

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



52

Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos

Editores

Emília Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Marina de Cueto López

Autores

Marina de Cueto López
José Luis del Pozo León
Francisco Franco Álvarez de Luna
Mercedes Marín Arriaza



ISBN: 978-84-606-6625-7

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

de Cueto López M, del Pozo León JL, Franco Álvarez de Luna F, Marín Arriaza M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. 52. De Cueto López M. (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Diagnóstico microbiológico de las infecciones
asociadas a dispositivos biomédicos

Editores:

Emília Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

52. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS. **2015**

Coordinador:

Marina de Cueto López

Autores:

Marina de Cueto López¹
José Luis del Pozo León²
Francisco Franco Álvarez de Luna³
Mercedes Marín Arriaza⁴



¹ Unidad de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. H.U. Virgen Macarena. Sevilla, ² Área de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Clínica Universidad de Navarra. Pamplona, ³ Unidad de Microbiología, UGC Laboratorios Clínicos. Hospital General de Riotinto. Minas de Riotinto, Huelva, ⁴ Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Madrid.

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	Infecciones asociadas a dispositivos extravasculares.....	6
2.1.	Infecciones asociadas a implantes de mama.....	6
2.1.1.	Introducción.....	6
2.1.2.	Prevalencia.....	7
2.1.3.	Etiopatogenia.....	7
2.1.4.	Factores de riesgo.....	8
2.1.5.	Clasificación y manifestaciones clínicas.....	8
2.1.6.	Diagnóstico clínico.....	8
2.1.7.	Diagnóstico microbiológico.....	9
2.2.	Infecciones asociadas a implantes de pene.....	9
2.2.1.	Introducción.....	9
2.2.2.	Prevalencia.....	10
2.2.3.	Etiopatogenia.....	10
2.2.4.	Clasificación y manifestaciones clínicas.....	10
2.2.5.	Diagnóstico clínico.....	10
2.2.6.	Diagnóstico microbiológico.....	10
2.3.	Infecciones asociadas a mallas quirúrgicas empleadas en la reconstrucción de pared abdominal y suelo pélvico.....	10
2.3.1.	Introducción.....	10
2.3.2.	Prevalencia.....	11
2.3.3.	Etiopatogenia.....	11
2.3.4.	Consideraciones clínicas.....	11
2.3.5.	Diagnóstico microbiológico.....	12
2.4.	Infecciones asociadas a dispositivos de estimulación cerebral (neuroestimuladores).....	12
2.4.1.	Introducción.....	12
2.4.2.	Epidemiología.....	12
2.4.3.	Etiopatogenia.....	12
2.4.4.	Manifestaciones clínicas.....	12
2.4.5.	Diagnóstico microbiológico.....	12
2.5.	Infecciones asociadas a implantes cocleares.....	13
2.5.1.	Introducción.....	13
2.5.2.	Epidemiología.....	13
2.5.3.	Etiopatogenia.....	13
2.5.4.	Manifestaciones clínicas.....	14
2.5.5.	Diagnóstico microbiológico.....	14
3.	Infecciones asociadas a dispositivos intravasculares.....	14
3.1.	Infecciones asociadas a válvulas cardiacas protésicas.....	14
3.1.1.	Introducción.....	14
3.1.2.	Epidemiología.....	14
3.1.3.	Patogenia.....	14
3.1.4.	Clasificación.....	14
3.1.5.	Etiología.....	15
3.1.6.	Diagnóstico clínico.....	15
3.2.	Infecciones asociadas a dispositivos de electroestimulación.....	15
3.2.1.	Introducción.....	15
3.2.2.	Epidemiología.....	16
3.2.3.	Patogenia.....	16

3.2.4. Clasificación y manifestaciones clínicas	16
3.2.5. Etiología	16
3.2.6. Diagnóstico clínico.....	17
3.3. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a válvulas cardíacas protésicas y dispositivos de electroestimulación cardíaca.....	17
3.3.1. Hemocultivos	17
3.3.2. Cultivo de válvulas cardíacas protésicas	17
3.3.3. Cultivo de dispositivos de electroestimulación	18
3.3.4. Serología	18
3.3.5. Diagnóstico molecular	18
4. Infecciones asociadas a otros dispositivos intravasculares.....	19
4.1. Infecciones asociadas a prótesis vasculares	19
4.1.1. Introducción	19
4.1.2. Etiopatogenia	20
4.1.3. Manifestaciones clínicas	20
4.1.4. Diagnóstico clínico.....	20
4.1.5. Diagnóstico microbiológico.....	20
4.2. Infecciones asociadas a TIPS (endotipsitis)	21
5. Procesamiento general de muestras para el diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos.....	21
5.1. Obtención de muestras	21
5.1.1. Muestras de colecciones y abscesos periimplante.....	22
5.1.2. Biopsias de tejidos	22
5.1.3. Sangre	22
5.1.4. Implantes	22
5.2. Transporte y conservación de las muestras	22
5.3. Recepción de las muestras en el laboratorio.....	22
5.3.1. Criterios de rechazo	22
5.4. Procesamiento de las muestras.....	22
5.4.1. Muestras de colecciones y abscesos periimplante.....	23
5.4.2. Biopsias de tejidos	23
5.4.3. Implantes	23
5.5. Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	24
5.6. Interpretación de resultados.....	24
5.6.1. Tinción de Gram.....	24
5.6.2. Cultivos	24
5.7. Información de resultados.....	25
5.8. Otros métodos para el diagnóstico microbiológico: Técnicas de biología molecular	25
6. Bibliografía.....	25

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-DBM-01. Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación
2. PNT-DBM-02. Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardíacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación
3. PNT-DBM-03. Procesamiento microbiológico de muestras de biopsia de tejido para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos.

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de dispositivos biomédicos implantados quirúrgicamente ha mejorado la calidad de vida y, en muchos casos, las tasas de supervivencia de pacientes con diferentes patologías. La elevada frecuencia de infecciones relacionadas con el empleo de ciertos dispositivos como prótesis articulares o catéteres intravasculares ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas microbiológicas que se han consolidado como estándar del diagnóstico y, también desde el punto de vista clínico se han consensuado, entre todas las especialidades implicadas, guías de diagnóstico y tratamiento de las infecciones asociadas.

En el presente documento se aborda el manejo de las infecciones asociadas a otros tipos de dispositivos permanentes, para los que no existen técnicas estandarizadas o consensuadas de diagnóstico microbiológico. Se incluyen tanto dispositivos intravasculares: electroestimuladores cardiacos, marcapasos, válvulas cardiacas y prótesis vasculares, como extravasculares: implantes mamarios, genitales, mallas quirúrgicas, implantes cocleares y neuroestimuladores. En general, las tasas de infección asociada a estos dispositivos son bajas, aunque varían en función del tipo de dispositivo, la técnica quirúrgica y la existencia de comorbilidades.

La infección del dispositivo implantado se produce generalmente durante el acto quirúrgico a partir de la microbiota cutánea del propio paciente. Otros mecanismos patogénicos menos frecuentes incluyen, la colocación de un dispositivo contaminado, la contaminación ambiental durante la cirugía, las infecciones por contigüidad y por diseminación hematógena desde un foco distante.

Las infecciones asociadas a implantes implican interrelaciones muy complejas entre el microorganismo, la superficie del propio implante y el hospedador. Una vez que los microorganismos colonizan el dispositivo son capaces de desarrollarse sobre la superficie del mismo formando una biocapa que es determinante en la patogenia de estas infecciones.

La biocapa es una estructura compleja compuesta no solo por microorganismos sino también por una matriz autoproducida que puede variar tanto en morfología como en composición según el microorganismo implicado. La matriz extracelular está multiperforada por canales de agua que facilitan el intercambio tanto de nutrientes como de sustancias de desecho desde el

interior de la biocapa. Además, dentro de la biocapa existe un sistema de comunicación intercelular denominado *quorum sensing* que juega un papel clave en su desarrollo y maduración.

Esta forma de desarrollo confiere a estos microorganismos una gran resistencia no solo a la acción de los antimicrobianos sino también a los mecanismos de defensa del hospedador. Esto hace que en la mayor parte de las ocasiones fracase el tratamiento médico y sea necesario retirar el dispositivo para conseguir la curación. Se han propuesto varios mecanismos implicados en la mayor resistencia de estos microorganismos sésiles, en comparación con los microorganismos planctónicos, entre los que destacan: (i) una tasa de replicación disminuida de los microorganismos en el interior de la biocapa llegando a existir microorganismos en fase de crecimiento latente, (ii) el desarrollo de respuestas de estrés en el interior de la biocapa capaces de generar enzimas destructoras de antimicrobianos, y (iii) en menor medida la restricción del paso de los antimicrobianos a las zonas más alejadas de los canales de agua del interior de la biocapa.

El diagnóstico microbiológico de este tipo de infecciones es complejo y en muchas ocasiones solo puede realizarse tras la retirada del dispositivo. El cultivo tras sonicación o agitación es una técnica que se viene utilizando en los últimos años como herramienta diagnóstica de la infección asociada a prótesis articular y ha demostrado una mayor sensibilidad que el cultivo de los tejidos peri-implante, especialmente en aquellos pacientes que están recibiendo tratamiento antibiótico. En el caso de la infección asociada a otros dispositivos no hay apenas experiencia en el uso de esta técnica, sin embargo, podría ser una herramienta útil ya que consigue la desagregación de la biocapa de la superficie del dispositivo. También, la aplicación de técnicas moleculares, especialmente las basadas en PCR, a las muestras y al material obtenido tras sonicación, ha demostrado para algunos tipos de dispositivos una alta sensibilidad y especificidad.

2. INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS EXTRAVASCULARES

2.1. INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES DE MAMA

2.1.1. Introducción

Los implantes de mama se utilizan con propósitos cosméticos, para corrección de asimetrías y defectos con-

génitos y con propósitos reconstructivos en pacientes intervenidas de cáncer de mama. La mamoplastia de aumento fue la cirugía más realizada en EE.UU. en el año 2013 con casi 300.000 procedimientos según los datos de la Asociación Americana de Cirugía Plástica. Los implantes se pueden colocar entre el músculo pectoral mayor y la glándula mamaria (implante subglandular), o por debajo del músculo (implante submuscular). La vía de abordaje quirúrgico puede ser inframamaria, periareolar, transaxilar, transareolar o transumbilical. Los dos tipos de implante más usados son los de gel siliconizado y los implantes de salino. Los implantes de silicona contienen un gel de silicona recubierto por un polímero de silicona, y los implantes salinos son autoexpandibles y se rellenan durante la inserción.

La reconstrucción mamaria se puede realizar mediante el uso de implantes, mediante el uso de tejidos autólogos o una combinación de ambos procedimientos. A pesar de que la reconstrucción mediante tejidos autólogos se considera la técnica reconstructiva de elección, en los últimos años ha aumentado de una manera muy importante el uso de técnicas reconstructivas basadas en la colocación de implantes. Los implantes se pueden colocar en uno o en dos tiempos (con colocación inicial de un expansor). Los procedimientos en un tiempo son cada vez más frecuentes debido a que cada vez se realizan más cirugías con conservación del complejo areola-pezones, mastectomías profilácticas por el riesgo de cáncer y debido al desarrollo de matrices biológicas y mallas sintéticas. Esta reconstrucción en un tiempo tiene ventajas desde el punto de vista psicológico para el paciente y evita la necesidad de una segunda cirugía.

Los pacientes en los que se coloca un implante de mama pueden sufrir complicaciones a lo largo del tiempo. Estas complicaciones conllevan un impacto negativo en los pacientes además de aumentar la estancia hospitalaria, el número de cirugías posteriores y consecuentemente el coste económico asociado. A pesar de los avances en el diseño de los biomateriales utilizados, la mejora en las técnicas quirúrgicas y el uso de profilaxis antibiótica en la cirugía, estas complicaciones aún representan un reto diagnóstico y terapéutico hoy en día.

La infección asociada a implante de mama es una causa importante de morbilidad siendo los pacientes oncológicos en los que se realiza una reconstrucción inmediata el tipo de paciente con el mayor riesgo asociado. La incidencia de infección después de una

reconstrucción con expansor y colocación de un implante puede ser de hasta el 35% en este grupo de pacientes. La presencia de celulitis, de una fístula o la exposición del implante obligan a la retirada del mismo para asegurar la curación de la infección. Sin embargo hay algunos datos prometedores cuando se utiliza un tratamiento conservador con retención del implante o con un recambio en un tiempo en ciertos pacientes seleccionados.

Otra complicación muy frecuente es la contractura de la cápsula. El tejido conectivo desarrolla una reacción de cuerpo extraño alrededor del implante formando una cápsula. Esta cápsula origina una fibrosis dolorosa sobre el implante. Varios trabajos sugieren que esta reacción fibrosa podría estar en relación con la formación de biocapas microbianas sobre la superficie del implante. Los microorganismos implicados serían bacterias poco virulentas como propionibacterias o estafilococos coagulasa negativa. La prevalencia de contractura capsular oscila entre un 1 un 33% según las series. La causa y consecuentemente la prevención y el tratamiento óptimo, están aún por determinar.

2.1.2. Prevalencia

La infección asociada a implante de mama es una de las complicaciones más frecuentes tras este tipo de cirugía. Las cifras de prevalencia varían según los estudios, pero oscilan en torno a un 2% en la mayor parte de las series. Sin embargo, hay alguna serie en la que la infección representa hasta un 35% en los casos de cirugía reconstructiva. La mayor parte de las infecciones suelen ocurrir durante el post-quirúrgico inmediato, pero también pueden presentarse meses o incluso años después de la cirugía. Se estima que el coste hospitalario medio asociado con un episodio de infección asociada a implante de mama puede ser de unos 3.500 euros. Se han diseñado varias estrategias para prevenir este tipo de infecciones. El uso de mejores técnicas quirúrgicas, la mejora en el diseño y biomateriales de los implantes y el uso de profilaxis antibiótica durante la cirugía.

2.1.3. Etiopatogenia

La glándula mamaria no es un órgano estéril, contiene microbiota endógena proveniente de la piel y consistente en estafilococos, difteroides, lactobacilos, estreptococos alfa-hemolíticos y anaerobios como *Propionibacterium acnes*. Los microorganismos grampositivos (*Staphylococcus aureus* y estreptococos) y algunos gramnegativos son los microorganismos que más frecuentemente producen las infecciones precoces. Sin embargo, las infecciones tardías (aquellas que

ocurren al menos un mes después de la cirugía) están causadas más frecuentemente por estafilococos coagulasa negativa y propionibacterias, sin olvidar que en este tipo de infecciones las micobacterias atípicas pueden jugar un papel importante. Todas estas infecciones pueden ser polimicrobianas o monomicrobianas. Se han descrito infecciones por otros microorganismos como *Pasteurella multocida*, *Brucella* spp., *Granulicatella adiacens*, *Streptomyces* spp. y hongos. *Mycobacterium fortuitum* es la micobacteria que más frecuentemente se asocia con la infección asociada a implantes de mama, aunque se han descrito infecciones por otras micobacterias como *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium conceptionense*, *Mycobacterium thermoresistibile* y *Mycobacterium chelonae*.

Como se ha señalado en la introducción de este documento, una vez que los microorganismos colonizan el dispositivo se multiplican y originan una biocapa que representa el principal factor de patogenicidad y determina que en la mayor parte de las ocasiones fracase el tratamiento médico y sea necesario retirar el implante para conseguir la curación.

2.1.4. Factores de riesgo

Los factores de riesgo para el desarrollo de una infección asociada a implantes de mama no están claramente establecidos. Las tasas de infección después de cirugías reconstructivas son significativamente más elevadas que las producidas después de procedimientos cosméticos. La reconstrucción mediante implante en el mismo acto quirúrgico en el que se realiza la mastectomía presenta un mayor riesgo de infección que cuando la reconstrucción se realiza de manera tardía. La técnica quirúrgica y las comorbilidades son los factores de riesgo más importantes de infección. Las mujeres en las que se ha realizado una linfadenectomía tienen un mayor riesgo de infección. La quimioterapia también se ha señalado como factor de riesgo para la infección. Se han descrito otros factores prequirúrgicos asociados con el desarrollo de una infección como el riesgo quirúrgico, la existencia de cirugías previas sobre la mama, la diabetes mellitus, el índice de masa corporal elevado, la postmenopausia, el tratamiento con corticoides, una historia previa de tabaquismo, la pérdida importante de sangre durante la cirugía o la necesidad de colocación de drenajes postquirúrgicos.

