



Inducción de citoquinas en la hemodiafiltración en línea: su comparación con la hemodiálisis de alta eficacia

R. Pérez García, P. Rodríguez Benítez, I. Lorenzo, J. M. López Gómez, R. Jofré, E. Junco, J. Chisvert y F. Valderrábano

Servicio de Nefrología. Hospital General Gregorio Marañón. Madrid.

RESUMEN

La contaminación bacteriana del líquido de diálisis puede condicionar la formación de endotoxinas. Estas pueden pasar a través de las membranas de diálisis y una vez en la sangre, activar a los monocitos e inducir la producción de citoquinas. La activación mantenida de estas citoquinas condiciona un estado inflamatorio crónico responsable, al menos en parte, de la morbi-mortalidad de los pacientes en hemodiálisis. En este estudio, se comparan los niveles de contaminación bacteriana, endotoxinas LAL detectables y citoquinas, en pacientes que pasan de hemodiálisis de alta eficacia (HDAE) a hemodiafiltración en línea (HDF-OL).

Cinco pacientes pasaron de HDAE a HDF-OL, según técnica estándar con 110 ml/min de infusión postdilucional de líquido ultrapuro. En las dos técnicas se utilizaron dializadores de polisulfona de alta permeabilidad. Se realizaron controles de TNF- α , IL-6, sIL-2r α y endotoxinas LAL detectables en plasma, mientras se encontraban en HDAE y a la primera, 4.^a y 12.^a semana del cambio de técnica. Se realizaron cultivos y determinación de endotoxinas LAL en el líquido de diálisis, antes y después de su filtración (Diasafe[®] y Filtro-OL[®]).

Los controles de endotoxinas medidos mediante técnica LAL cromogénica cinética, mostraron unos niveles medios medidos en el líquido de diálisis predializador, al comienzo de la sesión, de $0,32 \pm 0,26$ UE/ml, $n = 20$, y a las 3 horas de $0,11 \pm 0,06$ UE/ml. El líquido para infusión, después de su paso por el Filtro-OL[®] no mostró crecimiento bacteriano ni endotoxinas. Los niveles de endotoxinas medidos en el plasma de los pacientes disminuyeron en los períodos de HDF-OL respecto al primero, en HDAE, adquiriendo significación estadística en los dos últimos períodos. Las concentraciones plasmáticas prehemodiálisis del TNF α no variaron a lo largo del estudio. Los niveles de IL-6 aumentaron significativamente de forma puntual en el último período en HDF-OL respecto a HDAE y al primer período en HDF-OL, $p < 0,01$. El sIL-2r disminuyó significativamente, $p < 0,01$, en los períodos de HDF-OL respecto al período de HDAE. La relación concentración postdiálisis/prediálisis de TNF α , IL-6 ni sIL-2r se mantuvo en un rango entre 0,78 y 1,2.

El número de UFC/ml en el LD no se correlacionó con los niveles de endotoxinas ni en el líquido de diálisis ni en plasma; sin embargo, los niveles de en-

Recibido: 9-X-98.

En versión definitiva: 17-II-99.

Aceptado: 21-II-99.

Correspondencia: Dr. R. Pérez García

Jefe Clínico Nefrología

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Dr. Esquerdo, 46

28007 Madrid

dotoxinas fueron significativamente mayores en las diálisis en las que existía un nivel significativo de contaminación bacteriana, $p < 0,05$. Las concentraciones de las citoquinas no se correlacionaban de forma significativa con los niveles de endotoxinas, ni en el líquido de diálisis ni en plasma. Sólo la sIL-2r se correlacionó significativamente con la concentración de endotoxinas en el líquido de diálisis, al inicio de la diálisis.

En conclusión, en comparación con técnicas de hemodiálisis de alta eficacia, no parece que la HDF-OL per sé implique un aumento de los niveles de endotoxinas ni de citoquinas; incluso alguno de los parámetros estudiados mejora.

Palabras clave: **Citoquinas. Endotoxinas. Hemodiafiltración en línea. Hemodiálisis. Líquido de diálisis. Polisulfona.**

CITOKINE RELEASE IN PATIENTS ON HAEMODIAFILTRATION ON-LINE

SUMMARY

Pyrogenic substances [Endo-exotoxins (ET)] derive from contaminated dialysate. Every dialyzer membrane is permeable to endotoxin. ET may cross dialyzer membranes either by backfiltration or diffusion. ET induce cytokine production in blood mononuclear cells. Chronic cytokine release can induce an inflammatory state in hemodialysis patients, related to morbidity and mortality of these patients. Hemodiafiltration on-line (HDF-OL) is a high efficiency technique of dialysis. The safety of on line production of substitution fluid by a two-stage ultrafiltration is evaluated in this study. Also we compared blood levels of cytokines and ET in patients on hemodialysis switched to HDF-OL.

Five patients stable on bicarbonate high-flux hemodialysis (HD) were switched to HDF-OL, with 110 ml/min of postdilutional infusion. High-flux polysulfone, HF80 Fresenius Polysulfone®, were used in both technique. Plasma TNF- α , IL-6, sIL-2r α and endotoxins, LAL assay, were measured when patients were on HD and at first, fourth and 12th weeks on HDF-OL. Microbiological counts and levels of endotoxins (Chromogenic LAL assay) were performed in dialysate after each two-stage ultrafiltration (Diasafe® y Filtro-OL®).

