

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



54

Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinadora

Belén Padilla

Autores

Susana Delgado
Fernando García-Garrote
Belén Padilla
Juan Miguel Rodríguez Gómez
Beatriz Romero



ISBN: 978-84-608-3549-3

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:

Delgado S, García-Garrote F, Padilla B, Rodríguez Gómez JM, Romero B. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio. 54. Padilla B (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 la infección
bacteriana asociada al parto y al puerperio

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

54. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN BACTERIANA ASOCIADA AL PARTO Y AL PUERPERIO. **2015**

Coordinadora:
Belén Padilla¹

Autores:
Susana Delgado²
Fernando García-Garrote³
Belén Padilla¹
Juan Miguel Rodríguez Gómez⁴
Beatriz Romero⁵



¹ Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. ²Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias. ³Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo. ⁴Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. ⁵Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal e Instituto de Investigación Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid

ÍNDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1.	Introducción.....	6
2.	<i>Streptococcus agalactiae</i> : despistaje en la gestante para prevenir la infección neonatal precoz.....	6
	2.1. Introducción y epidemiología	6
	2.2. Aspectos clínicos y epidemiológicos relacionados con la colonización en la gestante y la infección neonatal precoz	7
	2.3. Diagnóstico microbiológico: indicación y tipo de muestras para realizar el despistaje.....	9
	2.4. Diagnóstico microbiológico: recogida, transporte y conservación de las muestras.....	9
	2.4.1. Recogida.....	9
	2.4.2. Transporte y conservación.....	9
	2.5. Diagnóstico microbiológico: procesamiento de las muestras en el laboratorio de Microbiología.....	10
	2.5.1. Recepción de las muestras	10
	2.5.2. Procesamiento de las muestras.....	10
	2.5.2.1. Diagnóstico microbiológico basado en cultivo	10
	2.5.2.2. Diagnóstico microbiológico basado en métodos que no precisan cultivo	10
	2.5.2.3. Estudio de sensibilidad antibacteriana	11
	2.6. Criterios para la interpretación e informe de resultados.....	11
3.	Corioamnionitis y productos del parto: loquios, meconio, placenta y líquido amniótico	12
	3.1. Introducción y epidemiología	12
	3.2. Papel de la microbiota	12
	3.3. Corioamnionitis: definición y etiología.....	12
	3.4. Corioamnionitis: factores de riesgo, diagnóstico clínico, efectos sobre el recién nacido e indicación de diagnóstico microbiológico.....	13
	3.4.1. Factores de riesgo de la corioamnionitis	13
	3.4.2. Diagnóstico clínico de la corioamnionitis.....	13
	3.4.3. Efectos de la corioamnionitis sobre el recién nacido	15
	3.4.4. Indicación para la realización del diagnóstico microbiológico	15
	3.5. Meconio	16
	3.6. Loquios	16
	3.7. Diagnóstico microbiológico: recogida, transporte y conservación de las muestras.....	16
	3.7.1. Obtención de las muestras.....	16
	3.7.2. Transporte y conservación de las muestras	17
	3.7.3. Recepción de las muestras	17
	3.7.4. Criterios de rechazo de las muestras	17
	3.8. Diagnóstico microbiológico: procesamiento de las muestras	17
	3.8.1. Medios de cultivo	18
	3.8.2. Condiciones de incubación	18
	3.9. Criterios para la interpretación e informe de los resultados.....	18
	3.9.1. Tinción de Gram.....	18
	3.9.2. Cultivos	19
	3.9.3. Informe de resultados.....	20
4.	Mastitis: diagnóstico microbiológico.....	20
	4.1. Introducción y epidemiología	20
	4.2. Papel de la microbiota	21

4.3. Mastitis: aspectos clínicos, etiología y patogenia.....	21
4.3.1. Mastitis clínicas	22
4.3.1.1. Mastitis agudas	22
4.3.1.2. Mastitis subagudas.....	22
4.3.1.3. Mastitis granulomatosas	22
4.3.2. Mastitis subclínicas.....	22
4.3.3. Etiología	22
4.3.4. Patogenia y sintomatología.....	23
4.3.5. Factores predisponente.....	25
4.3.6. Factores protectores	26
4.3.7. Efectos de la mastitis en el lactante	26
4.4. Diagnóstico microbiológico: indicación de realización	26
4.5. Diagnóstico microbiológico: recogida, transporte y conservación de las muestras.....	27
4.5.1. Recogida de las muestras	27
4.5.2. Transporte y conservación de las muestras	27
4.6. Diagnóstico microbiológico: procesamiento de las muestras	28
4.6.1. Recepción de las muestras	28
4.6.2. Procesamiento de las muestras.....	28
4.6.2.1. Medios de cultivo e inoculación	28
4.6.2.2. Condiciones de incubación de los cultivos.....	28
4.6.2.3. Lectura de los cultivos	28
4.7. Criterios para la interpretación e informe de los resultados.....	29
5. Leche materna donada: banco de leche.....	29
5.1. Introducción y consideraciones clínicas	29
5.2. Diagnóstico microbiológico: indicación de realización	30
5.3. Diagnóstico microbiológico: recogida, transporte y conservación de las muestras.....	31
5.4. Diagnóstico microbiológico: procesamiento de las muestras	31
5.5. Criterios para la interpretación e informe de los resultados.....	31
6. Bibliografía.....	32