Las matrices acelulares se utilizan cada vez con mayor frecuencia para realizar las reconstrucciones basadas en la colocación de implantes. Esto introduce un nuevo factor de riesgo para el desarrollo de una infección

asociada. Las matrices acelulares son tejidos artificiales preparados a partir de tejidos humanos, bovino o porcino en los que se han eliminado los componentes celulares que son los causantes del rechazo y de la inflamación. El resultado es una matriz de tejido intacto que proporciona el andamiaje biológico necesario para el crecimiento del tejido de reconstrucción además de proporcionar los componentes necesarios para que se inicien los procesos de angiogénesis y revascularización. Se han comunicado tasas muy bajas de infección asociada a matrices acelulares. En un trabajo que incluía casi 800 reconstrucciones realizadas con matrices acelulares la incidencia de complicaciones apenas representó un 2%, incluyendo solamente un 1% de infección asociada y un 0,5% de contractura de la cápsula. En otro estudio que incluyó 331 reconstrucciones en un solo tiempo con estas matrices se describió una elevada incidencia de necrosis cutánea (9%) y de infección asociada (3%). Una alternativa a las técnicas de reconstrucción basadas en implantes y/o en matrices acelulares son las mallas de polipropileno impregnadas en aleaciones de titanio aprobadas en Europa en 2008. Hay muy pocos datos sobre su uso y complicaciones asociadas, pero en un estudio multicéntrico de 231 casos se han asociado a un bajo número de complicaciones (6% de infección y 2% de contractura capsular). Sin embargo aún faltan estudios sobre todo de coste eficacia.

2.1.5. Clasificación y manifestaciones clínicas

Hasta dos tercios de las infecciones ocurren durante el primer mes post-colocación del implante. Las infecciones agudas cursan habitualmente con fiebre, dolor, eritema o fistulas que comunican la piel con el implante. Además de los signos locales, estas infecciones pueden asociar un shock séptico si la infección está causada por *S. aureus* o estreptococos del grupo A. Las infecciones tardías se pueden presentar meses o años después de la colocación del implante y clínicamente se caracterizan por dolor con o sin signos inflamatorios locales, o por movilización o exposición del implante a veces se acompañan de síntomas generales inespecíficos (artralgias, astenia o febrícula). Las infecciones tardías pueden tener su origen en bacteriemias secundarias a otro foco o a procedimientos médico-quirúrgicos que puedan causar una bacteriemia.

2.1.6. Diagnóstico clínico

En la mayor parte de ocasiones las manifestaciones clínicas de una infección precoz asociada a un implante de mama son muy características con signos flogóticos locales, fiebre y/o presencia de colecciones peri-implante, lo cual en muchas ocasiones basta para

establecer el diagnóstico. Sin embargo, en el caso de las infecciones tardías, la sintomatología clínica puede ser muy anodina con presencia de dolor o deformidades. En estos casos pueden aparecer fístulas o incluso erosiones cutáneas con exposición del implante. El diagnóstico debe incluir una completa evaluación clínica, una exploración física adecuada y un abordaje multidisciplinar que incluya al cirujano, al infectólogo y al microbiólogo. Si se recogen muestras de tejidos deben ser enviadas al laboratorio de Microbiología y a estudio histopatológico. Las técnicas de imagen que habitualmente pueden ayudar al diagnóstico son la ecografía (para la localización y punción guiada de colecciones) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (para evaluar la existencia de otras complicaciones como la roturas del implante o la contractura capsular). Hay poca experiencia con otras técnicas como la gammagrafía con leucocitos marcados o la tomografía por emisión de positrones (PET) para el diagnóstico de este tipo de infecciones, aunque probablemente sean útiles en algunos casos. Determinados parámetros bioquímicos como la velocidad de sedimentación globular o la proteína C reactiva en suero pueden resultar útiles tanto para ayudar al diagnóstico como para monitorizar la eficacia del tratamiento, aunque ambos marcadores son muy poco específicos.

2.1.7. Diagnóstico microbiológico

La diferenciación entre celulitis e infección relacionada con el implante es fundamental para establecer el tratamiento más adecuado. Desafortunadamente, en la actualidad no hay técnicas diagnósticas de referencia para diagnosticar una infección asociada a un implante de mama. Por otra parte, es preciso interpretar con precaución los resultados microbiológicos debido a que los microorganismos que más frecuentemente causan estas infecciones son microorganismos que contaminan con frecuencia las muestras. Además, hay que tener en cuenta que las infecciones asociadas a implantes pueden cursar con una carga baja de microorganismos, lo que hace necesario en ocasiones el empleo de medios de enriquecimiento e incubación prolongada para evitar la falsa negatividad de los cultivos. Sin embargo, esto hace que se incremente también la proporción de aislamiento de contaminantes haciendo difícil la interpretación de los resultados de los cultivos.

Como se ha referido anteriormente, se puede realizar una ecografía para excluir la presencia de colecciones peri-implante. Sin embargo, la ausencia de colecciones no excluye el diagnóstico de infección. Si se objetivan colecciones se puede realizar una punción

aspiración guiada por ecografía. El material se debe enviar al laboratorio de Microbiología para realización de tinción de Gram y de ácido-alcohol resistencia además de cultivo bacteriológico y de micobacterias. Se deben extraer hemocultivos en aquellos pacientes que se presenten con un cuadro séptico o sugestivo de bacteriemia. Si finalmente se opta por la retirada del implante, este debe ser colocado en un contenedor estéril y enviado al laboratorio de Microbiología para realizar un cultivo tras sonicación. En el caso de la infección asociada a implantes de mama no hay apenas experiencia en el uso de esta técnica para el diagnóstico de una infección asociada, sin embargo podría ser una herramienta útil dado que como se ha mencionado antes, la formación de biocapas es el factor patogénico clave en el desarrollo de estas infecciones. La ventaja de cultivar el implante es que se muestrea directamente el lugar de la infección. Como principal inconveniente de este método está la facilidad de contaminación de las muestras durante la extracción del implante y procesamiento.

2.2. INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES DE PENE

2.2.1. Introducción

Los implantes protésicos de pene son (desde su introducción en 1973) una alternativa al tratamiento de la disfunción eréctil orgánica irreversible. No hay cifras en España, pero en EE.UU. se implantan más de 25.000 de estos dispositivos cada año. Básicamente hay dos tipos de implantes, los semirrígidos y los inflables. La infección es la complicación post-implantación más severa, dado que ésta puede originar múltiples complicaciones locales que conlleven intervenciones quirúrgicas, hospitalizaciones prolongadas, pérdida de funcionalidad del implante y daños psicológicos, además de generar un importante gasto económico. Desafortunadamente no existen guías o recomendaciones ni sobre el diagnóstico de estas infecciones ni sobre el tratamiento más adecuado en cada caso. Esto se debe a que el número de implantes que se colocan cada año es relativamente muy bajo y a que la tasa de infección asociada es muy pequeña. No hay recomendaciones en cuanto a profilaxis a emplear para evitar la infección, aunque la *American Urological Association Best Practice Policy Statement* recomienda el uso de cefalosporinas de primera o segunda generación (o vancomicina en el caso de instituciones con una elevada prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina, SARM) junto a un aminoglucósido desde el momento de la inducción anestésica hasta 24 horas después de realizada la cirugía. Además, se recomienda mantener

la profilaxis por vía oral durante los primeros 14 días después de la cirugía. En esta profilaxis postquirúrgica se pueden emplear quinolonas, sulfamidas o betalactámicos.

2.2.2. Prevalencia

La infección asociada a implantes protésicos de pene es aproximadamente de un 2-3%. Esta tasa puede ser mucho mayor (hasta el 15-20%) en el caso de reintervenciones o en el caso de que el paciente presente comorbilidades predisponentes. El uso de implantes protésicos de pene impregnados en antibióticos (generalmente minociclina o gentamicina con rifampicina) ha demostrado disminuir de manera significativa el número de infecciones asociadas en varios trabajos. Se han descrito en diferentes trabajos factores de riesgo para este tipo de infecciones como la diabetes mellitus, las cirugías de recambio, la existencia de una lesión medular, el tratamiento con inmunosupresores, las infecciones urinarias de repetición, la insuficiencia vascular severa o la existencia de una infección activa a otro nivel. En algún trabajo se ha asociado el uso de implantes inflables con un mayor riesgo de infección asociada que cuando se utilizan implantes semirígidos.

2.2.3. Etiopatogenia

Los implantes protésicos de pene se colonizan habitualmente a partir de la piel y la herida quirúrgica, y debido a ello el microorganismo más frecuentemente implicado en estas infecciones es *Staphylococcus epidermidis*. Sin embargo, también se han descrito infecciones por *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida* spp. e incluso *Neisseria gonorrhoeae*. En varios trabajos se ha documentado el aislamiento de pequeñas cantidades de microorganismos como estafilococos coagulasa negativa en cultivos de implantes procedentes de pacientes sin signos de infección asociada. Es posible que se formen de manera fisiológica biocapas de microorganismos en la superficie de los implantes durante el acto quirúrgico, y que exista un balance entre dichas biocapas y los mecanismos de defensa del hospedador de manera que sólo unos pocos pacientes acaben desarrollando signos de infección.

2.2.4. Clasificación y manifestaciones clínicas

La mayor parte de las infecciones ocurren dentro del primer año tras la colocación del implante. Los pacientes pueden presentar desde dolor o disconfort local hasta signos inflamatorios locales, fístulas, o cuadros febriles. Se han descrito infecciones postquirúrgicas precoces con celulitis, dehiscencia de la herida qui-

rúrgica, fiebre y frecuentemente bacteriemia asociada. Estos casos suelen estar causados por microorganismos muy virulentos como *S. aureus*, *E. coli* o *P. aeruginosa*. Los pacientes diabéticos pueden presentar pocos signos locales de infección, y en ocasiones la infección puede manifestarse únicamente por un mal control glucémico.

2.2.5. Diagnóstico clínico

El diagnóstico de las infecciones asociadas a implantes de pene es fundamentalmente clínico.

La ecografía puede resultar útil para la localización y punción guiada de colecciones. El papel de otras técnicas de imagen está aún por determinar.

2.2.6. Diagnóstico microbiológico

En la mayoría de los casos en los que se diagnostica una infección asociada a este tipo de implantes va a ser necesario retirar el mismo para hacer un recambio en uno o en dos tiempos. En varios trabajos se recomienda explantar todos los componentes del dispositivo (cilindros, bomba, reservorio y tubos) y enviarlos a cultivo. No está bien establecido el papel del cultivo tras sonicación en este tipo de implantes, pero parece lógico pensar que probablemente añada sensibilidad al cultivo convencional. Si es factible, es recomendable enviar muestras de tejido para cultivo.

2.3. INFECCIONES ASOCIADAS A MALLAS QUIRÚRGICAS EMPLEADAS EN LA RECONSTRUCCIÓN DE PARED ABDOMINAL Y SUELO PÉLVICO

2.3.1. Introducción

La hernia de pared abdominal, se define como un defecto en la continuidad de las estructuras de la fascia y/o el músculo de la pared abdominal que permiten la salida o protrusión de estructuras que normalmente no pasan a través de ellas. Otras localizaciones frecuentes, son la hernia inguinal, umbilical, en cicatrices quirúrgicas, femoral, epigástrica, así como otras menos comunes como la lumbar, subcostal o de suelo pélvico.

La malla quirúrgica es un material diseñado para estabilizar y reforzar defectos de tejidos y se utilizan para las reparaciones de hernias y del prolapso de órganos pélvicos. El objetivo de la cirugía al usar una malla es conseguir una reparación sin tensión, a diferencia de las suturas que al aproximar los tejidos causan tensión entre los bordes del defecto que favorecen la infección y necrosis.

La *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó la primera malla en la década de 1990 y hoy se estima que, cada año, se implantan más de un millón de mallas en todo el mundo. Las mallas se suministran en láminas circulares, ovales, elípticas y rectangulares, de distintos tamaños que pueden ser utilizadas en su totalidad o cortadas a medida según sea necesario. Los diferentes tipos de mallas empleadas en la cirugía de la hernia se clasifican en dos grandes grupos: 1) poliméricas o sintéticas, y 2) biológicas o naturales. Las poliméricas o sintéticas, a su vez pueden ser reticulares, laminares y compuestas, mientras que las biológicas o naturales están constituidas por el grupo de las bioprótesis: dermis porcina, pericardio bovino, submucosa intestinal porcina, dermis humana y dermis porcina. A su vez pueden ser no absorbibles, parcialmente absorbibles y absorbibles. La malla quirúrgica absorbible se utiliza como refuerzo para proporcionar soporte durante el proceso de cicatrización y no debe emplearse cuando se requiere un soporte prolongado. Por su tamaño de poro las prótesis pueden ser micro o macroporosas. Se considera que el tamaño del poro protésico es el principal parámetro para considerar una prótesis como de alta o de baja densidad. De esta manera, las prótesis de alta densidad tendrían un diseño con un poro pequeño, mientras que las de baja densidad tendrían un poro más amplio. En general, un tamaño de poro más pequeño reduce la capacidad de la malla para ser incorporada a los propios tejidos, con lo que se minimiza la formación de adherencias.

Entre las complicaciones más frecuentes del empleo de mallas quirúrgicas se encuentran la inflamación como respuesta a la introducción de un cuerpo extraño, la fibrosis, la calcificación, la trombosis, la lesión a vísceras y por supuesto la infección.

La aparición de seromas alrededor de la prótesis, su migración, la aparición de adherencias y el dolor crónico, suelen ser las principales manifestaciones clínicas del rechazo a un cuerpo extraño como es una malla.

2.3.2. Prevalencia

La incidencia de la infección en prótesis tras cirugía abierta y laparoscópica para la reparación de la hernia, es relativamente infrecuente. Los autores la sitúan entre el 1% y el 8%, según las series. La tasa de infección está estrechamente relacionada con la presencia de factores de riesgo y comorbilidades del huésped como la diabetes mellitus, la inmunodepresión, la obesidad (IMC (índice de masa corporal) >35), la malnutrición, el tratamiento con esteroides o el tabaquismo.

Entre los factores relacionados con la cirugía, destacan las incisiones mayores, la presencia de espacios muertos, los cierres con mayor tensión y la urgencia de la intervención.

2.3.3. Etiopatogenia

La adhesión bacteriana a la malla, depende del polímero y de su superficie. El empleo de mallas macroporosas y monofilamento, han demostrado una menor colonización bacteriana, que aquellas mallas multifilamento. En cualquier caso, una vez que los microorganismos acceden al implante se multiplican en él y dan lugar a la formación de una biocapa que, como se ha señalado, es responsable de la persistencia y recurrencia de la infección.

Los microorganismos que con mayor frecuencia están relacionados con la infección de este tipo de dispositivos protésicos son los estafilococos, especialmente *S. aureus* y *S. epidermidis*, los estreptococos como *Streptococcus agalactiae*, bacilos gramnegativos, principalmente enterobacterias y microorganismos anaerobios como *Peptostreptococcus* spp. Algunos autores han descrito infecciones ocasionadas por organismos levaduriformes (*Candida* spp.) o *Mycobacterium* spp.

Para la protección de los polímeros que conforman las prótesis, frente a la colonización bacteriana, se han desarrollado multitud de estrategias alternativas a la administración de profilaxis antimicrobiana en el momento de la intervención. Destacan la unión covalente de antibióticos a los materiales, la impregnación con antisépticos o la incorporación de sales e iones de plata.

2.3.4. Consideraciones clínicas

Un aspecto importante a tener en cuenta en este tipo de procesos, es diferenciar entre una infección a nivel local del lecho quirúrgico (infección superficial) y una infección profunda y real del material protésico. Se debe sospechar de la infección del material protésico cuando los pacientes presentan signos y síntomas agudos y locales de infección (dolor, eritema y aumento de la temperatura) en la zona de la malla. Se pueden presentar manifestaciones sistémicas como fiebre y malestar general y en ocasiones puede aparecer una fístula o absceso intrabdominal en las inmediaciones del material protésico.

El empleo de técnicas de imagen como la RMN o el TAC (tomografía axial computarizada), pueden ser útiles en el diagnóstico de las infecciones de mallas. Es-

tas técnicas revelan áreas de inflamación en la grasa subcutánea alrededor de la prótesis, mostrando características y densidades diferentes a las presentadas por una reacción aséptica como el seroma.

2.3.5. Diagnóstico microbiológico

La muestra clínica de mayor calidad es la biopsia de tejido periprotésico en aquellos procesos en los que se pueda abordar la toma de este tipo de muestras. El aspirado de posibles abscesos o colecciones adyacentes al material protésico también puede ser una excelente muestra clínica, obtenidas por punción directa o bajo control radiológico o ecográfico. No es aceptable el empleo de hisopos o torundas impregnadas de material purulento provenientes de fístulas, heridas o material expuesto al exterior.