No pyrogenic reactions were observed during the study period. Mean endotoxin level in dialysate before dialyzer at the beginning of dialysis was 0.32 ± 0.26 UE/ml, $n = 20$, and 0.11 ± 0.06 UE/ml at the end of session. The infusion fluid, after OL-Filter® was sterile and contained no detectable ET. Plasma endotoxin levels decreased in the HDF-OL periods respect to the first one, in HD. Plasma TNF α concentrations did not significantly change during the study. Plasma IL-6 levels increased significantly in the last period on HDF-OL with respect to HD control, $p < 0.01$. Plasma sIL-2r levels decreased, $p < 0.01$, in HDF-OL periods respect to HD control. The ratio postdialysis/predialysis concentrations of TNF α , IL-6 and sIL-2r remained between 0.78 and 1.2, without significant changes. Microbiological counts, CFU/ml in dialysate did not correlate with ET levels either measured in plasma or in dialysate; however, dialysate ET levels were significantly higher in hemodialysis where microbiological counts were elevated, $p < 0.05$. Cytokine levels did not correlate with ET levels, only sIL-2r level correlated significantly with dialysate ET concentration, at the beginning of dialysis.

In conclusion HDF-OL is confirmed to be a safe procedure compared to high-flux HD with respect to microbiological and endotoxins control.

Key words: **Cytokines. Endotoxins. Dialysate. Polysulfone. Hemodialysis. Hemodiafiltration on-line.**

INTRODUCCION

La calidad del líquido de diálisis (LD) es fundamental para conseguir una hemodiálisis adecuada. La contaminación bacteriana y la existencia de pirógenos constituyen uno de sus problemas más importantes. El origen de estos contaminantes biológicos es diverso, pueden provenir del agua tratada, de los concentrados de diálisis y de la existencia de biofilm bacterianos en los circuitos, incluidos los de las máquinas de diálisis^{1,2}. Sin embargo, son los concentrados de bicarbonato los que constituyen la principal fuente de contaminación.

Los pirógenos exógenos incluyen distintos derivados microbiológicos; unos son componentes de la pared microbiana y se liberan por lisis bacteriana, es el caso de las endotoxinas (ET) y muramilo péptidos; otros son toxinas secretadas activamente como ocurre con las exotoxinas A³. Cuando estos pirógenos contaminan los LD, pueden atravesar las membranas de diálisis y pasar a la sangre^{2,4}. Una vez en la sangre, son capaces de activar los monocitos, induciendo la liberación de citoquinas (CQ)^{5,6}. Por otro lado, en los pacientes en hemodiálisis se ha encontrado una relación directa entre las concentraciones de CQ, fundamentalmente IL6, IL1 y TNF α y los reactantes de fase aguda, entre los que destacan la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno y la proteína amiloide sérica A (SAA)⁷⁻¹⁰. Como consecuencia, el paciente dializado con un LD contaminado se ve sometido a un proceso inflamatorio crónico. Este proceso inflamatorio es en la mayor parte de los casos subclínico, pero en ocasiones determina la aparición de reacciones agudas a pirógenos¹¹. Por otro lado, distintos trabajos relacionan este estado inflamatorio crónico con el estado de nutrición, sistema inmune, anemia, arteriosclerosis, amiloidosis dialítica y a la larga, con la supervivencia del paciente^{8,9,12-14}.

De lo anteriormente expuesto se deriva la importancia de conseguir un LD apirógeno y de gran pureza, lo que obliga al control continuo de la calidad del LD y a la desinfección y desincrustación periódica de todos los sistemas. Y si esto es así para la hemodiálisis, con mayor razón debería ser en la hemodiafiltración en línea (HDF-OL), en la que se infunde el LD ultrafiltrado al paciente¹⁵⁻¹⁷. Esta técnica de HDF purifica el LD a través de su paso por dos filtros de polisulfona, colocados en serie. Cuando estos filtros están íntegros impiden el paso de endotoxinas, fundamentalmente a través de un mecanismo de adsorción, pero también por cribado de moléculas de alto peso molecular. Sin embargo, este sistema de depuración del LD se puede sa-

turar y se puede afectar por causas físicas y químicas^{18,19}. La saturación va a depender fundamentalmente del volumen ultrafiltrado y de la calidad del agua empleada en la hemodiálisis y cuando acontece, no sólo se pierde la capacidad adsorptiva, sino que también pueden ser fuente de liberación de endotoxinas. De ahí, la necesidad del control, conservación y recambio periódico de los filtros.

Existen datos en la literatura^{1,15} que avalan la seguridad del líquido de infusión de la HDF-OL. De todas formas, la calidad microbiológica del agua y de los concentrados de diálisis es variable en cada unidad de hemodiálisis. Lo anterior nos llevó a valorar y relacionar la contaminación bacteriana del LD y la determinación de ET con las CQ detectadas en la sangre de pacientes que pasaron de HDAE con bicarbonato a HDF-OL.

Resumiendo, nuestro objetivo fue comprobar que la HDF-OL es una técnica segura respecto a la inducción de CQ. La hipótesis es que los pacientes en HDF-OL están expuestos a un nivel de endotoxinas y mantienen una producción de CQ semejantes a los pacientes en HDAE.

MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio prospectivo y longitudinal, en el que cinco pacientes con hemodiálisis de alta eficacia (HDAE) con bicarbonato, fueron transferidos a HDF-OL y seguidos durante 3 meses. Se determinaron en el suero de estos pacientes, la IL 6, la cadena α del receptor soluble de la IL2 (sIL-2 α) y el TNF α , al comienzo del estudio, mientras se encontraban en HDAE y posteriormente, a la primera semana, al mes y a los tres meses de pasar a HDF-OL. Se determinaron ET LAL detectables en el plasma de los pacientes, en el LD y agua tratada. También se realizaron cultivos del agua y LD mediante un método cuantitativo (UFC/ml).