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-IPP-01. Procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta
2. PNT-IPP-02. Procesamiento microbiológico de la leche materna
3. PNT-IPP-03. Procesamiento microbiológico de la leche materna donada al banco de leche

1. INTRODUCCIÓN

La infección neonatal requiere conocer los factores de riesgo tanto prenatales como perinatales, la sintomatología y la interpretación de los resultados del estudio microbiológico.

El recién nacido en el momento del parto está expuesto a la adquisición de infección por bacterias presentes en el canal del parto tanto por colonización materna, como es el caso de la infección neonatal precoz por *Streptococcus agalactiae*, como por bacterias que se adquieren a través de la placenta y del líquido amniótico o productos del parto. En la gran mayoría de los casos la madre no va a presentar síntomas graves y estos suelen ceder en el momento del parto, pero no ocurre así en el neonato, sobre todo si se trata de un recién nacido pretérmino de bajo o muy bajo peso, cuya mortalidad relacionada con la infección es importante.

Tras el parto, las infecciones que puede sufrir el recién nacido que está ingresado, son las relacionadas con el ambiente hospitalario, la adquisición nosocomial, pero hay que recordar un aspecto importante que es la lactancia materna. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y las diversas sociedades científicas pediátricas recomiendan el inicio de la lactancia materna en la primera hora de vida ya que la leche materna aporta muchos beneficios, protege al recién nacido frente a infecciones, reduciendo la mortalidad neonatal, favorece la relación madre-hijo, el establecimiento de la microbiota intestinal, la prevención de la enterocolitis necrosante y la maduración del sistema nervioso central. Desafortunadamente, la lactancia materna con la propia leche no siempre es posible, siendo necesario en estos casos disponer de leche materna donada a través de los bancos de leche. En España no existe actualmente ninguna legislación específica para la donación y procesamiento en los bancos de leche, aplicándose la normativa de la manipulación de alimentos. Cuando existe mastitis o una incorrecta manipulación de la leche materna puede producirse una transmisión de infección al recién nacido eliminando todos los beneficios que esta tiene.

Este procedimiento incluye un documento científico y tres documentos técnicos. En el documento científico se abordan el despistaje de la colonización por *S. agalactiae* en la gestante para prevenir la infección precoz neonatal, revisando las guías actuales que existen sobre la indicación de cuándo y cómo realizarlo, si hacerlo de forma universal o según factores de riesgo.

La mejora de la sensibilidad que aportan las técnicas basadas en PCR para detectar este microorganismo favorecen su detección precoz. El segundo apartado está dedicado al diagnóstico microbiológico de la corioamnionitis y su repercusión en el recién nacido. Los apartados tercero y cuarto están dedicados al diagnóstico microbiológico de la mastitis y su repercusión en el neonato y a las recomendaciones y criterios que determinan la calidad y seguridad microbiológica de la leche materna donada a bancos de leche.

En los tres documentos técnicos de este procedimiento se abordan, respectivamente, el procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta en el caso de corioamnionitis, el procesamiento microbiológico de la leche materna ante la sospecha de mastitis durante la lactancia y el procesamiento microbiológico de la leche materna donada a bancos de leche.

2. *Streptococcus agalactiae*: DESPISTAJE EN LA GESTANTE PARA PREVENIR LA INFECCIÓN NEONATAL PRECOZ

2.1. INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

S. agalactiae o *Streptococcus* del grupo B (SGB) de Lancefield es un coco grampositivo, beta-hemolítico (salvo un pequeño porcentaje, inferior al 4% de las cepas), con una capsula formada por polisacárido que es un factor de virulencia. La producción de hemolisina de este microorganismo también le confiere virulencia. Existen 10 serotipos antigénicamente diferentes (Ia, Ib, II al IX), y cualquiera de ellos puede producir colonización o infección, siendo más prevalente en la infección neonatal el serotipo III. En los últimos años se ha descrito una asociación entre un clon de SGB del serotipo III, ST-17, y meningitis neonatal. El SGB coloniza, entre un 15- 40%, el tracto gastrointestinal y genital de adultos sanos, siendo el recto el reservorio. La tasa de colonización es muy variable, pudiendo ser transitoria, intermitente o persistente. Datos publicados en España estiman que la prevalencia de colonización en mujeres embarazadas es del 12% al 20%. La colonización generalmente es asintomática pero es muy importante su detección debido a que en la década de 1970 se describió como una de las causas de infección precoz en el neonato y recién nacidos de menos de 90 días de edad causando una elevada morbi - mortalidad. La adquisición en la **infección neonatal precoz**, que es la que se produce en la primera semana de vida, se realiza principalmente por vía vertical, de la madre al niño, el SGB asciende desde vagina al líquido amniótico tras

haber comenzado el trabajo del parto o cuando existe rotura de membranas, aunque esta condición no es necesaria. En la **infección neonatal tardía**, la que se produce a partir de la primera semana y hasta el tercer mes de vida, no está muy claro la vía de adquisición ya que el 50% de los neonatos que la padecen nacen de madres no colonizadas, pudiendo existir otras fuentes como familiares o personal sanitario. Por este motivo todas las estrategias publicadas van dirigidas a prevenir la infección neonatal precoz.