Tanto si se decide retirar completamente la malla o si, en el contexto de un tratamiento conservador, se realizan escisiones parciales de la misma, debe enviarse, al menos una parte al laboratorio de Microbiología para su procesamiento y cultivo tras sonicación o agitación.

2.4. INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS DE ESTIMULACIÓN CEREBRAL (NEUROESTIMULADORES)

2.4.1. Introducción

La estimulación cerebral profunda es un tratamiento quirúrgico que permite, mediante la implantación de un dispositivo, el control de determinados desordenes neurológicos resistentes a otros tratamientos. Sus indicaciones incluyen fundamentalmente el tratamiento del dolor refractario, temblor esencial, distonía y enfermedad de Parkinson. El sistema consta de 3 componentes, un electrodo situado dentro del parénquima cerebral y un cable subcutáneo que conecta el electrodo al tercer componente que es un generador implantado bajo la piel, generalmente a nivel de la clavícula. La implantación de neuroestimuladores se inició en los años 80 y desde entonces se han realizado avances importantes tanto en el diseño de los dispositivos como en las técnicas quirúrgicas.

2.4.2. Epidemiología

La incidencia de infecciones es muy variable, oscilando entre 0,6% y 12%, según las series. Esta gran variabilidad probablemente refleja las diferentes poblaciones estudiadas, las diferentes técnicas quirúrgicas empleadas y los distintos criterios utilizados para definir infección. No se conocen factores de riesgo concretos para el desarrollo de infección asociada aunque, como para otros dispositivos, se consideran potencia-

les factores de riesgo la edad, la técnica quirúrgica, la reimplantación del sistema, y las comorbilidades del paciente.

2.4.3. Etiopatogenia

La contaminación del dispositivo se produce generalmente durante el acto quirúrgico o posteriormente debido a manipulaciones del sistema o erosiones de la piel que cubre el dispositivo. La infección generalmente afecta al generador y la bolsa en la que se inserta y al cable conector. Los agentes causales más frecuentes son *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. acnes* aunque también se han descrito infecciones por *P. aeruginosa*, enterobacterias y *M. fortuitum*.

Como en todas las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos, la formación de biocapas, que permite a los microorganismos resistir los mecanismos de defensa del huésped y la acción de los antibióticos, representa el principal factor de patogenicidad.

2.4.4. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas y la gravedad de este tipo de infecciones van a depender del microorganismo infectante y del lugar de la infección. La infección superficial o profunda del lecho quirúrgico es la más frecuente, mientras que la infección del parénquima cerebral es la más grave. La infección precoz aparece entre 1 y 6 meses después de la cirugía y se manifiesta por enrojecimiento, inflamación y dolor de la zona que cubre el generador o el trayecto del cable conector; en ocasiones puede haber supuración y dehiscencia de la herida con extrusión del dispositivo. La infección tardía se caracteriza por la presencia de erosiones en la piel del cuero cabelludo, del bolsillo del generador o del trayecto del cable conector. Cuando la infección afecta al electrodo insertado en el parénquima cerebral, aparecen síntomas neurológicos focales secundarios a un absceso cerebral o cerebritis de la zona adyacente. El diagnóstico clínico se basa en la presencia de alguna de las alteraciones locales o neurológicas mencionadas y, aunque no existan signos locales debe sospecharse infección del dispositivo en presencia de fiebre sin otra focalidad.

2.4.5. Diagnóstico microbiológico

Cuando la infección está localizada en la bolsa del generador o el trayecto subcutáneo, se recomienda obtener muestra del exudado purulento por aspiración y si es posible, muestra de tejido. El propio dispositivo si es retirado total o parcialmente debe ser enviado para su procesamiento y en aquellos casos en los que existe infección focal del parénquima cerebral, debe

obtenerse material del absceso por punción aspiración o cirugía abierta.

Se desaconseja el empleo de torundas para la obtención de las muestras por su bajo rendimiento al obtener muy escaso volumen de muestra y ser muy frecuente la contaminación. Aunque infrecuente, se han descrito casos de infección por *Mycobacterium* spp., por lo que si se dispone de un volumen suficiente de muestra es aconsejable realizar tinciones y cultivo en medios específicos que permitan su identificación.

Cuando se produce la retirada total o parcial del dispositivo, se deben separar con bisturí estéril los tejidos adheridos al generador o al cable, que deben ser procesados por separado como si se tratara de una biopsia.

Tampoco existen datos que demuestren si el procesamiento del generador o del cable retirado presenta ventajas sobre el cultivo convencional de las muestras obtenidas por aspiración o biopsia. El procesamiento del electrodo intracerebral cuando se retira por sospecha de infección, no está estandarizado. Posiblemente, como sucede en todas las infecciones asociadas a biopelículas, el pretratamiento mediante sonicación que permite desagregar las bacterias de la biocapa, puede tener una mayor rentabilidad que el cultivo convencional. La agitación en vórtex de la muestra sumergida en tampón PBS, y el cultivo del material obtenido de la agitación puede ser una alternativa válida a la sonicación para aquellos laboratorios que no dispongan de baño sonicador.

2.5. INFECCIONES ASOCIADAS A IMPLANTES COCLEARES

2.5.1. Introducción

El implante coclear es un dispositivo electrónico capaz de sustituir la estimulación electroquímica que se produce en la cóclea cuando existe una disfunción de las células ciliadas. El dispositivo transforma las señales acústicas que recibe en señales eléctricas que estimulan directamente el nervio auditivo, sustituyendo la función dañada de la cóclea. Así, el implante, permite devolver la audición a las personas que padecen hipoacusia neurosensorial bilateral.

Los implantes cocleares se componen de dos partes: la interna y la externa. La parte interna se implanta mediante una intervención quirúrgica y está formada por una placa receptora que se sitúa debajo de la piel, sobre el hueso temporal y por unos electrodos que se insertan en la cóclea. La segunda parte del implante

coclear es un dispositivo externo. Éste consta de un micrófono/receptor, un procesador y una antena. Esta parte del dispositivo recibe el sonido y lo convierte en una señal eléctrica que se transmite a través de la piel, por frecuencias radiales, a la parte interna del implante coclear.

2.5.2. Epidemiología

La incidencia de infección asociada es baja, situándose entre el 1,6% y 10%. Las infecciones más frecuentes son las que afectan a la herida quirúrgica, seguidas por otitis media y las complicaciones derivadas de este proceso como mastoiditis o meningitis que se presentan con mayor frecuencia en niños que en adultos. Se han descrito diferentes factores de riesgo para el desarrollo de meningitis en estos pacientes, entre los que se incluye: edad inferior a 5 años, inmunodepresión, presencia de otras prótesis neurológicas como sistemas de derivación de LCR, otitis media postimplantación y malformaciones cocleares que predisponen al desarrollo de meningitis aún en ausencia de implantes.

Entre 1999 y 2002 se detectó un incremento de casos de meningitis en niños con implante coclear tanto en Europa como en Estados Unidos y Canadá, que se asociaron con un modelo específico de implante que fue retirado del mercado en 2002.

La recomendación actual para prevenir el desarrollo de otitis y meningitis es administrar a todos los candidatos, antes de la cirugía, la vacuna conjugada frente a neumococo y *Haemophilus influenzae* tipo b según las pautas establecidas y, anualmente la vacuna antigripal que reduce la incidencia de otitis media en niños durante el periodo estacional.

2.5.3. Etiopatogenia

S. aureus es la causa más frecuente de infección de la herida quirúrgica que, por contigüidad, puede extenderse al receptor; también por contigüidad, a partir de una otitis media, puede producirse infección del oído interno y del receptor. En este caso, son los patógenos respiratorios, especialmente, *S. pneumoniae* las causas más frecuentes de infección.

S. pneumoniae ha sido el agente causal más frecuente de otitis, meningitis y mastoiditis en pacientes con implante coclear. De momento, no se dispone de datos de frecuencia actualizados, pero es de esperar que la vacunación sistemática, antes de la cirugía, de los pacientes a los que se va a implantar este dispositivo disminuya las tasas de infección por este patógeno.

2.5.4. Manifestaciones clínicas

La infección superficial de la herida quirúrgica cursa con eritema, dolor, inflamación y supuración. En casos más graves suele haber fiebre y manifestaciones locales más evidentes, pudiendo llegar a producirse una dehiscencia de la herida con extrusión del dispositivo. Las manifestaciones clínicas de la otitis media, meningitis o mastoiditis asociadas al implante no difieren de las que se presentan en pacientes no portadores de estos implantes.

2.5.5. Diagnóstico microbiológico

Para el diagnóstico etiológico de la infección superficial o profunda de la herida quirúrgica, se recomienda obtener muestra del exudado purulento por aspiración y si es posible, muestra de tejido. No existe experiencia y se desconoce si el procesamiento del dispositivo interno, una vez retirado, aporta ventajas sobre el cultivo de muestras obtenidas por aspiración o biopsia. La obtención y procesamiento de muestras para realizar el diagnóstico microbiológico de las otitis, meningitis y mastoiditis asociadas debe hacerse siguiendo las recomendaciones establecidas en los diferentes procedimientos microbiológicos.

Si se retira el dispositivo, posiblemente, como sucede en todas las infecciones asociadas a biopelículas, el pretratamiento mediante sonicación o agitación, cuando no se disponga de baño sonicador, puede tener una mayor rentabilidad que otras técnicas de cultivo. No está recomendado sumergir los dispositivos en caldo de enriquecimiento para luego subcultivar, ni el uso de torundas que muestreen la superficie del dispositivo.

3. INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES

3.1. INFECCIONES ASOCIADAS A VÁLVULAS CARDIACAS PROTÉSICAS

3.1.1. Introducción

El reemplazamiento de válvulas cardiacas por material protésico ha supuesto un gran avance en el tratamiento de distintas enfermedades valvulares desde la década de los 60. Según datos de la Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular, en el año 2012 se implantaron 4.404 válvulas mecánicas, 4.854 bioprótesis valvulares, 1.677 anillos valvulares, 46 homoinjertos, 28 conductos valvulares, 95 conductos biológicos y 110 válvulas protésicas transcáteter (TAVI). La infección de las válvulas cardiacas protésicas (endocarditis proté-

sica o EIVP) no es muy frecuente, pero es una de las complicaciones más graves que pueden sufrir estos pacientes.

3.1.2. Epidemiología

La endocarditis infecciosa se presenta en el 1-6% de los pacientes portadores de válvulas protésicas y representa un 15-30% respecto al total de casos de endocarditis infecciosa. La mortalidad asociada varía en las distintas series entre un 20-40% y depende de las condiciones de base de los pacientes y el tratamiento recibido.

La incidencia EIVP oscila entre un 0,3 y 1,2% paciente/año, siendo mayor durante los 3 primeros meses después de la cirugía y estabilizándose después de un año, en cifras que oscilan entre un 0,3-0,6%. En los primeros meses tras la implantación, la EIVP parece afectar más a las válvulas protésicas de tipo mecánico que a las bioprótesis, aunque no hay estudios concluyentes en este sentido. Tampoco hay muchos estudios que comparen las prótesis mecánicas, las bioprótesis y las válvulas de implantación transcáteter (TAVI) que se están utilizando en la última década en pacientes no operables por toracotomía. Parece haber una mayor incidencia de EIVP en pacientes con varios recambios valvulares y sobre todo en los que ya han sufrido un episodio previo de endocarditis infecciosa. Otros factores de riesgo incluyen la hospitalización, la necesidad de catéteres intravasculares y la hemodiálisis.

3.1.3. Patogenia

La endocarditis infecciosa es un proceso en el que participan 3 factores: el daño tisular presente en el endotelio cardiaco, la virulencia del microorganismo causante y la inmunidad del paciente.

La patogenia de la EIVP es parecida a la de la endocarditis sobre válvula natural (EIVN) pero más compleja, al estar presente un material protésico. La presencia de la prótesis condiciona alteraciones hemodinámicas que contribuyen aún más al daño tisular y favorecen la infección por microorganismos que alcanzan la prótesis durante la cirugía o posteriormente por vía hematogena. Cuando la infección evoluciona aparecen verrugas protésicas que son una mezcla de gran cantidad de microorganismos y agregados fibrino-plaquetarios.

3.1.4. Clasificación

Las EIVP se clasifican generalmente en precoces o tardías, en función de si el tiempo transcurrido desde la cirugía de implantación es mayor o menor de 12 meses. Esta diferenciación tiene importancia debido

a la diferente etiopatogenia que tiene lugar en ambos periodos y que estaría relacionada con el mecanismo de adquisición de la infección.

En las EIVP precoces se supone que la infección se adquiere durante la cirugía o en el periodo perioperatorio, mientras que en las formas tardías la infección se adquiere en el ambiente comunitario y estaría asociada a bacteriemias transitorias u otros procesos infecciosos. En los últimos años, se ha documentado una disminución de las EIVP precoces del 60% al 10-20% con el correspondiente aumento de la tardía, posiblemente motivado por el mejor uso de la profilaxis anti-biótica y la mejora de las técnicas quirúrgicas.

3.1.5. Etiología

En principio cualquier microorganismo podría producir una EIVP, sin embargo en la etiología de la endocarditis infecciosa en general predominan las bacterias y principalmente los cocos grampositivos. En la EIVP precoz predomina *S. aureus* y en menor proporción los estafilococos coagulasa negativa (ECN) destacando entre ellos *S. epidermidis*. Sin embargo, en las formas tardías la proporción de cada uno de ellos es similar.

Tras los estafilococos las bacterias más frecuentes son los enterococos sobre todo en las EIVP tardías y principalmente *E. faecalis*. Entre los estreptococos, los del grupo *viridans* son los predominantes y *S. bovis* está experimentando un aumento en los últimos años, muy posiblemente asociado a bacteriemias de origen intestinal. *S. pneumoniae*, los estreptococos beta-hemolíticos (sobre todo *S. agalactiae*) y los géneros *Abiotrophia* y *Granulicatella* pueden también causar EIVP, sobre todo tardía, pero en mucha menor proporción que los estreptococos del grupo *viridans*.

En general la distribución de microorganismos en la EIVP tardía se aproxima a la EIVN, aunque la proporción de ECN siempre es mayor en la EIVP que en la EIVN. En las EIVP de origen nosocomial predominan SARM, ECN, enterococos e incluso enterobacterias.

La EIVP con hemocultivos negativos suele representar un 5-10% de los casos y se puede producir en ambos periodos, sobre todo por la administración de tratamiento antibiótico antes de tomarse los hemocultivos. Los patógenos de cultivo difícil (*Tropheryma whippelii*, *Bartonella* spp. *Coxiella burnetii*) pueden infectar válvulas protésicas al igual que válvulas naturales, aunque sólo *C. burnetii* y *Bartonella henselae* parecen tener una mayor tendencia a causar EIVP. Las micobacterias no tuberculosas, *Corynebacterium* spp., *Listeria mo-*

nocytogenes y otros microorganismos, también son causa poco frecuente de EIVP al igual que en válvulas naturales.

La endocarditis fúngica es poco frecuente, tanto sobre válvula natural como protésica y cuando se produce se asocia a una elevada mortalidad y a verrugas de gran tamaño. Las levaduras del género *Candida* y sobre todo *Candida albicans* predominan, con respecto a otros géneros y a los hongos filamentosos, entre los que predomina *Aspergillus fumigatus*.

3.1.6. Diagnóstico clínico

Desde el punto de vista clínico, no hay criterios que permitan establecer el diagnóstico de endocarditis infecciosa con absoluta seguridad y se debe hacer con una valoración en conjunto de las manifestaciones clínicas, resultados de los estudios ecocardiográficos (combinando ecografía transtorácica y transesofágica) y desde el punto de vista microbiológico, sobre todo de los resultados de los hemocultivos y en menor medida de otros estudios microbiológicos, como se describe más adelante.

Al igual que en la EIVN los criterios que se aplican para el diagnóstico de EIVP son los llamados criterios de la universidad de Duke que se establecieron en 1994 y se modificaron en 2000.

Los criterios modificados de Duke establecen las categorías de diagnóstico definitivo, posible o rechazado en función sobre todo de datos ecocardiográficos y microbiológicos, asociados a algunos datos clínicos. Estos criterios tienen una sensibilidad del 70-80% en el diagnóstico de EIVP que es menor que en EIVN.

Escapa al objetivo de este procedimiento realizar una descripción detallada del diagnóstico no microbiológico de la EIVP.