Población en estudio

Se incluyeron cinco pacientes con más de un año de HDAE y considerados estables en el momento de iniciar el estudio. Cuatro pertenecían al primer turno de diálisis y el otro al segundo, por condicionantes técnicos para realizar los controles analíticos en máquinas de HDF-OL. Tres mujeres y dos hombres con una edad media de $55,2 \pm 17,9$ años, que oscilaba entre 25 y 69 años. Su peso medio era de $63,1 \pm 7,9$ Kg, con un rango entre 52 y 72,3 Kg. El origen

de su insuficiencia renal era nefropatía intersticial crónica en tres casos, nefropatía diabética y nefroangiosclerosis en los dos restantes. En ningún paciente existía evidencia de hepatopatía, proceso inflamatorio ni neoplásico activo. El acceso vascular era en todos los casos una fístula arteriovenosa (FAV) normofuncionante, con prótesis de gore-tex® en cuatro de ellos. Se trataba de pacientes bien nutridos, siendo la concentración media de albúmina al comienzo del estudio de $4,6 \pm 0,35$ g/dl con un rango entre 4,3 y 5,2 g/dl. Las características clínicas de estos pacientes se recogen en la tabla I. Se valoraron las reacciones a pirógenos, definidas como episodios de fiebre, escalofríos y repercusión hemodinámica en la diálisis, sin una causa infecciosa aparente.

Características técnicas de la hemodiálisis

– *Hemodiálisis de alta eficacia*: Tres sesiones semanales de tres horas. Monitor de ultrafiltración controlada, 4008B de Fresenius®. Membrana de diálisis de polisulfona (PLS) de 1,8 m² de superficie, HF80 Fresenius Polysulfone®. LD producido con bicarbonato en polvo, con un flujo de 500 ml/m. Flujo sanguíneo entre 350-400 ml/ml. En todas las sesiones se procedió a la ultrafiltración del LD a través de un filtro de polisulfona, Diasafe®, implantado en la línea del LD antes de su entrada al dializador. Este filtro era renovado periódicamente, cada 50 sesiones de diálisis o bien cada dos meses. Con objeto de disminuir el riesgo de retrofiltración, se realizó ultrafiltración mínima de 700 ml/h, reponiéndose con suero salino 0,9% estéril en caso necesario.

– *Hemodiafiltración ON LINE*: Tres sesiones por semana. Nueve horas semanales. Con el mismo mo-

nitor, dializador y flujo sanguíneo. Flujo del LD; 800 ml/min producido = 690 ml/m reales + 110 ml/min de infusión. Ultrafiltración secuencial del LD a través de dos microfiltros de PLS, dispuestos en serie, Diasafe® y filtro On Line®, con infusión postdilucional de 110 ml/m del LD producido «on line». El filtro «on line» fue sustituido cada 50 sesiones.

– *Tratamiento del agua*: Tanto en la modalidad de HDAE como en HDF-OL, se siguió un sistema de tratamiento con filtros de partículas, descalcificador, carbón activado y ósmosis inversa. Esterilización de la planta de tratamiento del agua cada tres meses.

– Método de desinfección de las máquinas de diálisis, con peróxido de hidrógeno y ácido peracético, puriestéril®, después de cada procedimiento dialítico.

Diseño

Se trata de un estudio prospectivo y longitudinal, en el que cada paciente es control de sí mismo. Se incluyeron cinco pacientes estables en HDAE que fueron transferidos a HDF-OL y seguidos durante tres meses. Las determinaciones analíticas y microbiológicas fueron realizadas al comienzo del estudio, mientras los pacientes se encontraban en HDAE, tiempo 0 y a la semana, al mes y al tercer mes de iniciar HDF-OL, tiempos 1s, 4s y 12s respectivamente.

En todos los tiempos se realizaron cultivos del agua tratada y del LD pre y postfiltro diasafe® y del líquido de infusión, tabla II. Se determinaron ET LAL en el LD, una vez ultrafiltrado por el diasafe®, antes de pasar por el dializador, en todos los tiempos, tanto al comienzo como al final de las sesiones de diálisis, tabla III. En nueve de las diálisis, se deter-

Tabla I. Características clínicas de los pacientes

Sexo	Edad (años)	Etiología IRT	Peso (kg)	Kt/V		PCR (g/kg/d)		ALB (g/dl)	HTO (%)
				HDAE	HDF-OL	HDAE	HDF-OL		
H	25	NTIC	72,3	1,16	1,38	0,97	0,92	5,2	35
M	69	NAE	60,2	1,34	1,46	1,32	1,21	4,7	35
H	53	NTIC	69	1,29	1,19	1,17	1,14	4,6	31,4
M	65	NTIC	62,2	1,28	1,41	1,07	1,14	4,4	35,9
M	64	ND	52	1,20	1,42	0,92	1,03	4,3	28
2H y 3M	55,2 ± 17,9 (25-69)		63,1 ± 7,9 (52-72,3)	HDAE 1,25 ± 0,07 HDF-OL 1,37 ± 0,10 ns		HDAE 1,09 ± 0,16 HDF-OL 1,09 ± 0,11 ns		HDAE 4,6 ± 0,35 HDF-OL 4,6 ± 0,32 ns	HDAE 33,0 ± 3,3 HDF-OL 35,4 ± 1,8 ns

NTIC: nefropatía túbulointersticial crónica. NAE: nefroangiosclerosis. ND: nefropatía diabética. H: hombre. M: mujer. ALB: albúmina. HTO: hematocrito.