En los años 1980 se realizaron estudios observacionales randomizados que demostraron el beneficio de la administración intraparto de ampicilina a las madres portadoras para proteger a los neonatos de una infección precoz. Basados en estas evidencias a partir de 1996 el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos (ACOG), los Centros de Control de Enfermedades (CDC) y la Academia Americana de Pediatría (AAP) recomendaron la profilaxis intraparto y la realización sistemática del despistaje de estado de portador en las mujeres embarazadas. Posteriormente se han realizado estudios cuasi-experimentales (pre y post) que apoyan esta estrategia, aunque se han ido introduciendo cambios en cuanto a los métodos microbiológicos para la detección, el valor del recuento de SGB en urocultivo, actitud ante parto pretérmino y rotura prematura de membranas, fármacos a utilizar y dosificación, y actitud diagnóstica y terapéutica en el neonato. El último documento del CDC es de 2010 con una actualización en el 2012. Las primeras recomendaciones españolas se realizaron en 1998 y posteriormente en el 2003. En el año 2012 se publicaron unas recomendaciones con el consenso de las Sociedades Españolas de Ginecología y Obstetricia (SEGO), de Neonatología (SEN), de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), de Quimioterapia (SEQ) y de Medicina Familiar y Comunitaria (SEMFYC).

Existen guías en diferentes países que basan las recomendaciones en el despistaje universal de la mujer embarazada o en la actuación en las mujeres que presentan algún factor de riesgo. Por este motivo en el año 2013 se ha publicado un consenso europeo sobre el despistaje de SGB y la profilaxis intraparto.

2.2. ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA COLONIZACIÓN EN LA GESTANTE Y LA INFECCIÓN NEONATAL PRECOZ

Si no se realizan medidas de prevención, la infección neonatal precoz se produce entre el 1% y el 2% de

los recién nacidos colonizados. La infección neonatal precoz se desarrolla en las primeras 24-48 horas de vida y se caracteriza por sepsis, neumonía y/o, menos frecuentemente, meningitis, ésta última es más característica de la infección tardía. La incidencia, en EEUU, ha caído desde el año 1990 hasta el 2008 de 1,7 casos a 0,34 casos por 1000 nacimientos vivos. La mortalidad en los años 1970-1980 alcanzaba el 50%, siendo actualmente del 4-5% debido a los grandes avances realizados en el cuidado neonatal y a las estrategias de prevención. La mortalidad es mayor en el recién nacido pretérmino llegando a ser, en la actualidad, del 30%. En España disponemos de datos de la *Fundación Castrillo*, que indican que la incidencia de infección neonatal precoz ha descendido desde 1,3 en 1996-1997, a 0,7 en 2000-2001 hasta 0,36 por 1000 nacidos vivos en 2010.

El principal factor de riesgo de la infección neonatal precoz es la colonización intraparto. Cuando esta existe, aumenta el riesgo hasta 25 veces. Hay que saber que no todas las mujeres colonizadas en un embarazo lo estarán en los siguientes de forma segura. Otros factores de riesgo descritos son una edad gestacional de menos de 37 semanas, rotura de membranas prolongada de 18 horas o más y temperatura intraparto mayor o igual a 38°C, que aumentan el riesgo 6,5 veces en comparación con las mujeres que no tienen ninguno de ellos. Otros dos factores de riesgo a tener en cuenta son haber tenido un niño previamente con infección neonatal precoz, pero no es factor de riesgo haber tenido simplemente colonización, y la bacteriuria asintomática en la mujer embarazada que está presente en un 2-7%. En las primeras guías se consideraba que cualquier recuento de SGB en urocultivo debía considerarse como factor de riesgo de infección neonatal precoz, en la actualización de las guías del CDC del 2012 tan solo se consideran como factor de riesgo unos recuentos iguales o mayores de 10.000 ufc/ml.

En el caso de parto antes de la semana 37 o rotura prematura de membranas, si se ha obtenido un cultivo vagino-rectal en las 5 semanas previas, hay que actuar según el resultado de éste. Si no hay evidencia de cultivo negativo, se debe realizar una toma de muestra y comenzar con la profilaxis, teniendo en cuenta la alergia o no a beta-lactámicos, hasta obtener un resultado microbiológico, bien sea por cultivo o amplificación de ácidos nucleicos (PCR).