3.2. INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS DE ELECTROESTIMULACIÓN

3.2.1. Introducción

En las últimas décadas las mejoras técnicas y la reducción del tamaño de los distintos dispositivos de electroestimulación cardiaca (DEC) como los marcapasos (MCP), desfibriladores automáticos implantables (DAI) y dispositivos de resincronización cardiaca (TRC), han permitido el tratamiento de trastornos de la conducción cardiaca en un gran número de pacientes. El número absoluto de infecciones de estos dispositi-

vos ha aumentado considerablemente, al implantarse más dispositivos. La Sociedad Española de Cardiología calcula que en los años 2012-2013 se implantaron en España unos 35.000 MCP, 5.500 DAI y 710 TRC.

3.2.2. Epidemiología

La incidencia de infecciones de los DEC es difícil de establecer debido a la falta de registros. Se ha calculado que la incidencia de infección de este tipo de dispositivos está entre 0,8 y 5,7% y afecta a 1,9 por cada 1000 dispositivos-año, siendo mayor en los pacientes que han requerido una reimplantación del sistema. La infección es más frecuente en los DAI que en los marcapasos y el factor de riesgo principal es la manipulación reciente o recambio del sistema. Otros factores que influyen en la probabilidad de sufrir una infección, reflejan las condiciones de base del paciente como diabetes, neoplasias, edad avanzada, el tratamiento con anticoagulantes o corticoides y la insuficiencia renal. La presencia de fiebre 24 h antes de la implantación también se ha asociado con mayor riesgo de infección.

3.2.3. Patogenia

La contaminación del dispositivo se puede producir durante la implantación o posteriormente debido a las manipulaciones del sistema o a erosiones de la piel que cubre el generador y puede afectar a éste y la bolsa en la que se inserta, a los cables que se introducen en el endocardio, o a ambos. En este sentido los microorganismos que llegan al material serán los de la piel circundante a la zona de inserción del DEC.

Las infecciones de la bolsa pueden posteriormente extenderse por contigüidad desde el generador a los cables. La adquisición hematológica de la infección es menos frecuente, ya que en general los cables en el trayecto endovascular se endotelizan al poco tiempo de su implantación. Esta vía de contaminación se ha descrito sobre todo en bacteriemias por *S. aureus*.

Al igual que ocurre con las válvulas cardíacas protésicas o con otros materiales protésicos la infección es el resultado de la interacción de los microorganismos, el material del que está hecho el dispositivo y las condiciones del paciente. De este modo, son principalmente los cocos grampositivos los que poseen la capacidad de adherirse a materiales protésicos o a las células endoteliales que los recubren y causan con más frecuencia este tipo de infecciones.

3.2.4. Clasificación y manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas y la gravedad de este tipo de infecciones van a depender del microorganismo in-

fectante, del lugar de la infección y de si hay bacteriemia o endocarditis asociada. Según el tiempo que tarde en aparecer la infección después de la implantación del sistema, se pueden clasificar en precoces, si aparecen antes de las 6 primeras semanas tras la implantación y tardías si la infección ocurre después y según la sintomatología en agudas o crónicas.

La infección superficial es la más frecuente, mientras que la infección endovascular es la más grave, ya que puede dar lugar a una endocarditis infecciosa. La afectación del bolsillo del generador representa un 60% de todos los casos. La infección superficial suele cursar con eritema, dolor, inflamación y pus. A veces si la infección es precoz se produce dehiscencia de las suturas de la herida quirúrgica. Los casos graves son raros y se asocian con manifestaciones sistémicas, suelen aparecer sobre todo en infecciones precoces por *S. aureus* y en ocasiones cursan con bacteriemia. Si la infección es más profunda y afecta al trayecto subcutáneo los síntomas son similares pero suelen cursar con fiebre y afectación local más evidentes.

La segunda manifestación más frecuente es la bacteriemia o fungemia "ocultas" de curso subagudo y persistente, que no se asocian a manifestaciones locales y suelen deberse a afectación de la porción endovascular de los cables. En ocasiones estas infecciones tienen un curso agudo con fiebre, escalofríos e incluso sepsis o shock séptico.

La tercera presentación en frecuencia es la endocarditis, que aparece en 10-23% de los casos y que puede presentarse con vegetaciones en los cables o afectar a la válvula tricúspide e incluso a las cavidades izquierdas.

3.2.5. Etiología

Los microorganismos descritos con más frecuencia son *S. aureus* (que predomina en las infecciones precoces) y ECN (que predomina en las infecciones tardías, sobre todo *S. epidermidis*), aunque su proporción varía en los distintos estudios. Con menor frecuencia se encuentran otro tipo de bacterias como *Corynebacterium* spp. y *Enterococcus* spp., los estreptococos del grupo *viridans* son poco frecuentes al contrario que en las EIVN y EIVP, mientras que las enterobacterias y *P. aeruginosa*, son más frecuentes que en las EIVP. Los hongos también pueden producir infección de estos DEC sobre todo *Candida* spp. y con menor frecuencia *Aspergillus* spp. La infección por *P. acnes* no es infrecuente y produce infecciones de curso crónico y larga evolución.

3.2.6. Diagnóstico clínico

Se debe sospechar una infección del dispositivo en pacientes portadores de DEC con cualquiera de las manifestaciones comentadas en la sección anterior y en pacientes sin síntomas locales pero con fiebre, sobre todo si hay bacteriemia asociada sin otro foco y principalmente si están causadas por *S. aureus* o ECN. En caso de bacteriemias con otro origen, se debería descartar que no haya afectación del dispositivo. Los criterios de Duke son aplicables pero tienen poca sensibilidad y especificidad. La ecografía transesofágica permite en ocasiones detectar verrugas adheridas a los cables pero puede tener falsos negativos. La utilidad de otras técnicas de imagen como el PET-TAC está aún por determinar.

3.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A VÁLVULAS CARDIACAS PROTÉSICAS Y DISPOSITIVOS DE ELECTROESTIMULACIÓN CARDIACA

Se consideran muestras adecuadas para realizar el diagnóstico microbiológico de estas infecciones, las muestras de sangre (inoculada en frascos de hemocultivos, suero, o sangre completa para métodos moleculares), los propios implantes retirados mediante cirugía, las verrugas y tejidos adheridos al material protésico retirado, las muestras de abscesos periprotésicos y el material purulento de las bolsas de marcapasos. A continuación se describen las técnicas microbiológicas que permiten el diagnóstico de estas infecciones

3.3.1. Hemocultivos

El hemocultivo continúa siendo la principal herramienta microbiológica para el diagnóstico de este tipo de infecciones. La positividad del hemocultivo está incluida dentro de los criterios mayores de Duke y proporciona el diagnóstico etiológico en un 80% de las EIVP y en menor proporción en las infecciones asociadas a DEC, en las que los hemocultivos son positivos en un 20-70% de los casos. Las infecciones que afectan sólo al bolsillo y trayecto subcutáneo de los cables son bacteriémicas con una frecuencia de 15-30%, siendo más elevado el porcentaje cuando se afecta el trayecto endovascular y sobre todo si existe endocarditis asociada.

La principal razón para la negatividad de los hemocultivos es el tratamiento antibiótico previo de los pacientes. Con los sistemas actuales de hemocultivos se ha mejorado la recuperación de microorganismos

exigentes como HACEK, *Abiotrophia* spp., o *Granulicatella* spp.

Para la obtención, procesamiento e interpretación de hemocultivos se deben seguir las normas generales recogidas en el procedimiento microbiológico SEIMC, 3a «Hemocultivos».

El empleo del método de lisis centrifugación no aporta claros beneficios sobre los hemocultivos convencionales y sólo se ha recomendado ante la sospecha de *Bartonella* spp. y posiblemente para algunos hongos filamentosos. En pacientes con alta sospecha clínica de bacteriemia o endocarditis infecciosa y hemocultivo negativo, es conveniente realizar un subcultivo de salida a las botellas negativas a medios enriquecidos para microorganismos exigentes como *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp, etc., que aunque muy raros si se han descrito en este tipo de infecciones. Si se dispone de métodos moleculares podría ser conveniente realizar métodos de biología molecular con amplificación mediante técnicas de PCR específicas o universales, para detectar ADN de microorganismos que no crecen o no producen suficiente CO₂ para positivar los hemocultivos que emplean este sistema de detección del crecimiento.

3.3.2. Cultivo de válvulas cardiacas protésicas

El resultado del cultivo de válvulas cardiacas se considera uno de los principales criterios de Duke (criterios anatomopatológicos) para el diagnóstico de endocarditis infecciosa. Sin embargo, diferentes trabajos realizados con válvulas naturales y protésicas han demostrado su escasa sensibilidad (25%) y especificidad (72%). Los resultados falsos negativos del cultivo, se deben sobre todo a la administración previa de antibióticos y los falsos positivos se producen por contaminación de la muestra durante la obtención o el procesamiento, sobre todo cuando se emplean medios líquidos de enriquecimiento y larga incubación.

El principal interés del cultivo valvular es saber si el microorganismo causante de la endocarditis (diagnosticado por hemocultivo) es viable o no en el momento de la cirugía y así poder valorar la eficacia del tratamiento. Antes de procesar la válvula se debe realizar una inspección cuidadosa para retirar el tejido adherido como verrugas y restos del tejido que rodea al anillo. Estos tejidos deben ser procesados por separado como una biopsia.

El procesamiento de las válvulas retiradas debe realizarse mediante una técnica de sonicación o agitación

para desagregar la biocapa de la superficie. A partir del sedimento del producto de la sonicación, se debe realizar cultivo cuantitativo (ver PNT-DBM-01 de este procedimiento).

En el caso de las válvulas bioprótésicas y las TAVI que tienen una parte rígida recubierta de tejido porcino o bovino, se debe retirar el tejido y procesarlo como una biopsia.

Es importante conservar archivados a -70°C un fragmento de tejido y una alícuota del sonicado de las válvulas por si hubiera que hacer estudios complementarios principalmente moleculares, cultivo de micobacterias, etc.

La interpretación de los cultivos se debe realizar en conjunto con los datos clínicos, los resultados de los hemocultivos y, cuando se realicen, de los estudios moleculares.

Los aislados de los cultivos obtenidos únicamente en medios de enriquecimiento se deben interpretar con precaución sobre todo en el caso de ECN, *P. acnes* y *Corynebacterium* spp. y se deberían considerar contaminantes si los hemocultivos han sido negativos y los estudios moleculares realizados en las válvulas también. Los hemocultivos y los estudios moleculares en válvula cardíaca tienen gran especificidad al contrario que los cultivos de la propia válvula.

3.3.3. Cultivo de dispositivos de electroestimulación

Cuando la infección está localizada en el bolsillo o el trayecto subcutáneo se recomienda la toma de tejido o material purulento por aspiración. Cuando se produce la retirada completa o parcial del material protésico se deben retirar los tejidos adheridos al generador o a los cables y por supuesto las verrugas, y se deben procesar por separado como biopsias.

Se recomienda la sonicación del generador y los cables, siendo estos últimos los que han mostrado un mayor rendimiento diagnóstico. El uso de medios de enriquecimiento es conveniente, para la recuperación de microorganismos exigentes, pero los resultados se deben interpretar con precaución.

3.3.4. Serología

La serología tiene una utilidad muy limitada en el diagnóstico de las infecciones de materiales protésicos intracardiacos. Sin embargo, es un método sencillo y no demasiado caro que en ocasiones puede ayudar al

diagnóstico de la endocarditis sobre válvula protésica y en menor medida en las infecciones de DEC.

Dentro de los criterios de Duke para el diagnóstico de endocarditis infecciosa sólo la serología positiva de fase I de *C. burnetii* (infección crónica) con títulos mayores de 1/800 se ha considerado un criterio mayor. Desde que existen métodos moleculares de diagnóstico, el número de casos de endocarditis por *Legionella* spp. o *Mycoplasma* spp. se ha reducido considerablemente (en épocas anteriores diagnosticados sólo por serología) y algunos autores postulan la posibilidad de falsos positivos o serología positiva en pacientes con endocarditis infecciosa de otra etiología, otros autores han planteado reacciones cruzadas con *Bartonella* spp. y otros microorganismos.

3.3.5. Diagnóstico molecular

Los métodos moleculares basados en técnicas de PCR son tras el hemocultivo la herramienta microbiológica más útil en cuanto a rendimiento diagnóstico. Permiten la identificación de microorganismos en casos de infección cuando el hemocultivo es negativo, bien por la presencia de microorganismos de cultivo difícil o bien por el tratamiento antibiótico previo de los pacientes, que inhibe el crecimiento microbiano pero no hace desaparecer su ADN.

La mejor estrategia diagnóstica es el empleo de PCRs universales del gen 16S ARNr basadas en la amplificación del gen que codifica para el ADN ribosomal 16S, y posteriormente por secuenciación y comparación de secuencias con bases de datos, identificar la bacteria presente en la muestra. Cuando se emplea en válvulas cardíacas (alta carga de microorganismos) este tipo de PCR tienen una elevada sensibilidad (70-97%) y especificidad (91-100%). En el caso de hongos, se emplean PCRs universales que amplifican la región intergénica entre el ADN ribosomal 18S-28S.

Su empleo en infecciones de DEC (abscesos, material purulento y sonicados de implantes) ha demostrado su utilidad y actualmente se recomienda como complemento del hemocultivo y los cultivos de sonicados.

Las PCRs universales tienen como principal inconveniente su baja sensibilidad analítica (>100 UFC/mL) que no permite detectar bacterias/hongos directamente en sangre periférica, con lo que su utilidad queda limitada a pacientes en los que es necesaria la cirugía. Otro de los inconvenientes de este tipo de PCRs es que al detectar "cualquier bacteria" se pueden contaminar

Tabla 1. Métodos comerciales para la detección de microorganismos directamente en sangre periférica.

Técnica	Fundamento	Microorganismos detectados	Genes de resistencia	Tiempo de respuesta	Tiempo de trabajo	S %	E %
Septifast (Roche)	PCR universal ITS ARNr en tiempo real y sondas FRET	25 bacterias 6 hongos	<i>mecA</i>	4-5 h	Medio	60-95	74-99
Sepsitest (Molzym)	PCR universal en tiempo real y secuenciación	54 bacterias y 5 hongos	No	24 h	Alto	61-88	83-85
VYOO (SIRSlab)	PCR multiplex 16S y 18S+electroforesis	34 bacterias (anaerobios) y 7 hongos	<i>mecA, vanA, vanB</i>	6-8 h	Medio-Alto	30-51	---
PlexID (Abbot)	PCR universal ARNr y multiplex. Detección por electropray-masas	>300 bacterias-hongos	<i>mecA, vanA, vanB, carba-penemasas</i>	5-6 h	Medio	50-86	94

S: sensibilidad; E: especificidad

fácilmente y deben ser realizadas por personal con experiencia en su manejo e interpretación. Además, al haber pocos diseños comerciales se deben hacer en la mayoría de las ocasiones mediante “PCRs caseras” con los inconvenientes que ello conlleva. Otro de los inconvenientes es que no permiten detectar infecciones polimicrobianas.

El empleo de PCRs específicas para microorganismos no cultivables (*T. whipplei*, *C. burnetii*, *Bartonella* spp.) realizados en cualquier muestra relacionada con la infecciones intracardiacas, se ha propuesto también como criterio mayor de Duke. Se suelen realizar mediante PCRs caseras (no hay diseños comerciales) a tiempo real con sondas y tienen la ventaja de su alta sensibilidad y por tanto se pueden hacer en sangre periférica, con lo que no es necesaria la obtención de la válvula cardiaca. Aunque el rendimiento en esta última es siempre mayor por la elevada concentración de microorganismos.

En las diferentes guías de diagnóstico de endocarditis infecciosa, se han incorporado las PCRs específicas para microorganismos “no cultivables” al algoritmo diagnóstico de los casos con hemocultivo negativo.

En los últimos años se han desarrollado métodos para detectar bacterias y hongos en un tiempo corto y con relativa poca manipulación en muestras de sangre anticoagulada con EDTA (tabla 1). Estos métodos serían

complementarios al hemocultivo que continúa siendo imprescindible para obtener los microorganismos en cultivo y realizar las pruebas de sensibilidad. Aún hay poca experiencia en el uso rutinario de estos métodos para diagnosticar pacientes con bacteriemia y no hay casi ninguna publicación en endocarditis o bacteriemia asociada a DEC.

4. INFECCIONES ASOCIADAS A OTROS DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES

4.1. INFECCIONES ASOCIADAS A PRÓTESIS VASCULARES

4.1.1. Introducción

Las prótesis vasculares marcan uno de los hitos más importantes dentro de la cirugía vascular reconstructiva y han cambiado la historia natural de la patología vascular. Actualmente se estima que aproximadamente 650.000 prótesis arteriales de material sintético son implantadas anualmente en EE.UU. Desafortunadamente, las prótesis vasculares se asocian con complicaciones importantes, siendo la infección una de las más temidas al conllevar una elevada morbi-mortalidad. A pesar de las mejoras de las técnicas quirúrgicas, composición de las prótesis y profilaxis antibiótica la incidencia de infección se sitúa en torno al 6% con una mortalidad que oscila entre 15 y 48% y una tasa de amputaciones entre el 8% y el 52%.