Tabla II. Cultivos del agua y LD en los cuatro tiempos del estudio

	Tiempo 0		1S		4S		12S	
	n.º UFC/ml	nº UFC/ml	n.º UFC/ml					
Agua tratada	4 < 10	3 < 10	3 < 10	3 < 10	1 50	1 100*	1 100*	1 220
	1 50	2 30	1 100*	1 220				
LD prefiltro	2 < 10	2 < 10	2 < 10	2 < 10	1 200*	1 70	1 250*	1 500
Diasafe	2 50	2 200	1 200*	1 70	1 400	1 250*	1 500	
	1 160	1 500	1 500	1 500				
LD postfiltro	2 < 10	2 < 10	1 < 10	2 < 10				
Diasafe	1 20	1 40	1 20	1 30				
LD infusión On-Line		3 < 10	3 < 10	3 < 10				

*Pseudomona aeruginosa. Otros gérmenes: Pseudomona sp y corynebacterium sp. n.º: número de cultivos. UFC/ml: unidades formadoras de colonias por ml. Valores admisibles (19): LD < 2000 UFC/ml. Agua < 200 UFC/ml.

Tabla III. Niveles de ET LAL obtenidos en el LD al comienzo de las diálisis en los tiempos 0, 1s, 4s y 12s

UE/ml n = 5 x 8	HDAE tiempo 0	HDF-OL tiempo 1s	HDF-OL tiempo 4s	HDF-OL tiempo 12s
LALini LD	0,57 ± 0,38	0,39 ± 0,12	0,14 ± 0,04*	0,16 ± 0,06*
LALfin LD	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,09

*: p < 0,01 respecto al tiempo 0. LALini LD y LALfin LD: ET LAL detectables en el LD obtenidas, postfiltro diasafe, predializador, al comienzo y al final de diálisis.

minaron ET en el líquido de infusión, postfiltro on-line.

Las ET LAL se determinaron en plasma en la primera hora de la sesión de diálisis, en los tiempos 0 y 4s. En los cuatro tiempos, se determinó en el suero de los pacientes TNF α , IL6 sIL 2r α , al comenzar la sesión de diálisis. En los tiempos 0 y 4s también al finalizar, tabla IV.

Metodología de las determinaciones

Todas las extracciones se realizaron en la sesión de diálisis de mitad de semana. La separación de la sangre se efectuó con centrífuga refrigerada y posteriormente los plasmas o sueros fueron conservados en el congelador a -20 °C.

– *Bacteriología del LD*: Se realizó cultivo, estudio cualitativo y cuantificación de UFC/ml en el LD. En

Tabla IV. Niveles plasmáticos medios de TNF α , IL6, sIL-24 y ET LAL detectables obtenidos al comienzo de la hemodiálisis en los tiempos 0, 1s, 4s y 12s

Valores normales	HDAE tiempo 0	HDF-OL tiempo 1s	HDF-OL tiempo 4s	HDF-OL tiempo 12s
TNF α < 4,9 pg/ml	32,1 ± 7,8	30,5 ± 25,5	37,3 ± 22,4	22,4 ± 5,6
IL6 < 5 pg/ml	9,4 ± 1,8	6,6 ± 2,6	12,5 ± 3,6	18,1 ± 6,5*+
sIL-2R 25-125 U/ml	289,2 ± 40,2	188,3 ± 58,4*	185,1 ± 49,1*	149,6 ± 34,2*
LAL plasma UE/ml	0,36 ± 0,11	0,25 ± 0,06	0,17 ± 0,05*	0,16 ± 0,08*

HDAE: hemodiálisis de alta eficacia. HDF-OL: hemodiafiltración en línea. *+: p < 0,01 respecto al tiempo 0 y 1s, respectivamente.

los cultivos positivos se determinó el microorganismo contaminante. Las muestras para la determinación de los cultivos fueron tomadas del agua tratada y del LD, pre y postfiltro Diasafe®, esta última predializador. Las muestras fueron cultivadas a 37 °C, utilizándose como medio de cultivo agar sangre y procediéndose a la lectura 48 horas después. Se valoró cualquier grado de contaminación, considerándose «agua contaminada» aquella con un recuento mayor a 100 UFC/ml y «LD contaminado» cuando era mayor de 1.000 UFC/ml.

– Endotoxinas: Se realizó técnica LAL cromogénica para la determinación específica de ET en plasma, Coatest® Plasma Endotoxina. Se siguió método cinético, cuyo rango de referencia es de 0,06-12 UE/ml de plasma. Para la determinación en el LD, se empleó método similar, Coatest® Endotoxina, cuyos valores de referencia oscilan entre 0,005-12 UE/ml.

– TNF α : Se determinó el suero de los pacientes mediante técnica de ELISA, Human TNF alpha ELISA, marca Endogen®. El límite de sensibilidad de este método se encuentra en concentraciones de 5 pg/ml y su rango de detección entre 5 y 1.000 pg/ml.

– IL6: Determinada en suero mediante técnica de ELISA, Human IL6 ELISA, de Endogen®. Límite inferior de sensibilidad < 1 pg/ml y rango de detección entre 1-400 pg/ml.