Hay dos aproximaciones para identificar a las mujeres que van a necesitar profilaxis intraparto:

- En primer lugar, la que se basa en el despistaje durante el embarazo, en la que se debe realizar un cultivo de exudado vaginal y rectal a todas las mujeres entre la semana 35 y 37 de gestación. En este caso hay que pautar profilaxis a las mujeres que tienen colonización en el momento del inicio del trabajo del parto o cuando suceda la rotura de membranas.
- Otra aproximación está basada en la presencia de factores de riesgo, como son el parto antes de la semana 37 de gestación, una temperatura intraparto mayor o igual de 38°C o la rotura de membranas de 18 horas o más. En esta opción existen dos estrategias a) administrar profilaxis a toda mujer que tenga algún factor de riesgo y b) realizar despistaje en estas mujeres y pautar profilaxis solo a las que sean detectadas como colonizadas. Esta forma de actuación se justifica en la existencia de métodos de diagnóstico rápidos, “point-of-care”, basados en la detección de ácidos nucleicos (PCR en tiempo real), cuyo resultado puede estar en horas. También basan esta actuación en países con baja incidencia de colonización materna, y para evitar el aumento de exposición innecesaria a antibióticos para la madre y el recién nacido con los consiguientes efectos secundarios, como son la posible creación de resistencias bacterianas y la posibilidad de anafilaxia.

En cualquiera de las dos aproximaciones, siempre que haya corioamnionitis se debe pautar tratamiento antibiótico que debe incluir un fármaco con cobertura frente a SGB.

En el caso de cesárea electiva o cesárea realizada antes de la rotura de membranas, no es necesaria la profilaxis intraparto sea cual sea el resultado del cultivo del despistaje.

Los antibióticos recomendados para realizar las profilaxis antenatal por SGB son penicilina o ampicilina, preferiblemente penicilina por su menor espectro antibacteriano. Los antibióticos siempre se deben administrar por vía intravenosa intraparto o en las 4 horas antes del parto. La penicilina G se administrará a dosis de 5 millones de UI seguida de 2,5-3 millones de UI cada 4 horas hasta el parto. La ampicilina se administrará a dosis de 2 gramos seguida de 1 gramo cada 4 horas hasta el parto. En personas alérgicas a penicilina se puede administrar cefazolina, que alcanza altas concentraciones en líquido amniótico pero tiene la desventaja del 10% de hipersensibilidad cruzada con penicilinas. La dosis sería de 2 gramos, seguida de

1 gramo cada 8 horas hasta el parto. Otras alternativas son clindamicina, siempre y cuando se conozca la sensibilidad a este fármaco y se haya descartado resistencia o resistencia inducible, a dosis de 900 mg cada 8 horas hasta el parto, o vancomicina, que alcanza niveles limitados en líquido amniótico, a dosis de 1 gramo cada 12 horas hasta el parto. Todos estos fármacos alternativos tienen el inconveniente de no estar respaldados por ensayos clínicos. La eritromicina no se contempla actualmente en ninguna guía debido a tener SGB una resistencia que oscila entre el 15% y el 30%.

El uso de antisépticos vaginales de clorhexidina no ha demostrado eficacia aunque en países en vías de desarrollo donde no hay disponibilidad de antibióticos ni de hacer despistaje antenatal, puede ser una buena alternativa.

Respecto a la prevención de SGB mediante vacunas dirigidas al polisacárido o las proteínas de los pili no hay datos concluyentes debido a la dificultad para desarrollar una vacuna frente a diferentes serotipos y la difícil realización de ensayos clínicos en la mujer embarazada.

Una vez que se producido el parto hay que asistir al recién nacido. La Academia Americana de Pediatría ha propuesto las siguientes guías de actuación:

- Signos de sepsis neonatal: se debe iniciar tratamiento antibiótico que cubra SGB y otras bacterias frecuentes como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, entre otros, y realizar una evaluación completa con hemocultivo, analítica, radiología de tórax y punción lumbar.
- Corioamnionitis materna sin signos de sepsis neonatal: se debe iniciar tratamiento antibiótico que cubra SGB y realizar una evaluación con hemocultivo y analítica, no siendo necesaria una punción lumbar salvo que aparezcan signos de sepsis.
- Despistaje materno negativo para SGB: realizar cuidados neonatales habituales salvo que aparezcan signos de sepsis.
- Si se ha realizado profilaxis antenatal adecuada en tiempo (antes de las 4 horas) y fármaco (beta-lactámico): se debe realizar observación del recién nacido en las primeras 48 horas. Si la edad de gestación era mayor o igual a 37 semanas se puede hacer observación en domicilio, siempre y cuando se entienda bien por parte de los familiares y alguien se haga responsable.
- Si la profilaxis antenatal ha sido inadecuada en

tiempo (menos de las 4 horas) o fármaco (clindamicina o vancomicina):

- Si la gestación es mayor o igual a 37 semanas o la rotura de membranas ha sido de menos de 18 horas: se debe realizar observación del recién nacido en las primeras 48 horas.
- Si la gestación es de menos de 37 semanas o la rotura de membranas ha sido mayor o igual de 18 horas: realizar hemocultivo y analítica y observar en el hospital durante 48 horas. Si hubiese signos de sepsis actuar como se ha comentado previamente.