4.1.2. Etiopatogenia

Las vías de infección incluyen, la colonización del material durante la cirugía o manipulaciones postquirúrgicas, la infección por contigüidad a partir de la herida quirúrgica o del tubo digestivo en la aorta abdominal y aunque infrecuentemente, la diseminación hematogénea. Entre los factores de riesgo de infección se encuentran: el tipo de prótesis y la localización de la cirugía. En este sentido, la incidencia de infección de una prótesis abdominal es inferior al 1%, en muchas de las series publicadas, y aumenta hasta el 6% en las prótesis femoropoplíteas o cuando se trata de un aneurisma. La tasa de infección de las prótesis arteriovenosas empleadas en pacientes en hemodiálisis se sitúa en torno al 3,5%. Otros factores de riesgo conocidos son la diabetes, obesidad, insuficiencia renal y las revisiones quirúrgicas, especialmente en los 30 primeros días. También se han señalado como posibles factores de riesgo, las infecciones de otra localización en el periodo postquirúrgico inmediato, especialmente las asociadas a catéteres centrales, la prolongación del tiempo quirúrgico y la mayor amplitud de la herida quirúrgica.

La contaminación del material protésico durante la cirugía es el mecanismo más frecuente de infección. Las bacterias que colonizan la prótesis proliferan en la zona de unión entre el material protésico y la arteria y progresan a través de la superficie externa del vaso originando una colección purulenta que rodea la prótesis. Los cocos grampositivos, especialmente *S. aureus* y los ECN, principalmente *S. epidermidis*, poseen una gran capacidad para adherirse a materiales protésicos o a las células endoteliales que los recubren y son la causa más frecuente de estas infecciones, representando en algunas series el 40% de todas las etiologías; otro 18% estarían causadas por estreptococos. Entre las bacterias gramnegativas, *P. aeruginosa* es la más frecuentemente aislada (18%). En las prótesis intraabdominales, cuando se produce una comunicación entre la prótesis y el intestino, las infecciones son polimicrobianas en el 15-30% de los casos. Las infecciones por hongos y micobacterias, aunque han sido descritas, resultan excepcionales. En los pacientes con insuficiencia renal, sometidos a hemodiálisis a través de una prótesis arteriovenosa, el microorganismo implicado con mayor frecuencia es *S. aureus*, seguido por *S. epidermidis* y enterobacterias.

4.1.3. Manifestaciones clínicas

Los signos y síntomas específicos de la infección de la prótesis vascular incluyen la formación de abscesos, erosión o fistulización, embolismos sépticos, oblite-

ración, disrupción de las anastomosis, formación de pseudoaneurismas, exposición de la prótesis y /o bacteriemia. Las infecciones de las prótesis que atraviesan la zona inguinal se manifiestan precozmente y la forma de presentación más frecuente es la aparición de una tumoración inguinal dolorosa y eritematosa, en ocasiones con un trayecto fistuloso. La infección de las prótesis de aorta abdominal puede presentarse con dolor abdominal o dorsal y sintomatología derivada de la compresión de estructuras próximas como los uréteres. En el 30% de las infecciones de prótesis aortica, se presenta una fistula aortoentérica. Los signos y síntomas generales son más variables y están en relación con la virulencia del microorganismo causal; así, en el caso de infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa* las manifestaciones locales y sistémicas de infección suelen ser agudas mientras que las producidas por ECN tienen un curso más subagudo y silente.

El manejo de las infecciones asociadas a prótesis vasculares es controvertido. La retirada del injerto vascular infectado seguido de revascularización está asociada a una alta incidencia de amputaciones y mortalidad, en parte debido a la alta asociación de comorbilidades vistas en esta población de pacientes. Las complicaciones asociadas con la retirada del injerto vascular, han hecho considerar estrategias conservadoras en este tipo de pacientes, manteniendo, si es posible la prótesis o realizando una escisión parcial. En líneas generales, en las infecciones que cursan con sepsis grave o dehiscencia de anastomosis se requiere la retirada de la prótesis mientras que cuando se produce oclusión sin afectar las anastomosis se puede realizar una escisión parcial de la porción ocluida. En ausencia de signos de sepsis y con anastomosis intactas puede conservarse la prótesis.

4.1.4. Diagnóstico clínico

La infección se sospecha por la presencia de alguno de los signos o síntomas sistémicos o locales mencionados, sobre todo si hay bacteriemia asociada por *S. aureus* o ECN sin otro foco. Los estudios de imagen, TAC y RMN permiten detectar colecciones alrededor de la prótesis, presencia de gas o aneurismas anastomóticos que son indicativos de infección. Con la TAC puede obtenerse muestra por aspiración de las colecciones periprotésicas para realizar el diagnóstico microbiológico.

4.1.5. Diagnóstico microbiológico

Los hemocultivos suelen ser negativos puesto que la infección inicialmente no afecta la luz de la prótesis.

Las muestras que permiten realizar el diagnóstico etiológico son el aspirado de las colecciones y la propia prótesis si es retirada total o parcialmente.

Cuando existen signos locales de infección debe obtenerse, por aspiración muestra del material drenado para tinción de Gram y cultivo para bacterias aerobias y anaerobias. Cuando se produce la retirada completa o parcial del material protésico, se deben retirar los tejidos adheridos y se deben procesar por separado para cultivo y tinción de Gram, aunque suelen tener un escaso rendimiento. Al estar los microorganismos incorporados en una biocapa en la superficie de la prótesis, se recomienda el cultivo tras sonicación para incrementar la rentabilidad.

4.2. INFECCIONES ASOCIADAS A TIPS (*Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt*) O ENDOTIPSITIS

Estos dispositivos intravasculares se emplean para el tratamiento de las complicaciones de la hipertensión portal como alternativa a la cirugía de derivación porto-cava. La infección del TIPS (endotipsitis) es una complicación infrecuente, alrededor del 1,3%, pero extraordinariamente grave.

El diagnóstico definitivo de endotipsitis incluye la existencia de bacteriemia continua demostrada por hemocultivos positivos, fiebre y presencia de vegetaciones o trombosis del TIPS. El diagnóstico de infección probable incluye sólo la presencia de bacteriemia y fiebre con un *shunt* aparentemente normal y ausencia de otro foco de infección. De forma similar a otras infecciones endovasculares, se considera infección precoz aquella que aparece en los primeros 120 días desde la implantación del dispositivo e infección tardía la que se manifiesta después de este periodo.

En la infección precoz los agentes causales más frecuentemente encontrados han sido bacterias grampositivas mientras que, en infecciones tardías hay un predominio de enterobacterias. También se han descrito casos de infección por levaduras e infecciones polimicrobianas. El diagnóstico se establece por hemocultivo, excluyendo otros focos de infección.

No es posible la retirada del dispositivo salvo que se realice un trasplante hepático o en autopsia. En estos casos, el dispositivo debe procesarse igual que los otros dispositivos intravasculares.

5. PROCESAMIENTO GENERAL DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE INFECCIONES ASOCIADAS A DISPOSITIVOS BIOMÉDICOS

5.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se consideran muestras adecuadas para realizar el diagnóstico microbiológico, las muestras de colecciones y abscesos peri-implante, las biopsias de tejido peri-implante y el propio implante. En infecciones asociadas a válvulas cardíacas y DEC debe obtenerse siempre muestra de sangre para hemocultivo, serología y diagnóstico molecular.

En general no se consideran muestras válidas los exudados obtenidos a través de fístulas recogidos con torunda. Las muestras se deben obtener antes del inicio del tratamiento antibiótico y si este ha comenzado y clínicamente es posible, debe interrumpirse un mínimo de dos semanas antes de obtener la muestra. En ocasiones puede resultar imposible obtener una muestra para estudio microbiológico, sobre todo en algunas infecciones precoces que cursan como celulitis y en las que no existan colecciones subsidiarias de ser puncionadas, o en las infecciones tardías que cursan con dolor o deformidad estética. En este último caso puede que la única muestra que se pueda enviar para estudio microbiológico sea el propio implante.

Las muestras se deben obtener en las mayores condiciones de asepsia, realizando previamente una correcta desinfección de la piel y manipulándolas lo menos posible. Una vez obtenidas, las muestras se introducirán en contenedores estériles con cierre hermético que sean apropiados a su tamaño y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad, sin añadir formol ni otros conservantes. En el caso de sospecha de infección por hongos o micobacterias las muestras no se deben introducir en medios de transporte para anaerobios.

Dado que estas muestras suelen ser de difícil obtención, con riesgos para el paciente, y en muchas ocasiones insustituibles, debe indicarse a los servicios peticionarios que antes de realizar la obtención se pongan en contacto con el laboratorio de Microbiología, para evitar posibles errores y orientar el procesamiento de la muestra en base a la sospecha clínica.

A continuación se definen una serie de recomendaciones generales según el tipo de muestra:

5.1.1. Muestras de colecciones y abscesos periimplante

Se obtienen por aspiración con jeringa y aguja durante la cirugía o bien guiada por imagen. La muestra obtenida se debe inocular en un medio de transporte adecuado como un contenedor con medio de transporte para anaerobios o en un tubo estéril. Se recomienda obtener un volumen de muestra entre 1 y 5 mL.

5.1.2. Biopsias de tejidos

Se obtienen habitualmente mediante cirugía. Se recomienda obtener una pieza de al menos 5-10 mm². Las muestras se introducirán en recipientes estériles de tamaño adecuado y cierre hermético. Las biopsias se pueden sumergir en suero salino estéril para evitar su desecación. Si es posible, es recomendable el envío de más de 1 muestra, aunque no hay estudios que indiquen cual es el número de muestras adecuado. Sin embargo, por analogía con la infección protésica articular, parece lógico que, dado que los microorganismos que causan este tipo de infecciones son contaminantes habituales de muestras clínicas, el diagnóstico será más fiable si se aísla el mismo microorganismo en dos o más muestras.

5.1.3. Sangre

Se debe obtener muestra de sangre para hemocultivo en todos los pacientes que presenten signos o síntomas de infección sistémica. En infecciones asociadas a válvulas cardíacas protésicas y DEC, además se obtendrá muestra de sangre para serología y sangre total para estudios moleculares.

5.1.4. Implantes

Tras la explantación en quirófano el implante se deberá manejar con las máximas condiciones de asepsia, introduciéndolo en contenedores estériles que se cerrarán de forma hermética. No se añadirá ningún medio de transporte ni conservante. Cuando se produce la retirada total o parcial del dispositivo, se deben separar con bisturí estéril los tejidos adheridos al mismo y procesarlos por separado como si se tratara de una biopsia.

5.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El envío de las muestras al laboratorio debe ser inmediato. El procesamiento de las muestras se realizará lo más rápidamente posible. Cuando no es posible el procesamiento inmediato, las muestras se conservarán refrigeradas a 2-8°C hasta que sean procesadas, nunca más de 24 horas tras la obtención. Las mues-

tras en medio de transporte para anaerobios se deben mantener a temperatura ambiente. En ningún caso se pueden congelar las muestras salvo aquellas en que se solicitan estudios moleculares.

5.3. RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

El manejo de la muestra a su llegada al laboratorio, implica el cumplimiento de los requisitos de calidad de la muestra para ser procesada, como se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología".

5.3.1. Criterios de rechazo

Cada laboratorio debe elaborar y distribuir los criterios de rechazo de las muestras que incumplan los requisitos de calidad establecidos. Debe emitirse un informe escrito en el que se detallen los motivos de rechazo de la muestra.

En general, las discrepancias entre la identificación de la muestra y la identificación en la petición serán motivo de rechazo, aunque se debe consultar previamente con el clínico responsable de la solicitud. Se rechazarán las muestras remitidas en formol o conservantes similares. Si se reciben muestras en torunda se añadirá a los resultados un comentario sobre sus limitaciones y las precauciones de interpretación de los resultados obtenidos. Si la muestra es insuficiente para todas las determinaciones solicitadas, se contactará con el clínico responsable de la petición para decidir cuáles son las más importantes y para las restantes, se indicará en el informe "muestra insuficiente".

5.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El pre-tratamiento de las muestras se recoge en la sección 7.2.1. del Procedimiento en Microbiología 1a de la SEIMC "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología". Las muestras deberán ser procesadas con la mayor brevedad posible en una cabina de bioseguridad siguiendo las recomendaciones recogidas en el Procedimiento en Microbiología 10a de la SEIMC "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". En caso de sospecha de infección por hongos o micobacterias se seguirán las recomendaciones de los Procedimientos en Microbiología de la SEIMC 9a "Micobacterias" y 21 "Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos".

El laboratorio someterá a la muestra a un procesamiento en función de sus protocolos de trabajo y de la información que aporta el servicio solicitante sobre la muestra y el paciente. Por tanto, el procesamiento dependerá de varios factores:

- Petición del servicio solicitante
- Tipo de muestra
- Técnica de obtención
- Sospecha diagnóstica
- Enfermedad de base del paciente
- Motivo de petición

Según el tipo de infección y la muestra recibida, el personal del laboratorio de Microbiología podrá completar los estudios solicitados, con las determinaciones que se consideren convenientes. Es conveniente conservar una porción de las muestras refrigeradas durante al menos siete días por si se necesitara realizar comprobaciones o estudios posteriores. Las muestras para estudios moleculares pueden conservarse congeladas a -70°C .

A todas las muestras se les realizará tinción de Gram y para cada muestra específica se tendrán en cuenta las siguientes recomendaciones:

5.4.1. Muestras de colecciones y abscesos periimplante

La siembra se realiza inoculando con pipeta estéril los medios de cultivo. Si el material es demasiado denso, la inoculación de los medios se hará con un asa de siembra.

Si la muestra se recibe en un contenedor de transporte para anaerobios (portagerm o similar), se extraerá con jeringa previa desinfección del tapón con povidona yodada.

5.4.2. Biopsias de tejidos

Según su tamaño, las muestras de biopsias se deben cortar en trozos en una placa de Petri estéril con un bisturí estéril. Los distintos fragmentos se deben homogeneizar en un homogeneizador tipo stomacher o en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina o caldo BHI, antes de su siembra en los medios de cultivo. Ante la sospecha de infección por micobacterias, emplear agua destilada estéril.

Las extensiones para tinciones pueden realizarse mediante impronta sobre el portaobjetos o bien a partir de la muestra homogeneizada.

La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el homogenizado a los medios de cultivo.

El procesamiento de estas muestras se encuentra detallado en el PNT-DBM-03 de este procedimiento.

Si se dispone de técnicas moleculares, de los tejidos adheridos a válvulas cardíacas protésicas o DEC, se separará una parte para cultivo y otra para realizar PCR universal 16S ARNr y, si es posible, otra parte de la muestra se conservará en archivo a -70°C (ver PNT-DBM-02 de este procedimiento).

5.4.3. Implantes

El procesamiento de los dispositivos explantados debe realizarse mediante una técnica de sonicación o agitación que permite desagregar la biocapa de la superficie del implante. El procesamiento debe llevarse a cabo en campana de bioseguridad.

La técnica de sonicación se describe detalladamente en el PNT-DBM-01 de este procedimiento. Brevemente, para implantes grandes como prótesis mamarias, se añadirán 400 ml de solución Ringer lactato o PBS al recipiente que contiene el implante. Para implantes de menor tamaño, se añadirá un volumen suficiente para cubrirlos, nunca inferior a 50 ml. Antes y después de la sonicación (frecuencia 40 ± 2 kHz, densidad de potencia $0,22 \pm 0,04$ watts/cm²; 5 minutos) el contenedor con la muestra debe agitarse en vórtex durante 30 segundos. Tras centrifugar (5 minutos a 3000 xg), se inoculará 0,1 mL del sedimento en cada uno de los medios de cultivo. En el caso de no disponer de sonicador, se seguirá el mismo procedimiento realizando únicamente agitación en vórtex.

Si se dispone de técnicas moleculares, del producto obtenido de la sonicación o agitación de válvulas cardíacas protésicas y dispositivos de electroestimulación cardíaca, se separarán 2 alícuotas de 1 mL, una para PCR y otra para archivo (ver PNT-DBM-02 de este procedimiento). No se ha establecido un punto de corte, como en el caso de la infección asociada a prótesis articular, para interpretar los resultados obtenidos a partir del cultivo del «sonicado» por lo que la interpretación de los resultados del cultivo deberá hacerse en conjunto con los resultados del resto de muestras obtenidas y en base a la información clínica de que se disponga. La bibliografía referente al diagnóstico de la infección asociada a estos implantes es muy escasa y por tanto los resultados deben ser interpretados con mucha cautela.