– Receptor soluble de la IL2: Determinado en suero mediante ELISA, CELLPREE® Human sIL2 Receptor ELISA. Método con límite inferior de sensibilidad 24 U/ml y un rango de detección entre 24 y 6.400 u/ml.

– Otras determinaciones: Hematocrito y hemoglobina mediante técnica Coulter Counter® en los tiempos 0 y 12s; albúmina sérica y urea mediante autoanalizador Hitachi® en los tiempos 0 y 12s. Se

calculó la cantidad de diálisis que recibían los pacientes, tanto en HDAE como en HDF-OL, mediante el modelo cinético de la urea monocompartimental, método de Gotch y Sargent, con extracción de la muestra sanguínea postdiálisis a los dos minutos de finalizar la sesión. La tasa de catabolismo protéico (PCR) se calculó mediante la fórmula $nPCR = [9,35 \times G + 0,294 \times V \text{ (litros)}] / \text{peso (kg)}$; $G \text{ mg/min} = (\text{BUN pre-BUNpost}) \times V / \text{Ted (min)}$.

Estadística

El análisis estadístico se realizó a través del programa R-Sigma Horus Hardware[®]. Todos los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar. Se usó el test de Student para muestra pareadas y el análisis de la varianza para la comparación de nuestras múltiples pareadas. Se calcularon correlaciones por mínimos cuadrados. Consideramos significación estadística una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Durante el período de estudio no se objetivaron reacciones a pirógenos en los cinco pacientes.

Los resultados de los cultivos del agua tratada para diálisis y del LD una vez ultrafiltrado por el diasafe[®], así como los cultivos en el líquido de infusión después de pasar por el filtro On-Line[®], se recogen en la tabla II.

En la tabla III se muestran los valores de ET LAL en el LD, al inicio y al final de la sesión de diálisis, de los cinco pacientes, en los cuatro períodos del estudio. Todos los valores estaban por debajo de 5 UE/ml y sólo uno de ellos por encima de 1 UE/ml (40 valores). La concentración media de endotoxinas al inicio de la diálisis fue de $0,32 \pm 0,26$ UE/ml y al final $0,11 \pm 0,06$ UE/ml, siendo la diferencia significativa ($p < 0,01$). En las nueve muestras del líquido de infusión en las que se determinaron las concentraciones de ET, éstas estaban por debajo del límite de sensibilidad del método de detección $< 0,01$ UE/ml.

Las concentraciones plasmáticas al comienzo de la diálisis del TNF α no variaron a lo largo del estudio, comparando el período de HDAE con los períodos de HDF-OL, tabla IV. Los niveles de IL6 aumentaron significativamente en el período en HDF-OL respecto a HDAE y al primer período en HDF-OL, $p < 0,01$. El sIL 2r- α disminuyó significativamente, $p < 0,01$ en los períodos de HDF-OL respecto al período de HDAE. Ni el TNF α , IL6 ni sIL 2r- α variaban significativamente durante la sesión de

diálisis: la relación concentración postdiálisis/pre-diálisis se mantuvo en un rango entre 0,78 y 1,2. Los niveles de ET en el plasma de los pacientes disminuyeron en los períodos en HDF-OL respecto al primero, en HDAE, adquiriendo significación estadística en los dos últimos, tabla IV.

El número de UFC/ml en el LD no se correlacionó con los niveles de ET ni en el LD ni en el plasma, aunque los niveles de ET fueron significativamente mayores en aquellas diálisis en las que existía «contaminación» bacteriana, $p < 0,05$. Las concentraciones de las CQ no se correlacionaban de forma significativamente con los niveles de ET ni en el LD ni en plasma. Sólo la sIL 2r- α se correlacionó significativamente con la concentración de ET en el LD al inicio de diálisis, $n = 20$, $r = 0,46$ y $p < 0,05$.

Sólo coincide un aumento de UFC/ml de pseudomona aeruginosa en los dos últimos períodos con un aumento de IL6 en el último, sin detectarse aumento de ET.

Los datos de hematocrito, albúmina, Kt/V y nPCR se recogen en la tabla I.

DISCUSION

Actualmente nadie duda sobre la importancia de la calidad del LD a la hora de conseguir una hemodiálisis adecuada. Todas las unidades de hemodiálisis cuentan con una planta de tratamiento del agua, generalmente con ósmosis inversa y se lleva a cabo una monitorización periódica de la misma. En España, el agua empleada en hemodiálisis debe cumplir la norma AENOR 111-301-90, de enero de 1990 y publicada en esta revista en 1991²⁰. En esta norma se contempla la resistividad mínima, las concentraciones máximas de diversos electrolitos y sustancias. Fija en 200 el máximo de colonias bacterianas por mililitro de agua y se exige que la determinación de cultivos en el agua y LD se realice mensualmente. Sin embargo, esta norma no exige la determinación de ET y por consiguiente, no asegura un agua ni un LD adecuados para la realización de las nuevas técnicas de hemodiálisis. Sin embargo, no debemos olvidar que estas normas están dictadas a primeros de los años 80, según el modelo de la AAMI de 1981²¹, en un momento en que las IL y ET eran consideradas sólo en el terreno de la investigación. En el momento actual, la Real Farmacopea Española, con el número 1.167, publica unas recomendaciones más estrictas en las que reduce a 100 el número de colonias/ml admisibles en el agua de hemodiálisis y fija la concentración de ET en 0,25 UE/ml. En los resultados de este trabajo se observa cómo existen distintos grados de conta-

minación bacteriana, significativos en algunas ocasiones, lo que condiciona la aparición de ET, incluso después del filtro Diasafe®. Lo que significa que estos sistemas no logran la esterilización de los líquidos de diálisis. Sólo después del segundo filtro se logra un líquido de gran pureza.