2.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: INDICACIÓN Y TIPO DE MUESTRAS PARA REALIZAR EL DESPISTAJE

El cultivo debe realizarse entre la semana 35 y 37 de gestación. Aunque el estado de portador puede ser intermitente, se acepta que las muestras recogidas en la semana 5 antes del parto predicen de forma fiable el estado de portador en el momento del parto, ya que el valor predictivo negativo es del 88-96%. Este valor predictivo negativo es menor si se realiza el cultivo antes de estas 5 semanas. La rentabilidad en la detección es mayor si se realiza toma vaginal y rectal que si solo se hace toma para cultivo de vagina o perirectal. Las muestras endocervicales, perianales o perineales no son adecuadas para la detección de SGB. La muestra de orina sirve para detectar bacteriuria asintomática, recomendándose profilaxis intraparto tan solo a las mujeres que en el urocultivo tengan un recuento mayor o igual a 10.000 ufc/ml, y en este caso ya no sería necesario realizar la toma vagino-rectal.

El haber tenido colonización en algún embarazo previo no excluye el realizarlo en el embarazo actual, tan solo se recomienda no realizarlo si ha habido infección precoz por SGB en alguno de los hijos previos.

2.4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El objetivo del despistaje es identificar a mujeres portadoras y establecer una profilaxis antibiótica intraparto para evitar la infección precoz por SGB en el recién nacido, por lo que los materiales utilizados, el transporte, la conservación y el procesamiento microbiológico deben ser adecuados.

2.4.1. Recogida

La toma del exudado vaginal y rectal o vagino-rectal

se realizará antes de cualquier manipulación vaginal, no deben emplearse productos de higiene íntima femenina y no debe estar la paciente con tratamiento antibacteriano.

La toma vaginal se realizará introduciendo el torunda en el tercio externo de la vagina. No es necesario utilizar espéculo. La toma rectal se realizará introduciendo el torunda a través del esfínter anal y se hará rotar alrededor del esfínter. Se pueden recoger dos torundas, una rectal y otra vaginal, o bien una única torunda realizando la toma antes en vagina y posteriormente en recto.

La toma se realizará en el centro sanitario donde la paciente sea atendida o, según las recomendaciones dadas por el CDC, se puede realizar la toma por la propia paciente, obteniendo los mismos resultados, siempre y cuando se le den las instrucciones oportunas.

Es muy importante indicar en la petición “despistaje de *S. agalactiae* en gestante” para que en el laboratorio de Microbiología se realicen las técnicas más adecuadas.

En caso de ser una muestra urgente, es importante contactar con el laboratorio de Microbiología para valorar si es posible la realización de técnicas rápidas basadas en PCR, si bien estas técnicas no están disponibles de forma habitual en todos los servicios de Microbiología. En caso de poderse realizar no se debe emplear torunda con medio de transporte (Amies o Stuart), aunque si se puede utilizar caldo enriquecido. Se debe eliminar antes de la toma el exceso de mucosidad y hay que enviar la muestra lo más rápidamente posible.

2.4.2. Transporte y conservación

El transporte de las muestras al laboratorio de Microbiología debe realizarse lo antes posible para optimizar los resultados. Se deben utilizar torundas introducidas en medio de transporte tipo Amies o Stuart, y la muestra debe ser transportada en el plazo de 24 horas y conservada a 4°C hasta su envío. Como se indicó anteriormente, no se deben utilizar estos medios de transporte si se va a realizar el diagnóstico rápido mediante PCR.

Si se emplean torundas introducidas en caldo de transporte enriquecido y selectivo tipo Todd Hewitt con colistina (10 microgramos/ml) - ácido nalidíxico (15 microgramos/ml) (caldo Lim), el SGB puede permanecer viable hasta 4 días a temperatura ambiente, pero indudablemente es mejor realizar el envío lo antes posible.

El retraso del envío de la muestra disminuye la eficacia sobre todo en mujeres con bajo inóculo o si la toma no se ha realizado en las condiciones idóneas, dando resultados falsos negativos.

Una vez procesada, la muestra debe ser conservada en nevera al menos 48 horas hasta obtener los resultados. Esto es muy importante ya que en ocasiones se puede necesitar comprobar algún resultado o datos de identificación.

2.5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

2.5.1. Recepción de las muestras

Las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología deben estar perfectamente identificadas, deben ir acompañadas de una petición, ya sea en papel o vía electrónica, debiendo constar en la petición claramente el estudio solicitado. La persona que recibe la muestra debe confirmar que todos los datos son correctos. Si existiese alguna disparidad es responsabilidad del laboratorio de Microbiología contactar con el servicio peticionario y en caso de rechazar la muestra indicar claramente el motivo.