No está recomendado sumergir los dispositivos en caldo de enriquecimiento para luego subcultivar, ni el uso de torundas que muestreen la superficie del dispositivo.

5.5. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

En general se seguirán las recomendaciones recogidas en el Procedimiento en Microbiología 1a de la SEIMC «Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología».

La inoculación directa de las muestras debe realizarse en medios convencionales para bacterias aerobias (agar sangre, agar chocolate), bacterias anaerobias (agar Brucella o agar Schaedler) y un medio selectivo para aislamiento de bacilos gramnegativos (agar MacConkey o similar). Si se considera necesario y hay muestra suficiente se inocularán también medios selectivos para estreptococos (CNA). Además se inoculará un medio líquido de enriquecimiento tipo BHI, TSB o tioglicolato. En caso de sospecha de infección por micobacterias se inocularán medios específicos, preferiblemente Middlebrook 7H10 en placa.

Las placas de agar sangre, agar chocolate y CNA se incubarán a 35-37°C en atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂. Las placas de agar Brucella y agar Schaedler para el cultivo de anaerobios se incubarán a 35-37°C en atmósfera de anaerobiosis. Los caldos se incubarán a 35-37°C.

Se comprobará diariamente el crecimiento de microorganismos, y en caso de que se observe turbidez en los caldos, se realizará subcultivo en los medios sólidos descritos previamente. El tiempo de incubación de las placas será de 5-7 días y el de los caldos de enriquecimiento de 7-10 días. En caso de sospecha de microorganismos de crecimiento lento (*Brucella* spp. o micobacterias), este período se alargará convenientemente.

5.6. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados microbiológicos comienza con la valoración de la tinción de Gram y de los cultivos, tras las primeras 24 h de incubación.

5.6.1. Tinción de Gram

Dado que todas las muestras que se procesan para el diagnóstico de la infección asociada a implantes proceden de sitios normalmente estériles se debe dar

valor a cualquier microorganismo que se visualice en la tinción de Gram. Se debe visualizar la extensión completa ya que en este tipo de infecciones los microorganismos suelen estar en cantidades bajas. Si se visualizan microorganismos que se considera que no pueden crecer en los medios habituales, se añadirán los medios de cultivo adecuados para su crecimiento. Se valorará además la presencia de leucocitos polimorfonucleares que indican la presencia de reacción inflamatoria.

5.6.2. Cultivos

Las placas y los medios líquidos serán examinados diariamente para detectar la presencia de microorganismos. La primera lectura de las placas se hará a las 24 horas de incubación. Los medios líquidos se examinarán diariamente para ver si existe turbidez indicativa de crecimiento.

Si se observa crecimiento en los medios sólidos, se intentará realizar una identificación presuntiva del microorganismo aislado mediante tinción de Gram, y las técnicas que estén disponibles en cada laboratorio, pruebas bioquímicas o espectrometría de masas.

Es muy frecuente la observación en los cultivos de diferentes morfotipos coloniales y deben de realizarse los subcultivos necesarios para aislar cada uno de los morfotipos observados. Se identificarán todos los aislados y se realizarán las pruebas de sensibilidad a los antibióticos según los medios disponibles en cada laboratorio. En los microorganismos anaerobios no se recomienda la realización de pruebas de sensibilidad a todos los aislados. Si no hay crecimiento se reincubarán todas las placas. Si se observa crecimiento en el caldo de cultivo, se realizará tinción de Gram y subcultivo en los medios generales y selectivos adecuados para su aislamiento.

En estas muestras se deben valorar como significativos los aislados de microorganismos que en otras circunstancias se considerarían como microbiota normal de la piel (estafilococos coagulasa negativa, corinebacterias, *P. acnes*, estreptococos del grupo *viridans*, etc). La valoración de un aislado como patógeno se facilita cuando el mismo microorganismo (biotipo y perfil de sensibilidad) se encuentra en más de una muestra del paciente.

En la valoración de los cultivos negativos se debe tener en cuenta la posibilidad de que el paciente haya recibido tratamiento antibiótico previo a la obtención de la muestra.

Se recomienda guardar las placas de la siembra directa hasta que se tengan los resultados definitivos del cultivo, por si fuera necesario realizar pruebas adicionales. Los cultivos de los implantes se interpretarán como se ha detallado anteriormente.

5.7. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

Las tinciones de Gram se visualizarán e informarán lo más rápidamente posible y siempre en el turno de trabajo de recepción de la muestra. Se informarán todos los microorganismos presentes en la tinción de Gram, siempre que las muestras hayan sido recogidas y conservadas convenientemente. La presencia de leucocitos polimorfonucleares se podrá informar como escasos, moderados o abundantes. Cualquier información sobre los cultivos que pueda tener significado clínico y pueda reconducir la actitud terapéutica, debe ser notificada con la mayor rapidez posible al clínico responsable del paciente, mediante informes provisionales.

En el informe de resultados deberán constar todos los microorganismos aislados y su sensibilidad a los antibióticos. Si el cultivo de la muestra resultara negativo, se emitirá el resultado al finalizar el periodo de incubación de los medios de cultivo, en el que conste “no se aíslan microorganismos”.

5.8. OTROS MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

La PCR universal del gen 16S ARNr basada en la amplificación del gen que codifica para el ADN ribosomal 16S, ha demostrado su utilidad en el diagnóstico de las infecciones asociadas a válvulas cardíacas protésicas y dispositivos intracardíacos y es claramente un método diagnóstico complementario al hemocultivo y al cultivo de los implantes y tejidos adyacentes. Cuando la muestra resulte positiva, se emitirá un informe en el que conste la especie bacteriana identificada por el alineamiento de secuencias, considerando sólo la especie que presente una identidad $\geq 99\%$ con una secuencia de una única especie bacteriana de la base de datos de GeneBank (ver PNT-DBM-02 de este procedimiento).

Es previsible que en el diagnóstico de las infecciones asociadas a otros tipos de dispositivos estas técnicas complementen el diagnóstico, y ayuden al microbiólogo a interpretar mejor los resultados de los cultivos. Son necesarios más estudios para definir el papel de los distintos métodos moleculares, sobre todo los ba-

sados en PCR, en el diagnóstico de las infecciones asociadas a otros dispositivos biomédicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Almirante B, Miro JM. Infections associated with prosthetic heart valves, vascular prostheses, and cardiac pacemakers and defibrillators. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:647-664.
2. Bellón JM. Revisión de una clasificación de materiales protésicos destinados a la reparación herniaria: correlación entre estructura y comportamiento en los tejidos receptores. *Rev Hispanoam Hernia*. 2014; 2:49-47.
3. Bongiorno MG, Tascini C, Tagliaferri E, Di Cori A, Soldati E, Leonildi A, et al. Microbiology of cardiac implantable electronic device infections. *Europace* 2012; 14:1334-1339.
4. Carson CC. Diagnosis, treatment and prevention of penile prosthesis infection. *Int J Impot Res* 2003;15 (Suppl 5):S139-S146.
5. Darouiche RO, Bella AJ, Boone TB, Brock G, Broderick GA, Burnett AL, et al. North American consensus document on infection of penile prostheses. *Urology* 2013; 82:937-942.
6. Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82:204-209.
7. Del Pozo JL, Tran NV, Petty PM, Johnson CH, Walsh MF, Bite U, et al. Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1333-1337.
8. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1387-1392.
9. Falagas ME, Kasiakou SK. Mesh-related infections after hernia repair surgery. *Clin Microbiol Infect*. 2005; 11:3-8.
10. Golzio PG, Vinci M, Anselmino M, Comoglio C, Rinaldi M, Trevi GP, et al. Accuracy of swabs, tissue specimens, and lead samples in diagnosis of cardiac rhythm management device infections. *Pacing Clin Electrophysiol* 2009; 32 (Suppl 1):S76-S80.
11. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vila-costa I, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J* 2009; 30: 2369-2413.
12. Marín M, Muñoz P, Sánchez M, del Rosal M, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by real-time broad-range polymerase chain reaction (PCR) and sequencing directly from heart valve tissue. *Medicine (Baltimore)* 2007; 86:195-202.

13. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miro JM, Fowler VG, Jr., Bayer AS, et al. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* 2009; 169:463-473.
14. Oliva A, Nguyen BL, Mascellino MT, D'Abramo A, Iannetta M, Ciccaglioni A, et al. Sonication of explanted cardiac implants improves microbial detection in cardiac device infections. *J Clin Microbiol* 2013; 51:496-502.
15. Pittet B, Montandon D, Pittet D. Infection in breast implants. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:94-106.
16. Rohacek M, Erne P, Kobza R, Pfyffer GE, Frei R, Weisser M: Infection of cardiovascular implantable electronic devices:detection with sonication, swab cultures, and blood Cultures. *Pacing Clin Electrophysiol* 2014; Nov 7. [Epub ahead of print]
17. Rubin LG, Papsin B and Committee on infectious diseases and section on otolaryngology - head and neck surgery. Cochlear implants in children: Surgical site infections and prevention and treatment of acute otitis media and meningitis. *Pediatrics* 2010; 126:381-391
18. Sandoe JA, Barlow G, Chambers JB, Gammage M, Guleri A, Howard P, et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of implantable cardiac electronic device infection. Report of a joint Working Party project on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, host organization), British Heart Rhythm Society (BHRS), British Cardiovascular Society (BCS), British Heart Valve Society (BHVS) and British Society for Echocardiography (BSE). *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:325-359.
19. Stenehjem E, Armstrong WS. Central nervous system device infection. *Infect Dis Clin N Am.* 2012; 26:89-110.
20. Vilacosta I, Sarria C, Pozo E. Endocarditis protésica e infecciones asociadas con los electroestimuladores intracardiacos; pp. 121-148. En: Actualización en la endocarditis infecciosa. Almirante B y Tornos P (coordinadores). Ed. Marge Médica Books, Barcelona, España. 2011.
21. Washer LL, Gutowski K. Breast implant infections. *Infect Dis Clin N Am* 2012; 26:111-125.
22. Young MH, Upchurch GR, Malani PN. Vascular graft infection. *Infect Dis Clin N Am.* 2012; 26:41-56.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación	PNT-DBM-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

PNT-DBM-01

Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N° ASIGNADA A

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación	PNT-DBM-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir la metodología empleada para el procesamiento microbiológico de prótesis explantadas por sospecha de infección para realizar el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con materiales protésicos, así como definir los criterios de interpretación de los resultados tras el procesamiento de estas muestras.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que posean la dotación y experiencia adecuada en técnicas de cultivo microbiológico convencional, y que dispongan del equipamiento necesario para su realización.

2. FUNDAMENTO

Hasta el momento, no hay métodos microbiológicos de referencia establecidos para el procesamiento de los dispositivos biomédicos incluidos en este documento, ni recomendaciones concretas sobre otros tipos de muestras que se deban obtener. El cultivo tras sonicación es una técnica que se viene utilizando en los últimos años como herramienta diagnóstica en la infección asociada a prótesis articular. Esta técnica ha demostrado una mayor sensibilidad que el cultivo de los tejidos peri-implante, especialmente en aquellos pacientes que están recibiendo tratamiento con antimicrobianos. En el caso de la infección asociada a otros implantes no hay apenas experiencia en el uso de esta técnica para el diagnóstico de una infección asociada, sin embargo, podría ser una herramienta útil ya que como en el caso de las infecciones asociadas a prótesis articulares, la formación de biocapas es el factor patogénico clave en su desarrollo y, por tanto, el diagnóstico microbiológico requiere realizar técnicas basadas en la desagregación de las comunidades microbianas incluidas en la biocapa de la superficie del implante.

En el presente procedimiento se describe una técnica de sonicación - agitación para el procesamiento de dispositivos explantados por sospecha de infección.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Marín M (Coordinador). Esteban J, Marín M, Meseguer M.A, Sánchez Somolinos M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. Procedimientos en Microbiología Clínica 34. SEIMC 2009. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
4. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. N Engl J Med 2007;357:654-663.
5. Del Pozo JL, Tran NV, Petty PM, Johnson CH, Walsh MF, Bite U, et al. Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. J Clin Microbiol 2009;47:1333-1337.

4. MUESTRAS

Este procedimiento se aplicará sobre dispositivos explantados mediante cirugía en aquellos pacientes con cuadros clínicos indicativos de infección relacionada con este material protésico.

4.1. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Las prótesis se explantarán siguiendo los correspondientes protocolos quirúrgicos en quirófano. Tras su extracción, la prótesis debe ser manejada con las máximas condiciones de asepsia e introducida en un contenedor es-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación	PNT-DBM-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

téril de plástico rígido de tapón a rosca que se cerrará herméticamente. Las muestras se enviarán inmediatamente para su procesamiento al laboratorio de Microbiología. Es importante indicar a los servicios quirúrgicos responsables de la extracción que antes de enviar este tipo de muestras contacten con el laboratorio de Microbiología.

4.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

El manejo de la muestra a su llegada al laboratorio, implica el cumplimiento de los criterios de calidad de la muestra, indicados en el Procedimiento de Microbiología Clínica SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología". Estos criterios incluyen entre otros:

- Una correcta identificación de la muestra y del paciente
- El empleo de contenedores adecuados al tipo de muestra
- Unas condiciones adecuadas de transporte y conservación

En caso de no cumplirse los criterios de calidad establecidos por el laboratorio, se comunicará al facultativo responsable de la solicitud indicando el procesamiento o no de la muestra e incidiendo en la interpretación de los resultados si se llevara a cabo el mismo.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medios de cultivo para aislamiento de bacterias, micobacterias y hongos
- Reactivos necesarios para realizar tinción de Gram
- Solución Ringer lactato o PBS
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera específica (5-7% CO₂ y anaerobiosis)

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Sonicador de baño de baja potencia (frecuencia, 40±2 kHz)
- Vórtex
- Tubos de fondo cónico de 50 ml
- Jarras de incubación o estufa de CO₂
- Estufa de aerobiosis 35°C
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis
- Centrífuga refrigerada
- Sistemas de anaerobiosis
- Recipientes de material plástico rígido estériles de diversos tamaños
- Pipetas Pasteur estériles
- Asas de cultivo calibradas
- Portaobjetos
- Micropipetas de 200 µL
- Puntas de pipeta 100 µL estériles
- Portaobjetos
- Microscopio óptico
- Asas de siembra estériles desechables o asas de siembras
- Tubos de reacción de 1,5 ml tipo sarstedt o similar

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación	PNT-DBM-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Estos dispositivos, al igual que otras muestras clínicas, son muestras únicas y de difícil obtención, por lo que deberán extremarse las precauciones durante todo el procesamiento. Hay que tener en cuenta que los microorganismos responsables de la infección de este tipo de dispositivos pueden ser parte de la microbiota habitual de la piel, por lo que las violaciones de las normas de asepsia durante el procesamiento, pueden dar lugar a contaminaciones que podrían originar interpretaciones erróneas de los resultados. Las muestras se procesarán inmediatamente tras su llegada al laboratorio. Aunque no es deseable, en el caso de que el procesamiento no pueda llevarse a cabo de forma inmediata, la muestra se conservará a 2-8°C hasta su procesamiento y nunca más de 24 horas tras la obtención.

7.2. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

7.2.1. Implantes grandes (implantes de mama o pene)

En campana de bioseguridad se añadirán 400 ml de Ringer lactato o PBS al recipiente que contiene el implante. Se agitará en el vórtex el recipiente durante 30 segundos y después se introducirá en el baño sonicador (frecuencia 40 +/- 2 kHz, densidad de potencia 0.22 +/-0.04 watos/cm²) durante 5 minutos.

A continuación se volverá a agitar en vórtex durante otros 30 segundos. Se trasvasará el caldo resultante de la sonicación a tubos de fondo cónico, repartiendo 50 ml en cada uno de 8 tubos. Los tubos se centrifugarán durante 5 minutos a 3000 xg.

Con pipeta estéril se eliminará el sobrenadante de cada tubo dejando como sedimento 0,5 mL. El sedimento (0,5 ml) de cada tubo se aspirará con una pipeta Pasteur estéril y se trasvasará a un único tubo.

El producto obtenido se homogeneizará mediante agitación en vórtex durante 30 segundos y una vez homogeneizado se realizará una extensión para tinción de Gram y siembra en los medios de cultivo indicados.