La contaminación del LD se puede deber a la existencia de un agua tratada contaminada o lo que es más frecuente a la contaminación de los concentrados del LD, fundamentalmente el bicarbonato. La presencia de más de 1.000 UFC/ml en el LD, se relaciona con la existencia de biofilm bacterianos en el circuito del LD de las máquinas². Su eliminación no siempre es fácil, precisándose en la mayor parte de los casos el uso de desinfectantes con capacidad desincrustante y detergente.

La contaminación bacteriana del agua y del LD tiene gran importancia como fuente de endotoxinas; sin embargo, no existe una buena correlación entre la existencia de cultivos positivos en el agua tratada y LD, con la presencia de ET LAL detectables. Tampoco existe una clara correlación entre los niveles de ET LAL detectables y el aumento plasmático de CQ tal como hemos encontrado en nuestros pacientes en diálisis y de acuerdo con los resultados de otros trabajos^{17,22}. Distintos factores condicionan esta falta de correlación. El primer factor es que no sólo influye la cuantificación de la contaminación bacteriana, sino también la identificación del microorganismo contaminante. Así, no todas las bacterias son capaces de producir ET y activar los monocitos induciendo la liberación de CQ. El segundo factor es que los métodos de detección bacteriológico y de ET deben ser adecuados, siendo importante la forma y el momento de recoger las muestras así como la forma de procesar los cultivos. Es preciso utilizar medios de cultivo pobres, a temperatura ambiente y con lecturas tardías de los mismos, más de 72 horas, si queremos aumentar la sensibilidad del método^{1,17}. De acuerdo con lo anterior, las muestras recogidas en el primer turno de diálisis, con el primer agua de la mañana suelen, como se demuestra en nuestros resultados, dar cifras más elevadas de contaminación. También observamos cómo el nivel de ET no es constante a lo largo de una sesión de diálisis siendo mayor al principio que al final de la misma. Probablemente esta observación sea debida a la existencia de biofilm bacterianos y al mayor arrastre de bacterias y por consiguiente de ET con el primer paso de líquido por las zonas contaminadas². Esto tiene connotaciones sobre cuándo se deben obtener los controles de calidad del agua y explica, al menos en parte, la disparidad de los resultados obtenidos en distintos trabajos^{17,22}. El ter-

cer factor que influye en la falta de correlación cultivos-ET-CQ es el hecho de que generalmente la determinación de ET se realiza por el método LAL y éste sólo detecta uno de los tipos de pirógenos. Finalmente, el cuarto factor es que el proceso de liberación de CQ por las ET es multifactorial y en él, influyen: la cantidad y el tipo de toxina; el tipo de membrana; factores plasmáticos y la actuación concomitante de otros sistemas de activación e inactivación monocitaria²³. Algunos de los factores que influyen en el grado de respuesta, dependen del estado de inmunocompetencia del paciente²⁴ a través de la respuesta depresora de la IL-10 sobre los monocitos. También la existencia de concentraciones cambiantes de la proteína de unión a los lipopolisacáridos (LBP) y del «Bactericidal/permeability-increasing factor» (BPI) durante la hemodiálisis, en parte relacionadas con el estado nutricional²⁵, podrían modular el efecto de las endotoxinas.

El transporte de ET y de otros contaminantes bacterianos se lleva a cabo principalmente por retrofiltración pero también por retrodifusión y puede acontecer con cualquier tipo de membrana de hemodiálisis. En este sentido, diferentes trabajos han demostrado un mayor riesgo con el uso de membranas de alta permeabilidad^{11,23}. Un método para disminuir la presencia de ET en el LD es su ultrafiltración a través de filtros de polisulfona o poliamida. Se ha demostrado que el paso del LD a través de filtros de polisulfona es efectivo para eliminar ET y conseguir un líquido ultrapuro con menor inducción de CQ²⁶⁻²⁹. Debemos tener siempre presente que esta acción se lleva a cabo fundamentalmente a través de un mecanismo de adsorción y por consiguiente sólo serán efectivos si están en buen estado, no saturados ni desnaturalizados por sustancias químicas, como la lejía (hipoclorito de sodio). Es precisamente esta condición de saturabilidad lo que condiciona la necesidad de su recambio periódico. Junto a este mecanismo de adsorción, los filtros de polisulfona realizan también un cribaje de aquellas ET con peso molecular superior al punto de corte de la membrana. De cualquier modo, incluso en las mejores condiciones, estos filtros sólo son capaces de extraer una parte de las ET y una proporción de éstas pueden pasar a la sangre del paciente. De ahí que siga siendo un requisito la buena calidad del agua y LD, sobre todo en técnicas de alta eficacia con dializadores de alta permeabilidad. Tal es el caso de la HDF-OL, técnica que exige un agua y LD ultrapuros, con < 100 UFC/ml en la primera, < 1.000 UFC/ml en LD y un nivel de ET LAL detectables < 0,25 y < 1 UE/ml respectivamente, con un control periódico mínimo

mensual. No es fácil mantener estos niveles, lo que obliga a desinfecciones periódicas de todos los circuitos de agua y LD. En este sentido, en Norteamérica Central se realizó un estudio³⁰ en 51 centros de hemodiálisis, que cumplían las normas AAMI: < 200 en agua y < 2.000/UFC en el líquido de diálisis. Se recogieron muestras aleatorias, que demostraron 35,5% de muestras de agua contaminadas y un 19% de líquidos de diálisis. El 6% tenían más de 5 UE/ml (LAL). El 76% y el 30% de los centros tenían hongos y levaduras, respectivamente, en sus tratamientos de agua. En otro estudio, en 36 centros en Canadá, se objetivó un 30% y un 44% de muestras por encima de sus normas de calidad para contaminación bacteriana (< 200 UFC/ml) y determinación de ET (< 1 ng/ml) respectivamente³¹.

