rotavirus del grupo A, *Pseudomonas* spp, *E. coli* O157:H7 y *Cryptosporidium parvum*. El aislamiento de bacterias de muestras de agua se puede realizar utilizando medios de enriquecimiento seguido de SIM y siembra en agar selectivo. Estos ensayos son fáciles de realizar; solo necesitan pocas horas. Además, estos paquetes existen para un amplio grupo de microorganismos. Es una técnica simple y rápida. La eficiencia de la reacción depende de la especificidad y la afinidad de los anticuerpos monoclonales empleados y de la turbidez de la muestra de agua.^{6,7}

Los métodos de inmunocaptura pueden ser usados como base para otras técnicas de detección como son la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), reacción en cadena de la polimerasa-reverso transcriptasa (RCP-RT), citometría de flujo y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH).³³

CONSIDERACIONES FINALES

Los inmunoensayos constituyen herramientas de gran utilidad en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en muestras de agua. La introducción de estos métodos dentro de los protocolos de los laboratorios de microbiología de aguas debe realizarse bajo un estricto análisis de las ventajas y desventajas que estos aportan. Se avizora un desarrollo paulatino de estos métodos los cuales se irán automatizando en la medida en que el desarrollo de estas técnicas lo permita.³⁴⁻⁴⁰ La mayor divisa de estos la constituye el acortamiento del tiempo en el cual se puede dar un resultado sumamente confiable que permita la oportuna toma de decisiones por parte de las autoridades sanitarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arnone RD, Walling JP. Waterborne pathogens in urban watersheds. *J Wat Health*. 2007;5: 149-62.
2. Havelaar A, Blumenthal UJ, Strauss M, Kay D, Bartram J. Guidelines: the current position. En: Fewtrell L, Bartram J, editores. *Water Quality: guidelines, Standards and Health. Assessment of risk and risk management for water-related infectious diseases*. London: IWA-Publishing; 2001. p. 440.
3. Jeffery Deal. Health Impact of Community-Based Water Treatment Systems in Honduras. *J Anthropol* Vol. 2011; 10:1155-60.
4. World Health Organization. *Guidelines for drinking water quality*. Ginebra: WHO; 2004.
5. Seyrig Grégoire H, Amanda A, Farhan Srinivasan S, Kronlein Maggie R, Bhaduri P; Hashsham Syed A. Detection and Occurrence of Indicator Organisms and Pathogens. *Water Environment Research*. 2011;27:900-26.
6. Wu V, Jitareerat P, Fung D. Rapid Method and Automat. *Microbiol*. 2003;11:145.
7. Schmidt K, Thakur R, Jiang G, Fung D. Rapid Methods Automat. *Microbiol*. 2000;8:21.
8. Fung D, Thompson L, Crozier-Dodson B, Kastner C. Hands-free "Pop-up" adhesive type method for microbial sampling of meat surfaces. *J Rap Meth Automat Microbiol* [Internet]. 2000 [cited 9 Sep 2011];8:209-17. Available from: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1108/1125>
9. Moore G, Griffith C. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. *Internat Jf Environ Heal Res* [Internet]. 2002 [cited 9 Sep 2011];12:317-29. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0960312021000056429>
10. Michanie S. Métodos alternativos, precisos y rápidos para el control microbiológico de alimentos. *Rev Enf Aliment*. 2005;1:64-71.
11. David Wild. *The Immunoassay Handbook*. Pittsburgh: Elsevier; 2008.