7.2.2. Otros implantes

Para implantes de menor tamaño se añadirá al contenedor que contiene la muestra un volumen de solución Ringer lactato o PBS suficiente para cubrir el implante y nunca menor de 50 ml. Se procederá igual que en el apartado anterior (7.2.1) y el caldo resultante de la sonicación se trasvasará en alícuotas de 50 mL a tantos tubos como sean necesarios según el volumen inicial de Ringer o PBS añadido a la muestra.

En el caso de no disponer de sonicador, se seguirá el mismo procedimiento descrito en los apartados 7.2.1 y 7.2.2 realizando únicamente la agitación en vórtex de la muestra sumergida en Ringer lactato o PBS.

Nota: En el caso de válvulas cardíacas protésicas o dispositivos de electroestimulación cardíaca a los que se vaya a realizar PCR, a partir del producto obtenido de la sonicación o agitación se separarán 2 alícuotas de 1 mL en tubos sarstedt o similar, una para PCR y otra para archivo (ver el PNT- DBM-02 de este procedimiento).

7.3. MEDIOS DE CULTIVO

Se inoculará 0,1 mL del producto resultante de la sonicación o agitación en los siguientes medios de cultivo ocupando toda la superficie de los diferentes medios de cultivo de modo que pueda realizarse un recuento de colonias:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar Brucella o agar Schaedler para anaerobios

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación	PNT-DBM-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

- Agar MacConkey / CNA
- Medio específico para crecimiento de micobacterias (es recomendable el agar Middlebrook 7H10 en placa por poderse sembrar de la misma forma que el resto de medios de cultivo)
- Agar Sabouraud-cloranfenicol

Los medios así sembrados se incubarán en las correspondientes atmósferas de incubación y durante los tiempos que se indican a continuación:

- Agar sangre y agar chocolate: 7 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.
- Agar sangre para anaerobios: 7 días a 37°C en atmósfera anaerobia (las primeras 48 horas de forma ininterrumpida).
- Agar MacConkey/CNA: 24 horas a 37°C.

No hay evidencias para recomendar de manera categórica la prolongación del tiempo de incubación de estos medios.

- Medio para micobacterias: 15-30 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.
- Agar Sabouraud-cloranfenicol: 30 días a 30°C en atmósfera aerobia.

7.4. LECTURA DE CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Examinar diariamente las placas de medios de cultivo. A las 24 horas los incubados en aerobiosis y atmósfera de CO₂ y a las 48 horas los incubados en anaerobiosis.

Si se observa crecimiento, obtener un cultivo puro de cada uno de los morfotipos observados y realizar las pruebas de identificación y de sensibilidad a los antibióticos según las normas estandarizadas (EUCAST, CLSI,).

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

En la tinción de Gram se valorará la presencia de organismos (bacterias, hongos) y se informará el resultado de forma semicuantitativa (escasos/moderados/abundantes).

Los medios de cultivo se examinarán diariamente, a las 24 horas los incubados en aerobiosis y atmósfera de CO₂ y a las 48 horas los incubados en anaerobiosis.

Se valorará todo crecimiento microbiano que se obtenga en los distintos medios y se realizará la identificación y estudio de sensibilidad de cada uno de los morfotipos crecidos en los medios de cultivo siguiendo los protocolos específicos aceptados (CLSI, EUCAST). Se informarán los resultados cuantitativamente (número de UFC/mL).

No se ha establecido un punto de corte como en el caso de la infección asociada a prótesis articular, por lo que la interpretación de los resultados deberá hacerse en conjunto con los resultados del resto de muestras obtenidas y en base a la información clínica de que se disponga. La bibliografía referente al diagnóstico microbiológico de la infección asociada a estos dispositivos es muy escasa y por tanto los resultados deben ser interpretados con mucha cautela.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación	PNT-DBM-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

La toma de muestra, su transporte y conservación por parte de los servicios quirúrgicos, debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Se recomienda la obtención de otras muestras clínicas relacionadas con la infección del material protésico y que han sido descritas en el procedimiento, como biopsias o colecciones purulentas alojadas en la periferia de la misma. El estudio conjunto de todos los resultados permitirá una mejor valoración del proceso infeccioso.

Se recomienda insistir a los servicios quirúrgicos que el procedimiento de la toma de muestra sea totalmente aséptica para evitar posibles contaminaciones con microorganismos propios de la microbiota saprofita cutánea, que podrían confundir el diagnóstico.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La principal limitación del procedimiento es la contaminación del material protésico, tanto en su explantación, en su manipulación en el quirófano o durante el procesamiento, que puede originar resultados falsos positivos por contaminaciones con la microbiota cutánea. La demora superior a 3 horas en el transporte de las muestras disminuye la viabilidad de las bacterias anaerobias y puede originar falsos resultados negativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Del Pozo JL, Tran NV, Petty PM, Johnson CH, Walsh MF, Bite U, et al. Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1333-1337.
2. Monsen T, Löugren E, Widerström M, Wallinder L. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggest protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:2496-2501.
3. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007;357:654-663.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-DBM-02

Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

En este procedimiento se describe el método a seguir para detectar e identificar el ADN de las bacterias presentes en muestras de tejido o sonicados procedentes de válvulas cardiacas protésicas y dispositivos de electroestimulación cardiaca (marcapasos y desfibriladores implantables) mediante amplificación por PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación.

2. FUNDAMENTO

Las válvulas cardiacas protésicas y los dispositivos de electroestimulación cardiaca, son junto con el hemocultivo, las muestras más importantes para el diagnóstico etiológico de las infecciones asociadas a dispositivos intracardiacos.

Son muestras que se obtienen mediante un proceso laborioso que conlleva grandes riesgos para el paciente y por tanto se les debe dar la máxima importancia en su manipulación y procesamiento. Los resultados obtenidos del estudio microbiológico pueden ser esenciales para el éxito del tratamiento antimicrobiano.

En distintos trabajos que revisan las infecciones asociadas a dispositivos protésicos intracardiacos, se ha demostrado la utilidad diagnóstica que tienen las técnicas moleculares basadas en la amplificación mediante PCR del gen 16S ARNr y secuenciación realizadas en los sonicados de este tipo de implantes, sobre todo cuando los hemocultivos son negativos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. PNT-DBM-01 del presente procedimiento SEIMC nº 52: "Procesamiento microbiológico de dispositivos biomédicos mediante sonicación de material protésico".
4. Manual de instrucciones del kit de extracción: QIAmp DNA Minikit (Quiagen®).
5. Manual de instrucciones del kit de purificación de productos de PCR: High Pure PCR Product purification kit (Roche Applied Science®).

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El presente procedimiento se refiere a distintos tipos de material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables (DAI). Se procesarán todas las muestras de este tipo y debido a la importancia no se rechazarán salvo que se reciban en condiciones defectuosas que impidan completamente su procesamiento. Estas muestras se recibirán directamente del quirófano de cirugía cardiaca.

4.2. TRASNPORTE Y CONSERVACIÓN

El rendimiento de las técnicas a realizar depende, en gran medida, de la correcta manipulación y conservación de las muestras antes de su análisis por PCR.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marca-pasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

Las muestras se deben obtener asépticamente. Se deben introducir en contenedores estériles, rígidos, de tamaño adecuado al implante, de boca ancha y cierre hermético. Las muestras deben ser enviadas rápidamente al laboratorio de Microbiología, sin añadir conservantes ni aditivos. Las muestras se procesarán, si es posible, a su llegada al laboratorio. En caso de no procesarse de forma inmediata, las muestras se mantendrán congeladas a -70°C y los implantes a 4°C , hasta su procesamiento.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Al ser muestras de muy difícil obtención sólo se rechazarán cuando estén mal identificadas y haya sido imposible resolver la incidencia.

Cuando se registren otros tipos de incidencias como una conservación inadecuada (temperatura inapropiada, muestras en medio no apropiado), se procesarán para amplificación por PCR del 16S ARNr, pero se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados: "Interpretar los resultados con precaución: muestra recibida en condiciones defectuosas".

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Se empleará el método comercial QIAmp DNA Minikit (Quiagen®) basado en la extracción con columnas o cualquier otro de características similares.

5.2. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

- Gen 16S ARNr (1500 pb):

	Volumen
Oligo R: FD1 (5pmol/ μl)	2,5 μl
Oligo F: RD2 (5pmol/ μl)	2,5 μl
dNTP's (25mM)	0,4 μl
Buffer 10x + MgCl₂ (25mM)	5,0 μl
H₂O libre de nucleasas	33,6 μl
Taq-Polymerasa (1U/ μl)	1,0 μl
Volumen total	45,0 μl

*Entre paréntesis figuran las concentraciones de la solución de trabajo de cada reactivo.

- β -globina humana:

	Volumen
Oligo Beta R (5pmol/ μl)	2,5 μl
Oligo F: RD2 (5pmol/ μl)	2,5 μl
dNTP's (25mM)	0,4 μl
Buffer 10x + MgCl₂ (25mM)	5,0 μl
MgCl₂ (25mM)	5,0 μl
H₂O libre de nucleasas	28,6 μl
Taq-Polymerasa (1U/ μl)	1,0 μl
Volumen total	45,0 μl

*Entre paréntesis figuran las concentraciones de la solución de trabajo de cada reactivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

- Iniciadores de PCR:

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Región amplificada	Tamaño amplicón (pb)
fD1 rD2	f : AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG r : ACGGCTACCTTGTACGACTT	16S ARNr	1.500
β	f: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC r :GGA AAA TAG ACC AAT AGG CAG	β-globina humana	400

Los iniciadores se preparan en solución stock de 100 μM a partir del liofilizado.

Los iniciadores liofilizados, la solución stock de iniciadores y las alícuotas de trabajo se deben conservar a -20°C en el congelador del área 1 del laboratorio de diagnóstico molecular, durante un periodo no superior a 2 años.

A la hora de preparar las distintas *master mix* se debe considerar, que hay que emplear tantos tubos como muestras se procesen, un control negativo (H₂O libre de nucleasas) y un control positivo (muestra negativa inoculada con *Gordona sputi* o cualquier otra bacteria considerada “no patógena”).

5.3. DETECCIÓN DE AMPLICONES

- Agarosa: preparar un gel de agarosa al 1,4% en tampón TBE 1X, de tamaño adecuado a la cubeta de electroforesis que se utilice.
- TBE 1X: 100ml de TBE 10X comercial+ 900 ml de agua destilada.
- Agente intercalante Real-Safe: solución stock de 10mg/ml. Conservar a 4°C protegido de la luz. Se añaden 5 ml a cada 100 ml de suspensión de agarosa. Manipular siempre con guantes.
- Buffer de carga
- Marcadores de peso molecular de 100pb o similar
- Agua destilada

5.4. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES

Para la purificación de amplicones previa a la secuenciación, se empleará el kit High Pure PCR Product purification kit (Roche Applied Science®) o similar.

5.5. SECUENCIACIÓN

Se secuenciarán los primeros 500 pb del producto de amplificación obtenido (1500 pb). Para la reacción de secuenciación se emplearán los oligonucleótidos E8F y E533R (5 pmol/μl).

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Región amplificada	Tamaño amplicón (pb)
E8F E533R	f : AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG r : TTA CCG CGG CTG GTG GCA C	Primeros 500 pb del gen 16S rARN	1.500

Se rellenarán los formularios de envío de muestras a la línea instrumental de secuenciación, haciendo constar el nombre del paciente, n° de muestra enviada y las características de los oligonucleótidos que se emplean en las reacciones de secuenciación.

La interpretación de las secuencias obtenidas se realizará en el área de diagnóstico molecular.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

6. APARATOS Y MATERIAL

- Micropipetas (diferentes para cada área de trabajo, áreas 1, 2 y 3).
- Puntas de micropipeta de “calidad molecular” con filtro.
- Gradillas para tubos sarstedt o similares.
- Agitador tipo vórtex.
- Tubos de reacción de 1,5 ml de “calidad molecular” (tipo sarstedt).
- Rejillas, bases, tubos y tapas de PCR adaptados al termociclador.
- Bandeja con hielo.
- Contenedores de residuos.
- Cabina de seguridad biológica.
- Hojas de bisturí estériles.
- Placas de Petri estériles.
- Termobloques.
- Microcentrífugas.
- Termocicladores.
- Balanza.
- Matraces y probetas para preparar la suspensión de agarosa.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Horno microondas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.

6.1. PROTOCOLOS DE MANTENIMIENTO

Los protocolos de mantenimiento de los termocicladores deben estar detallados en la hoja de mantenimiento de equipos y en el plan de control y calibración de equipos del área y deben ser cumplidos rigurosamente.

7. PROCEDIMIENTO

1. Introducir el contenedor con el implante en campana de flujo laminar.
2. Depositar la muestra sobre una placa Petri estéril e inspeccionarla para ver si contiene fragmentos de tejido.
3. Separar los fragmentos de tejido y si hay muestra suficiente dividirlos en 3 partes, uno para cultivo, otro para PCR universal 16S ARNr y un tercero para conservar en archivo a -70°C. El fragmento destinado a cultivo se llevará al área de procesamiento de muestras y se manipulará siguiendo pautas habituales como una biopsia de tejido. El fragmento destinado a PCR se congelará a -70°C hasta su procesamiento. El fragmento para archivo se rotulara con el n° de archivo correspondiente y se congelara también a -70°C.
4. El material protésico se sonicará en su contenedor según el PNT-DBM-01 de este procedimiento SEIMC n° 52. Del material obtenido de la sonicación se separarán 2 alícuotas de 1000 ml en tubos sardstedt o similares: una para PCR y otra para archivo.

7.1. PCR

- Distribución de áreas de trabajo
- Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos.
- Área 2 de manipulación de muestras y extracción de ADN.
- Área 3 de amplificación y análisis post-PCR.

7.1.1. Preparación de reactivos

- Preparación de alícuotas de los reactivos del kit de extracción en tubos sarstedt.
- Preparación de *master mix* (β -globina, *master mix* 16S ARNr). Para realizar los cálculos conviene tener en

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

cuenta el número de controles positivos y negativos que se van a utilizar y el nº de muestras.

- Distribución de *master mix* en los tubos y placas de PCR (se añadirán 45 µl de cada *master mix*: β-globina y 16S ARNr) en tubos independientes. Los tubos con la *master mix* 16S ARNr (fD1-rD2) y los de β-globina se pueden colocar en la misma placa de PCR, ya que comparten secuencia térmica de amplificación.
- La preparación de las *master mix* debe realizarse en hielo y las placas de PCR se deben conservar refrigeradas hasta su utilización (no más de 4 horas).

7.1.2. Preparación de muestras

- Las muestras se deben procesar en el área 2 del laboratorio de Diagnóstico Molecular y en campana de bioseguridad. Todas las muestras se deben atemperar antes de su procesamiento.
- Las muestras de tejido adherido a válvulas, cables o generadores se fragmentarán y homogenizarán con un bisturí sobre una placa Petri estéril en condiciones asépticas. Una vez homogenizadas, la muestras se introducirán en tubos sarstedt rotulados adecuadamente.
- Las alícuotas de sonicado se centrifugarán a 14.000 rpm durante 10' y se procesará el pellet para extracción de ADN.
- Controles: por cada 10 muestras procesadas se extraerá el ADN de una muestra negativa y de una muestra positiva ambas analizadas previamente. Estas muestras sirven respectivamente, de control negativo y control positivo de extracción.

7.1.3. Extracción de ADN

Se deben seguir las recomendaciones del fabricante para la extracción de ADN de tejidos y líquidos biológicos (ver manual del kit de extracción). Es conveniente prolongar la incubación con proteinasa K, hasta la lisis completa de la muestra (alrededor de 2,5 h).

7.1.4. Amplificación

En cada placa de PCR se introducirán además del ADN de las muestras, un control negativo (agua bidestilada estéril y libre de nucleasas), un control positivo (muestra previamente positiva o una negativa contaminada con *Gordona sputi* u otra bacteria considerada no patógena y poco frecuente en este tipo de muestras).

- En área 1, distribuir 45 µl de la *master mix* en cada tubo de la placa de amplificación y en paralelo otros 45 µl de la *master mix* de β-globina (en área 1 y en hielo) en la misma placa.
- Preparar la hoja de trabajo apuntando la situación de cada muestra y cada control en la placa de PCR.
- En área 2, añadir 5 µl del ADN extraído de cada muestra, de los controles negativos y positivos, en cada tubo de la placa de PCR que contiene 45 µl de cada *master mix* (en área 2 y en hielo) según se haya recogido en la hoja de trabajo.
- Tapar los tubos e introducir la placa en el termociclador, con el siguiente programa de PCR:
 - Desnaturalización inicial: 94°C, 5 minutos
 - 40 ciclos de PCR: desnaturalización 94°C, 1 minuto; anillamiento 60°C, 1 minuto; elongación 72°C, 1 minuto.
 - Elongación final: 72°C, 10 minutos
 - Refrigeración 4°C.