En este trabajo, hemos objetivado un aumento de IL6 en el último período del estudio, sin que hayamos podido asociarlo con un mayor recuento de ET ni en el LD ni en el plasma de dichos pacientes. Únicamente la presencia de pseudomona aeruginosa en el LD podría relacionarse con el aumento de IL-6. Se trata, sin embargo, de un hallazgo aislado en un número reducido de pacientes, cinco, y es preciso contrastarlo con otros estudios. Algo parecido nos ocurre con la disminución objetivada de la sIL-2r aunque en este caso, su disminución fue paulatina a lo largo del período de estudio. Con respecto al sIL-2r, es sabido que algunos procesos inflamatorios se caracterizan por la activación de los linfocitos T y que estos linfocitos T activados muestran IL-2r en su forma soluble. La presencia de sIL-2r (CD25) se ha correlacionado con distintos procesos inflamatorios como son: la enfermedad inflamatoria intestinal, linfomas T cutáneos, infección crónica por virus de la hepatitis C y citomegalovirus y el síndrome de fatiga crónica³²⁻³⁴. En los pacientes de este estudio, que no eran portadores de ninguna enfermedad inflamatoria crónica, existían niveles discretamente elevados de sIL-2r, lo que sugiere una activación crónica de linfocitos T. En los últimos períodos en HDF-OL dos pacientes llegaron a presentar niveles en el rango normal. Finalmente, las ET determinadas en plasma disminuyeron a lo largo del estudio, probablemente debido a la ultrafiltración obligada, de más de 110 ml/min que se lleva a cabo en esta técnica y que teóricamente, impide la retrofiltración.

En conclusión, no parece por tanto que la HDF-OL *per sé*, implique un aumento de los niveles de ET ni de CQ si se compara con las técnicas de hemodiálisis de alta eficacia. Incluso algún parámetro estudiado, mejora.

Bibliografía

1. Canaud BJM, Mion CM: Water treatment for contemporary hemodialysis (Chap. 8), en: Replacement of renal function by dialysis, edited by: Jacobs C, Kjellstrand CM, Koch KM, Winchester JF. Netherlands 1996, Kluwer ed. pp. 231-255.
2. Vincent FC, Tibi AR, Darbord JC: A bacterial biofilm in a hemodialysis stem. Assessment of desinfection and crossing of endotoxin. *Trans Am Soc Artif Organs* 35: 310-313, 1989.
3. Ronco C, Fabris A, Feriani M: Hemodialysis fluid composition en: Replacement of renal function by dialysis, edited by: Jacobs C, Kjellstrand CM, Koch KM, Winchester JF. Netherlands 1996, Kluwer ed. pp. 256-272.
4. Bommer J, Becker DP, Urbaschek: Potential transfer of endotoxin across high-flux polysulfone membranes. *J Am Soc Nephrol* 7: 883-888, 1996.
5. Evans RC, Holmes CJ: In vitro study of the transfer of cytokine-inducing substances across selected high-flux hemodialysis membranes. *Blood Purif* 9: 92-101, 1991.
6. Pertosa G, Jesualdo L, Botalico D, Schena FP: Endotoxin modulate chronically tumour necrosis factor α and interleukin 6 release by uraemic monocytes. *Nephrol Dial Transplant* 10: 328-333, 1995.
7. Beguin Y, Loo M, R'Zik S, Sautois B, Lejeune F, Fillet G: Early prediction of response to recombinant human erythropoietin in patient with anemia of renal failure by serum transferrin receptor and fibrinogen. *Blood* 82: 2010-2016, 1993.
8. Pannichi V, Migliosi M, De Pietro S, Metelli MR, Taccola D, Chezzi PM, Carozzi S, Fidelo F, Santoro A, Rindi P, Pérez García R, Palla R, Tetta C: Plasma C-reactive protein in hemodialysis patients. *Kidney Int* (en prensa).
9. Bárány P, Divino Filho JC, Berström J: High C-reactive protein is a strong predictor of resistance to erythropoietin in hemodialysis patients. *Am J Kid Dis* 29 (4): 565-568, 1997.
10. Panichi V, Tetta C, Rindi P, Palla R, Lonnemann G: Plasma C-reactive protein is linked to backfiltration associated interleukin-6 production. *ASAIO* (en prensa).
11. Pegues DA y cols.: A prospective study of pyrogenic reactions in hemodialysis patients using bicarbonate dialysis fluid filtered to remove bacteria and endotoxin. *J Am Soc Nephrol* 3: 1002-1007, 1992.
12. Haverkate F, Thompson SG, Pype SDM, Gallimore JR, Pepys MB: Production of C-reactive protein and risk and coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 349: 462-466, 1997.
13. Bergström J, Heimbürger O, Lindholm B, Qureshi AR: C-reactive protein as predictor for serum albumin and mortality in hemodialysis. *Gen Am Soc Nephrol* 6: 573, 1995.
14. Floege J, Schäffer J, Koch KM, Shaldon S: Dialysis related amyloidosis: a disease of chronic retention and inflammation? *Kidney Int* 42 (Supl. 38): S78-S85, 1992.
15. Canaud B y cols.: Hemodiafiltration with on-line production of substitution fluid: Long-term safety and quantitative assessment of efficacy. *Contrib Nephrol* 1908: 12-22, 1994.
16. Capelli G, Perrone S, Ciuffreda A: Water quality for non-line haemodiafiltration. *Nephrol Dial Transplant* 13 (Supl. 5): 12-16, 1998.
17. Lonnemann G: Assessment of the quality of dialysate. *Nephrol Dial Transplant* 13 (Supl. 5): 17-20, 1998.
18. Kerr PG, Argilés A, Cannaud B, Flavier JL, Mion C: The effect of reprocessing high-flux polysulfone dialyzers with peroxyacetic acid on β -microglobulin removal in hemodiafiltration. *Am J Kidney Dis* 19: 433-438, 1992.
19. Capelli G y cols.: Removal of limulus reactivity and cytokine-inducing capacity from bicarbonate dialysis fluids by ultrafiltration. *Nephrol Dial Transplant* 8: 1133-39, 1993.