2.5.2. Procesamiento de las muestras

El cultivo del exudado vagino-rectal es la muestra recomendada para despistaje de colonización en la mujer embarazada y de esta forma poder prevenir la infección neonatal precoz, por lo que el procesamiento de esta muestra en las mejores condiciones es de gran importancia. Además nos servirá para realizar estudios de sensibilidad antibacteriana, especialmente en mujeres alérgicas a los antibióticos betalactámicos.

2.5.2.1. Diagnóstico microbiológico basado en cultivo

Inoculación. Cuando la muestra se reciba en el laboratorio de Microbiología y se haya comprobado su correcta petición e identificación, si no se recibe en caldo enriquecido, se deberá inocular en él. Se recomienda caldo de Todd Hewitt con colistina más ácido nalidíxico (caldo Lim) para inhibir el crecimiento de otras bacterias presentes en el tracto genital y gastrointestinal como enterobacterias u otra microbiota habitual. También puede emplearse el caldo Granada.

No se recomienda la siembra directa en medio sólido Granada sin haber realizado previamente enriquecimiento en caldo selectivo debido a su menor sensibilidad. Es necesario realizar el cultivo en caldo selectivo,

ya que si no se realiza aumenta el número de falsos negativos. Se calcula que el 20 - 50% de mujeres colonizadas darían un resultado negativo si no se utilizan medios de enriquecimiento.

Incubación. El caldo enriquecido selectivo se incubará durante 18 o 24 horas a 35-37°C en aerobiosis o con 5% de CO₂.

Posteriormente se realizará un subcultivo en medio Granada, en agar sangre, en agar sangre selectivo CNA (colistina - ácido nalidíxico) o en un medio cromogénico.

Cualquiera de estos medios se incubarán durante 18-24 horas a 35-37°C en atmosfera con un 5% de CO₂ si es agar sangre o en aerobiosis si es medio Granada o cromogénico. Si a las 24 horas el cultivo es negativo se reincubará otras 24 horas antes de dar el resultado como negativo.

El cultivo debe hacerse cualitativo, ya que se ha demostrado que los cultivos cuantitativos no se correlacionan con el grado de colonización.

Identificación. Dependiendo del medio de cultivo utilizado, la identificación del SGB se realiza como se indica a continuación:

- Medio Granada: las colonias de color anaranjado o rojo se identifican directamente como SGB. Hay que tener en cuenta que en el medio Granada no se detectan los SGB no hemolíticos, que suponen menos del 4%.
- Agar sangre con o sin antibióticos: las colonias que sean beta-hemolíticas se identificarán mediante aglutinación por látex o por MALDI-TOF. Cada laboratorio de Microbiología elegirá la técnica que tenga disponible.
- Medio cromogénico: aportan la ventaja de la rápida identificación visual y la recuperación de los SGB no hemolíticos. Depende del medio que se emplee el color de las colonias es diferente. En el *StrepBSelect* son azul turquesa, en el *ChromID™ StreptoB Medium* son rosa pálido o rojas y en *Brilliance GBS Medium* aparece color rosa fuerte o rojas. Estas colonias deben ser posteriormente identificadas mediante aglutinación con látex o por MALDI-TOF.

2.5.2.2. Diagnóstico microbiológico basado en métodos que no precisan cultivo

Esta alternativa diagnóstica se ha planteado para

poder realizarla en el momento del parto, pero debe cumplir unas premisas: alta sensibilidad (90%) y especificidad (95%), poder tener un resultado en 30-45 minutos, fácil de realizar e interpretar y estar disponible las 24 horas del día de todos los días de la semana.

La realización de estas técnicas se basa en la detección de colonización intermitente o transitoria debido a que en algunos estudios se ha demostrado que un 30-50% de las mujeres detectadas como colonizadas en el parto, no lo estaban en el despistaje antenatal y un 25-40% de las que lo estaban, en el momento del parto no lo están. Estos datos no tienen una explicación razonable ya que los resultados negativos antenatales pueden ser falsos negativos o la mujer se ha podido colonizar en el intervalo desde el despistaje hasta el parto.

Las primeras técnicas empleadas estaban encaminadas a la **detección de antígenos de SGB** directamente sobre la muestra, pero no se recomiendan por la baja sensibilidad (33- 65%) y la consiguiente elevada tasa de resultados falsos negativos.

A partir del año 2000 se empezaron a realizar técnicas basadas en la **detección de ácidos nucleicos (PCR)** llegando en la última década a las técnicas de PCR en tiempo real que alcanzan una sensibilidad y especificidad del 62,5-100% y 84,6-100%, respectivamente, y un valor predictivo negativo y positivo del 65- 100% y del 92,3-100%, respectivamente. Estas cifras hacen que estas técnicas sean muy prometedoras en su uso, ya que podría dirigirse la profilaxis de una forma más racional y concreta, pero tienen el inconveniente del precio, la no disponibilidad en todos los laboratorios de Microbiología y que en los laboratorios en los que están disponibles pueden no estarlo las 24 horas del día ni todos los días de la semana. Se necesitan estudios que validen y confirmen el coste- efectividad de estas técnicas en diferentes países, con diferente incidencia y diferentes sistemas sanitarios. Otro inconveniente de estas técnicas es la ausencia de datos de sensibilidad a antimicrobianos aunque hay técnicas prometedoras en desarrollo que podrán detectar el microorganismo y sus genes de resistencia a algunos antimicrobianos.