7.1.5. Detección de los productos de amplificación

- Preparar un gel de agarosa al 1,4 % en TBE 1X y Real-Safe e introducirlo en una cubeta de electroforesis con TBE 1X.
- En tubos sarstedt añadir 2 µl de buffer de carga y 8 µl de cada muestra (productos amplificados de las distintas PCRs).
- Cargar los 10 µl en el gel, incluyendo el marcador de 100 pb en una de las calles.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

- Correr el gel a 100V hasta que el frente alcance el borde del mismo.
- Visualizar el gel con transiluminador UV.

7.1.6. Lectura e interpretación de resultados

En la calle del gel correspondiente a los controles negativos, puede aparecer un banda de amplificación muy tenue (debido a la presencia de ADN en la Taq polimerasa). Si aparece una banda intensa indica contaminación de la PCR y el ensayo no se debe considerar válido. Todos los controles positivos, deben presentar una banda de amplificación de tamaño adecuado (1.500 pb). Todas las muestras deben presentar la banda de amplificación del gen de la β -globina a 400 pb, en caso contrario las muestras estarán inhibidas y debe repetirse la PCR con una nueva extracción de ADN y una dilución 1/10 del ADN extraído.

7.2. PURIFICACIÓN DE AMPLICONES

Una vez obtenida amplificación para una muestra determinada, se purificarán los amplicones correspondientes a las muestras positivas, para posteriormente realizar las reacciones de secuenciación. Se deben seguir las instrucciones del kit de purificación.

7.3. SECUENCIACIÓN

Una vez purificados los productos de amplificación obtenidos se llevarán a la unidad central de secuenciación. Se rellenará el formulario de solicitud de análisis.

7.4. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Se realizará en Genebank usando BIBI *software* (pbil.univ-lyon1.fr/bibi/). Para ello se copia la secuencia obtenida, en formato FASTA en la sección dedicada a ello de la página de BIBI *software*. Se selecciona la base de datos de nucleótidos (16S ARNR) y se envía a Genebank, que devuelve el alineamiento de nuestra secuencia, con las secuencias similares que se encuentran en la base de datos. Se obtiene un porcentaje de similitud. La obtención de un alineamiento con un porcentaje de similitud $\geq 99\%$ y alto score con una secuencia del gen 16S ARNr de una especie bacteriana determinada, se considera que confirma la identidad del amplicón obtenido. La probabilidad de alineamiento por azar debe ser siempre 0.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en el programa informático y serán validados por el facultativo responsable.

1. Las muestras se informarán como positivas: si se detecta una banda de amplificación de 1.500 pb en las PCRs del gen 16S ARNr de intensidad mayor que el control negativo y si la PCR del gen de la β -globina presenta amplificación para esa muestra. En el informe constará la especie bacteriana identificada por el alineamiento de secuencias, considerando sólo la especie que presente una identidad $\geq 99\%$ con una secuencia de una única especie bacteriana de la base de datos de Genebank.
2. Las muestras se informarán como negativas: si no se obtienen bandas de amplificación en las PCRs de 16S ARNr y se obtiene una banda de 400 pb en la PCR de la β -globina.
3. Las muestras se informarán como inhibidas: si no aparece banda de amplificación de 400 pb en la PCR de la β -globina, aún después de una nueva extracción y repetición de la PCR. Si aparecen bandas de amplificación intensas en los controles negativos el ensayo se considerará inválido (por posible contaminación del proceso) y se repetirá de nuevo. Si los controles positivos no presentan amplificación, se considerará que ha habido algún error de procesamiento y se repetirá el análisis.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardiacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

Las secuencias deben estar limpias, sin mostrar indeterminaciones. En caso de que se detecten secuencias mixtas (más de una bacteria en la muestra) la PCR se informará como: positiva con mezcla de secuencias. Este resultado indicaría que hay más de una especie bacteriana en la muestra.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación, por parte de los servicios quirúrgicos, debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de Biología Molecular. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.

Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de diagnóstico molecular en el que se realizan técnicas de PCR, se debe distribuir el trabajo en 3 áreas perfectamente diferenciadas:

Área 1 o zona limpia: dedicada a la preparación de reactivos. En la que no se introducirán muestras ni reactivos que contengan ADN, tanto amplificado como no amplificado. En este área se preparan las mezclas reacción (*master mix*) de la PCR y se alicuotarán los reactivos de extracción de ADN de las muestras clínicas.

Área 2 o de manipulación de muestras y extracción de ADN. En esta área se procesan las muestras, se realiza la extracción y purificación del ADN y se añade el ADN a la *master mix*. En esta zona no se debe introducir ADN amplificado.

Área 3 o de amplificación. En esta área se detectan y procesan los productos de PCR (carga de geles, purificación, etc.).

En cada zona de trabajo debe existir material independiente (puntas de micropipeta, micropipetas, guantes, etc.). No se debe trasladar el material de una zona a otra, salvo el estrictamente necesario. El flujo de trabajo debe ser: área 1→2→3 y nunca a la inversa.

Es importante que para el manejo del material que esté en contacto con agentes intercalantes, se usen siempre guantes y se extremen las precauciones de seguridad, ya que son reactivos tóxicos. La visualización de geles con transiluminador UV, debe realizarse con caretas protectoras o en sistema cerrado de visualización de geles.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida.

Los resultados obtenidos en las PCRs dependen en gran medida de la realización de las técnicas en hielo. Ocasionalmente, se pueden producir inhibiciones de la PCR que no permitirán obtener un resultado y que se detectarán por falta de amplificación del gen β -globina humana. En estos casos se repetirá de nuevo el procedimiento desde el principio, volviendo a extraer el ADN de la muestra si es posible o en su caso analizando el mismo ADN y una dilución 1/10. Si aún así no se consigue obtener amplificación el resultado deberá informarse como: "muestra inhibida".

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección e identificación de bacterias en material protésico intracardiaco: válvulas cardíacas protésicas, marcapasos y desfibriladores automáticos implantables mediante PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación	PNT-DBM-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

En muestras con más de una bacteria no se podrá llegar a su identificación al obtenerse secuencias mixtas que no se pueden alinear en Genebank.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Claridge J. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;17: 840-862.
2. Habib G, Hoen B, Tornos P, Thuny F, Prendergast B, Vilacosta I, Moreillon P, de Jesus Antunes M, Thilen U, Lekakis J, Lengyel M, Muller L, Naber CK, Nihoyannopoulos P, Moritz A, Zamorano JL. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. *Eur Heart J* 2009; 30:2369-2413.
3. Sandoe JA, Barlow G, Chambers JB, Gammage M, Guleri A, Howard P, Olson E, Perry JD, Prendergast BD, Spry MJ, Steeds RP, Tayebjee MH, Watkin R. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of implantable cardiac electronic device infection. Report of a joint Working Party project on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, host organization), British Heart Rhythm Society (BHRS), British Cardiovascular Society (BCS), British Heart Valve Society (BHVS) and British Society for Echocardiography (BSE). *J Antimicrob Chemother* 2015;70:325-359.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de muestras de biopsia de tejido para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos	PNT-DBM-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito del presente documento es establecer los criterios para el procesamiento de muestras de biopsias de tejido periimplante en infecciones asociadas a los dispositivos biomédicos incluidos en este procedimiento SEIMC, con el objetivo de realizar el diagnóstico microbiológico de las infecciones relacionadas con este tipo de materiales, así como definir los criterios de interpretación de los cultivos. Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que posean la dotación y experiencia adecuada en técnicas de cultivo bacteriológico convencional, y que dispongan del aparataje necesario para su realización.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico microbiológico de las biopsias de tejido periimplante, constituye junto al del propio implante uno de los pilares fundamentales en el diagnóstico etiológico de las infecciones asociadas a este tipo de materiales. Hasta el momento, no hay métodos microbiológicos de referencia establecidos, ni recomendaciones concretas sobre las muestras que se deben obtener para realizar el diagnóstico microbiológico de una infección asociada a este tipo de dispositivos biomédicos. Por analogía con las infecciones asociadas a prótesis articulares, siempre que sea posible, deberán obtenerse muestras múltiples.

La recogida de este tipo de muestras requiere de métodos invasivos, por lo que su procesamiento y manipulación deben realizarse bajo estrictas condiciones de asepsia. Un rápido procesamiento y una valoración adecuada de los resultados, son esenciales para conseguir el éxito terapéutico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (Coordinador). Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
3. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition, vol. 1. 2007. Section 3.13.1: Aerobic Bacteriology. Wound Abscess and Soft Tissue Cultures. ASM Press. Washington D.C.

4. MUESTRAS

Este procedimiento se aplicará sobre muestras de biopsia obtenidas mediante cirugía, en aquellos pacientes con cuadros clínicos indicativos de infección relacionada con el dispositivo implantado.

4.1. OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Las biopsias de tejido periimplante se obtendrán siguiendo los correspondientes protocolos quirúrgicos en quirófano, preferentemente antes de iniciar el tratamiento antibiótico. Si se ha iniciado tratamiento y el estado clínico del paciente lo permite, debería interrumpirse al menos dos semanas antes de la toma de la muestra. Cuando se tomen varias biopsias del mismo paciente, deberán identificarse y enviarse por separado.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACION

Tras su extracción, las muestras serán manejadas en el quirófano con las máximas condiciones de asepsia, e introducidas en contenedores estériles que se cerrarán de forma hermética. Se podrá añadir suero salino estéril para evitar la desecación. Las muestras se enviarán inmediatamente para su procesamiento al laboratorio de Micro-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de muestras de biopsia de tejido para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos	PNT-DBM-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

biología. Es importante indicar a los servicios quirúrgicos responsables que antes de enviar este tipo de muestras contacten con el laboratorio de Microbiología.

El procesamiento de las muestras se realizará lo más rápidamente posible a su llegada al laboratorio. Si no es posible el procesamiento inmediato, las muestras se conservarán refrigeradas entre 2-8°C, hasta su procesamiento, durante un tiempo no mayor de 24 h. En ningún caso se pueden congelar las muestras destinadas al cultivo.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

El manejo de la muestra a su llegada al laboratorio, implica el cumplimiento de los criterios de calidad de la muestra, indicados en el Procedimiento de Microbiología Clínica SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología". Ante este tipo de muestras clínicas "únicas e irrepetibles", en caso de no cumplirse los criterios de calidad establecidos por el laboratorio, se consultará siempre con el clínico responsable de la solicitud, para solventar cualquier duda o problema pre-analítico. Si finalmente se indica el procesamiento de la muestra, se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Medios de cultivo para aislamiento de bacterias, micobacterias y hongos.
- Reactivos necesarios para realizar tinción de Gram.
- Suero salino estéril o caldo BHI.
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera específica (5-7% CO₂ y anaerobiosis).

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica tipo II.
- Jarras de incubación o estufa de CO₂.
- Estufa de aerobiosis 37°C.
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis.
- Placas de Petri estériles.
- Bisturíes estériles.
- Homogenizadores de muestra o morteros estériles.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Asas de cultivo.
- Portaobjetos.
- Microscopio óptico.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PROCESAMIENTO

El procesamiento de las muestras se realizará en una cabina de bioseguridad tipo II.

Las muestras de biopsias se deben cortar en trozos en una placa de Petri estéril con un bisturí estéril. Los distintos fragmentos se deben homogeneizar, en homogeneizador tipo *stomacher* o bien en un mortero estéril, con una pequeña cantidad de solución salina o caldo BHI antes de su siembra en los medios de cultivo. Ante la sospecha de infección por micobacterias, emplear agua destilada estéril. En el caso de sospecha de infección por hongos filamentosos no se deben triturar las muestras, se debe cortar en pequeños fragmentos que se colocarán directamente en los medios de cultivo para hongos.

Las extensiones para tinciones pueden realizarse mediante impronta sobre el porta o bien a partir de la muestra homogeneizada.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de muestras de biopsia de tejido para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos	PNT-DBM-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

La muestra homogeneizada se inoculará en los diferentes medios de cultivo con un asa de siembra o pipeta estéril.

Nota: si se dispone de técnicas moleculares, de las muestras obtenidas a partir de restos de tejidos adheridos a válvulas cardíacas protésicas o dispositivos de electroestimulación cardíaca, se separará una parte para realizar PCR universal 16S ARNr (ver el PNT-DBM-02 de este procedimiento SEIMC n° 52).

7.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar sangre
- Agar MacConkey (McC)
- Agar chocolate (ACh)
- Agar CNA (colistina-ácido nalidixico)
- Agar sangre para anaerobios (agar Brucella o Schaedler)
- Agar sangre con kanamicina y vancomicina
- Caldo de enriquecimiento: BHI, tioglicolato o similar
- Agar Sabouraud-cloranfenicol (si procede).
- Medio específico para micobacterias (Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 o similar), si procede.

Los medios se incubarán en las atmósferas de incubación y durante los tiempos que se indican a continuación:

- Agar sangre y agar chocolate: 7 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.
- Agar sangre para anaerobios: 7 días a 37°C en atmósfera anaerobia (las primeras 48 horas de forma ininterrumpida).
- Agar MacConkey: 24 horas a 37°C.
- Caldo de enriquecimiento, 7 días a 37°C.
- Medio para micobacterias: 15-30 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂.
- Agar Sabouraud-cloranfenicol: 30 días a 30°C en atmósfera aire.

8. OBTENCION Y EXPRESION DE RESULTADOS

8.1. TINCIÓN DE GRAM

Los resultados de la observación microscópica de las extensiones (ausencia o presencia de leucocitos polimorfonucleares y ausencia o presencia de uno o varios morfotipos bacterianos) se informarán al clínico peticionario y quedarán registrados en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra.

8.2. CULTIVO

Examinar todas las placas y caldo cada 24 horas, y hasta un total de 5 días, para la detección de crecimiento macroscópico. Si no hay crecimiento visible, reincubar.

Si los cultivos presentan crecimiento:

- Correlacionar los aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram.
- Notificar al facultativo peticionario un informe preliminar con la identificación presuntiva.
- Identificar todos los aislados a nivel de especie y realizar pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos según las normas vigentes estandarizadas (CLSI, EUCAST).
- Si el crecimiento se produce sólo en los caldos de cultivo (turbidez) y no en las placas, realizar subcultivo y correlacionar el aislado con el morfotipo observado en la tinción de Gram.
- Cuando en un caldo crecido se observen por tinción de Gram microorganismos que no crecen en el subcultivo, proceder a subcultivar en medios nutricionalmente más ricos y en diferentes condiciones de incubación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de muestras de biopsia de tejido para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos	PNT-DBM-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

En el informe de resultados deberán constar todos los microorganismos aislados y su sensibilidad a los grupos de antibióticos que determine cada laboratorio. Si se dispone de varias muestras, antes de emitir un informe definitivo se evaluarán de forma conjunta los resultados de todas las muestras del paciente.

9. RESPONSABILIDADES

El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante. La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras y su distribución a los servicios solicitantes es responsabilidad del laboratorio de Microbiología. El facultativo encargado del área de recepción y procesamiento de muestras del laboratorio es responsable de la supervisión de la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, así como del rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y adopción de medidas correctoras. El personal técnico del laboratorio de Microbiología es responsable de los procedimientos microbiológicos de identificación y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como del registro de resultados. El personal facultativo es responsable de la valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, transcripción correcta de los resultados al ordenador, comunicación telefónica de los resultados preliminares, validación y emisión de informes preliminares y definitivos, archivo de hojas de trabajo y de responder a las interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Se deben realizar los procedimientos microbiológicos que proporcionen información clínica relevante en el menor tiempo posible. No se recomienda rechazar o no procesar ninguna muestra (por ejemplo, derramamiento durante el transporte) sin consultar previamente con el clínico responsable del paciente. Se procesará, indicando en el informe sobre la posibilidad de contaminación debida al estado de la muestra a la llegada al laboratorio.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede dar lugar a cultivos negativos. Otra limitación del procedimiento es la contaminación de la muestra tanto durante la obtención como durante el procesamiento que puede dar lugar a resultados erróneos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition, vol. 1. 2007. Section 3.13.1: Aerobic Bacteriology. Wound Abscess and Soft Tissue Cultures. ASM Press. Washington D.C.
2. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML., Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 2007.
3. Procedimientos normalizados de trabajo SEIMC: PNT-IOA-02: Procesamiento microbiológico de muestras de biopsias óseas y periimplantes. En: Marín M (Coordinador). Esteban J, Marín M, Meseguer M.A, Sánchez Somolinos M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. Procedimientos en Microbiología Clínica 34. SEIMC 2009. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.