20. Comité técnico Aenor. *Nefrología* 11: 7-8, 1991.
21. AAMI Standards for hemodialysis system. ANSA/AAMI. RD 5, 1981.
22. Bambauer R, Schauer M, Jung WK, Daum V, Vienken J: Contamination of dialysis water of dialysate. A survey of 30 centers. *Am Soc Artif Intern Organs J* 40: 1012-1016, 1994.
23. Lonneman G: Dialysate bacteriological quality and the permeability of dialyzer membranes to pyrogens. *Kidney Int* 43 (Supl. 41): S195-S200, 1993.
24. Girndt M, Köhler H, Schiedhelm-Weick E, Schlaak JF, Büschenfelde KHM, Fleischer B: Production of interleukin-6, tumor necrosis factor α and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 47: 559-565, 1995.
25. Sundaram S, King AJ, Pereira BJ: Lipopolysaccharide-binding protein and bacteriostatic/permeability-increasing factor during hemodialysis: clinical determinants and role of different membranes. *J Am Soc Nephrol* 8: 463-470, 1997.
26. Frinak S, Polaschegg HD, Levin NW, Pohlod DJ, Dumler F, Saravolarz LD: Filtration of dialysate using an on-line dialysate filter. *Int J Artif Organs* 14: 691-7, 1991.
27. Lonnemann G, Schindler R: Ultrafiltration using the polysulfone membrane to reduce the cytokine-inducing activity of contaminated dialysate. *Clin Nephrol* 42 (Supl. 1): S37-S43, 1994.
28. Rafiee Tehrani M, Farrokhnia R, Falkenhagen D, Weber C: Removal of lipid A and pseudomonas aeruginosa endotoxin from dialysis fluids by high-flux polysulfone ultrafilter (dialyzer). *PDA J Pharm Sci Technol* 50: 306-310, 1996.
29. Pérez García R, Anaya F, Chisvert J, Valderrábano F: Association of high-flux dialysers and bacterial contamination of dialysate-induced chronic release of cytokines in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 10: 2164-2165, 1995.
30. Klein E, Pass T, Harding GB, Wright R, Million C: Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the Central United States. *Artif Organs* 14: 85-94, 1990.
31. Laurence RA, Lapierre ST: Quality of hemodialysis water: a 7-year multicenter study. *Am J Kid Dis* 25: 738-750, 1995.
32. Hayashi J, Kishihara Y, Yamaji K, Yoshimura E, Ohmiya M, Tani Y, Ikematsu H, Kashiwagi S: Serum levels of soluble interleukin-2 receptors and effects of interferon-alpha for patients with chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 40: 1837-1841, 1995.
33. Nielsen OH, Ciardelli T, Wu Z, Langholz E, Kirman I: Circulating soluble interleukin-2 receptor alpha and beta chain in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 90: 1301-1306, 1995.
34. Dummer R, Posseckert G, Sugamura K, Grundmann H, Burg G: Circulating interleukin-2 receptors are a group of multimeric proteins with immunoreactivity for interleukin-2 receptors alpha, beta and gamma chains. *J Interferon Cytokine Res* 16: 315-320, 1996.



Si quiere más información sobre cualquiera de las revistas, llame a este teléfono

Rodolfo Ruiz o Felicidad Rey

 91 358 86 57



REVISTAS

(COMUNICACIÓN IMPRESA)

- ORL (Edición Española)
- MONOCARDIO
- ANNALS OF ONCOLOGY (Edición Española)
- GASTROENTEROLOGIA INTERHOSPITALARIA
- PSIQUIATRIA
- ALLERGY AND ASTHMA PROCEEDINGS (Edición Española)
- PEDIATRIA
- NEFROLOGIA
- NUTRICION HOSPITALARIA
- DERMATOLOGIA
- EUROPEAN NEUROLOGY (Edición Española)
- EUROPEAN UROLOGY (Edición Española)
- AULA MEDICA PSIQUIATRIA
- REVISTA ANDALUZA DE PATOLOGIA DIGESTIVA
- AULA MEDICA GERIATRIA
- RESPIRATION (Edición Española)
- SALUD MENTAL



PUBLICACIONES
PERIODICAS