12. Forbes B, Bailey W, Weissfeld A, Sahn D. Immunochemical methods used for organism detection. In: Bailey and Scott, editores. Diagnostic Microbiology. New York: Elsevier; 2007. p. 189-201.
13. Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura RM. Immunoassay and immunochemistry. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 128-212.
14. Gosling JP. Immunoassays: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 2000.
15. Loken MR. Immunofluorescence Techniques. En: MR Melamed, ME. Mendolsohn, T Lindmo, editores. Flow Cytometry and Sorting. New York: Wiley; 1990. p. 341-53.
16. Zumdahl, Steven S. Chemical Principles. New York: Houghton Mifflin Company; 2005.
17. Health Protection Agency. Agglutination Test. National Standard Method BSOP TP 3 Issue 2 [Internet]. London: Standards Unit, Department for Evaluations, Standards and Training; 2010 [cited 9 Sep 2011]. Available from: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp
18. Qian H, Pang E, Du Q, Chang J, Dong J, Toh S, et al. Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope. Applied and Environmental Microbiology [Internet]. 2008 [cited 9 Sep 2011]; 74:833-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065632>
19. KH Moham, P Sathish, R Raghavendra, H Sripathi, S Prabhu. Techniques of immunofluorescence and their significance. Indian J Dermatol Venereal Leprol. 2008; 74:415-9.
20. Wilkinson HW. Legionellosis En: Nevio Cimolai Editor. Laboratory diagnosis of infection diseases, Principles and practice. New York: Springer-Verlag; 1988. p. 315-50.
21. Jurgen H, Soren A, Christian L, Timothy G. Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax *Legionella* Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest *Legionella* Urin Antigen EIA. J Med Microbiol. 2001; 50:509-16.
22. Butler S, Camilli A. Going against the grain: Chemotaxis and infection in *Vibrio cholerae*. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2005 [cited 9 Sep 2011]; 3:611-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
23. Shimada T, Nair G, Deb B, Albert M, Sack R, Takeda Y. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet. 1993; 341:1347-51.
24. Sack D, Bradley R, Nair G, Siddique A. Cholera. Lancet. 2004; 363:223-33.
25. Hasan JA, Bernstein D, Huq A, Loomis L, Tamplin ML, Colwell R. Cholerae DFA: an improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* O1. FEMS Microbiol [Internet]. 1994 [cited 9 Sep 2011]; 120(1-2):143-48. Available from: <http://www.onlinelibrary.wiley.com>

26. Hasan JA, Huq A, Nair B, Garg S, Mukhopadhyay, Loomis L, Bemstein D et al. Development and testing of monoclonal antibody-based rapid immunodiagnostic test kits for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2935-39.
27. Quintero-Betancourt W, Peele ER, Rose JB. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. *J Microbiol Meth.* 2002;49:209-24.
28. Quintero-Betancourt W, Gennaccaro A, Scott T, Rose J. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium oocysts* and *Giardia cysts*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(9):5380-88.
29. Jochem FJ. Short-term physiologic effects of mechanical flow sorting and the Becton-Dickinson cell concentrator in cultures of the marine phytoflagellata *Emiliana huxleyi* and *Micromonas pusilla*. *Cytometry [Internet].* 2005 [cited 9 Sep 2011];65:77-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15791646>
30. Barbosa J, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. *Travel Medical Infectious Diseases.* 2008;6:234-39.
31. Ferrari BC, Vesey G, Davis KA, Gauci M, Veal D. A novel two-color flow cytometric assay for the detection of *Cryptosporidium* in environmental water samples. *Cytometry [Internet].* 2000 [cited 9 Sep 2011];41(3):216-22. Available from: <http://www.onlinelibrary.wiley.com>
32. McClelland RG, Pinder AC. Detection of *Salmonella Typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Appl Environ Microbiol [Internet].* 1994 [cited 9 Sep 2011];60:4255-62. Available from: <http://www.aem.asm.org/cgi/reprint/60/12/4255.pdf>
33. Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrahams FA, LeChevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum oocysts* in surface and backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl Environ Microbiol [Internet].* 1999 [cited 9 Sep 2011]; 65(8):3427-32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10427030>

Recibido: 7 de mayo de 2012.

Aprobado: 20 de noviembre de 2012.

MSc. *Hermes Fundora Hernández*. Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología. Calle Infanta No. 1158 e/ Llinás y Clavel, Centro Habana. Zona postal 10300. La Habana, Cuba. Correo electrónico: hermes.fundora@infomed.sld.cu