Existen tres técnicas de PCR comercializadas: *Xpert™ GBS assay* (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) que aporta un resultado en 30-45 minutos y es fácil de realizar, *BD GeneOhm StrepB Assay*, que entraña mayor complejidad ya que hay pasos que no están automatizados, y *Gene Xpert Dx System*, que es totalmente automatizada, considerada como una técnica “point-of-care”.

Según los datos existentes en la actualidad estas técnicas moleculares se reservan para casos de parto pretérmino, antes de la semana 37, y/o rotura prematura de membranas además de aquellos casos en los que no esté disponible, en el parto a término, el resultado antenatal del despistaje.

2.5.2.3. Estudio de sensibilidad antibacteriana

No sería necesario determinar la sensibilidad de SGB frente a beta-lactámicos ya que continúa siendo sensible prácticamente de forma uniforme, aunque recientemente se han descrito cepas con sensibilidad disminuida en Japón y EEUU cuya transcendencia clínica se desconoce. Pero teniendo en cuenta que en caso de alergia a betalactámicos los fármacos alternativos son los macrólidos y clindamicina, y que la resistencia a estos fármacos ha cambiado en los dos últimas décadas de <5% a 20-35%, se recomienda realizarla siempre.

El mecanismo de resistencia más común a estos antimicrobianos es el debido a la producción de una metilasa (MLS_B) existiendo dos fenotipos: el constitutivo que hace que el SGB sea fenotípicamente resistente a clindamicina y eritromicina, y el inducible que aparece fenotípicamente como resistente a eritromicina y sensible a clindamicina, por lo que siempre se debe realizar una prueba de aproximación de discos (D-test) para confirmar la sensibilidad a clindamicina. El D-test, según la normativa de EUCAST (<http://www.eucast.org>), se realiza situando los discos de eritromicina y clindamicina a una distancia de 12-20 mm e incubando 16-20 horas a 35°C en atmosfera con 4-6% de CO₂. El resultado se informará como resistente a clindamicina cuando el halo de inhibición de clindamicina se achata del lado de la eritromicina (formado la letra “D”, D-test positivo) y sensible si este achatamiento no existe. Los aislados de SGB con el fenotipo inducible son minoritarios en España. El otro mecanismo de resistencia (D-test negativo) que implica a la eritromicina pero no a la clindamicina, es el debido a una bomba de expulsión activa (fenotipo M), que afecta a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono (eritromicina, claritromicina y azitromicina) pero no a los de 16 (espiramicina y josamicina) ni a clindamicina. También se han detectado aislados con el fenotipo L que implica una resistencia de bajo nivel a clindamicina.

2.6. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN E INFORME DE RESULTADOS

El informe del resultado de la muestra vagino-rectal debe ser claro y conciso y se debe disponer del resultado lo antes posible.

Si se realiza cultivo se informará “se aísla o no se aísla *S. agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B)”.

Si se realiza PCR debe indicarse “se detecta o no se detecta *S. agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B)”. En los casos en los que exista un resultado no válido se informará como “Detección de *S. agalactiae* (*Streptococcus* del grupo B) indeterminada”.

Respecto al informe del estudio de resistencia, no sería necesario en caso de que la paciente no sea alérgica a betalactámicos, pero dado que este dato no se suele conocer en el laboratorio de Microbiología, es recomendable informar la sensibilidad a penicilina y clindamicina sin olvidar para ello la realización del D-test.

3. CORIOAMNIONITIS Y PRODUCTOS DEL PARTO: LOQUIOS, MECONIO, PLACENTA Y LÍQUIDO AMNIÓTICO

3.1. INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

Las infecciones bacterianas intrauterinas se pueden presentar entre las membranas fetales, en la placenta, en el líquido amniótico, en el cordón umbilical o en el mismo feto. La infección de las membranas fetales documentada por hallazgos histopatológicos o el cultivo microbiológico, se denomina corioamnionitis.

La frecuencia de corioamnionitis varía notablemente según los criterios diagnósticos, factores de riesgo y la edad gestacional. En conjunto, la corioamnionitis clínica e histopatológica se presenta entre el 40-70% de los partos pretérmino, con o sin rotura prematura de membranas, y entre el 1-13% de los partos a término. Además, la corioamnionitis clínica está implicada en el 12% de las cesáreas primarias a término. Según datos microbiológicos, la infección intrauterina provoca un cuarto de los partos prematuros.

3.2. PAPEL DE LA MICROBIOTA

La patogénesis de la corioamnionitis depende del paso de los microorganismos a la cavidad amniótica y al feto. Este acceso se produce por cualquiera de las siguientes vías: 1) ascendente a través de la vagina y el cuello del útero; 2) por diseminación hematógena a la placenta (infección transplacentaria); 3) por siembra retrógrada de la cavidad peritoneal a través de las trompas de Falopio; y 4) por contaminación accidental tras un procedimiento invasivo tales como la amnio-

centesis, la toma de muestras de las vellosidades coriónicas o de sangre umbilical percutánea.

Una vez que los microorganismos alcanzan la cavidad amniótica y los tejidos, se produce la respuesta inflamatoria maternal y fetal, que se caracteriza por la liberación de quimiocinas y citocinas. En la madre, la respuesta inflamatoria puede provocar la liberación de prostaglandinas, la maduración y dilatación del cuello del útero, lesión de las membranas y parto a término o pretérmino. En el feto, además del riesgo directo de infección y sepsis neonatal, puede causar el síndrome de respuesta inflamatoria fetal (SRIF), que se caracteriza por la elevación de la concentración de citocinas proinflamatorias en la circulación fetal y se asocia con el desarrollo de una serie de secuelas como leucomalacia periventricular, parálisis cerebral, displasia broncopulmonar, sepsis fetal y disfunción cardíaca fetal.

3.3. CORIOAMNIONITIS: DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA

Según los criterios diagnósticos y el modo de presentación se distinguen tres tipos de corioamnionitis. La corioamnionitis clínica, que es un cuadro infeccioso con repercusión analítica y afectación materna y fetal, que se define mediante criterios clínicos. La corioamnionitis subclínica, que se presenta sin signos clínicos o síntomas de infección, pero con cultivo positivo en el líquido amniótico o datos analíticos de inflamación o de infección. La corioamnionitis histopatológica, que se diagnostica de manera retrospectiva cuando existe evidencia microscópica de infiltración por leucocitos polimorfonucleares en las membranas fetales, el cordón umbilical o la placenta.

Las infecciones intraamnióticas se producen por una microbiota polimicrobiana con predominio de los microorganismos que se encuentran en la microbiota vaginal (especialmente en mujeres con vaginosis bacteriana) o de la microbiota del tracto digestivo. En los cultivos de estas infecciones se puede aislar una media de 2 microorganismos diferentes por muestra.

Los micoplasmas genitales, *Mycoplasma hominis* y especialmente *Ureaplasma urealyticum* son los microorganismos más frecuentemente aislados en el líquido amniótico de los casos de corioamnionitis confirmados por cultivo, 30% y 47% respectivamente. Se aíslan en el contexto de parto prematuro o rotura prematura de membranas, con o sin corioamnionitis clínica. El diagnóstico microbiológico de los micoplasmas genitales,

ha sido revisado en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 40 al que remitimos al lector.

Otros microorganismos que se aíslan frecuentemente en casos de corioamnionitis son: *Gardnerella vaginalis*, estreptococo beta-hemolítico del grupo B, *E. coli* y estreptococos alfa-hemolíticos. Todos ellos son capaces de provocar una elevada respuesta inmune y se asocian con la misma frecuencia a parto a término como pretérmino. Además, en el caso de estreptococo beta-hemolítico del grupo B y de *E. coli*, cuando se aíslan, causan bacteriemia materna con una incidencia mayor (18% y 15% respectivamente). *L. monocytogenes* se aísla en casos en los que la corioamnionitis se adquiere por diseminación hematogena asociada a cuadros clínicos graves

Los anaerobios ocupan también un lugar destacado en la etiología de las infecciones intraamnióticas. En general, las bacterias anaerobias se han aislado en pacientes con vaginosis, con complicaciones postcesárea y en el contexto de parto pretérmino con neonatos de bajo peso al nacer. Las bacterias anaerobias que se recuperan con más frecuencia son *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp. y *Clostridium* spp.

Los microorganismos de la microbiota de la piel como los estafilococos coagulasa negativa o *Propionibacterium* spp. se aíslan en líquido amniótico y en placentas de mujeres con partos por cesárea tanto en cultivo monomicrobiano como polimicrobiano. En general, se les considera microorganismos de baja virulencia colonizadores o contaminantes. Las especies de *Lactobacillus*, que son parte de la microbiota normal vaginal, también se aíslan a menudo pero son microorganismos con escasa patogenicidad y con un efecto modulador de la respuesta inmune. Otros microorganismos que se pueden aislar principalmente en cultivos mixtos incluyen: *Enterococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Peptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Stomatococcus* spp. Ocasionalmente se han descrito casos producidos por microorganismos de la microbiota bucal como *Capnocytophaga* spp. que se han aislado en el útero en casos de corioamnionitis y parto pretérmino. Microorganismos asociados con infección del tracto genital en mujeres no embarazadas, como *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, rara vez se aíslan en el útero antes de la rotura de membranas y no se consideran una causa habitual de corioamnionitis.

Aunque es poco frecuente algunas especies de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida*

glabrata), pueden causar corioamnionitis. Se han asociado a problemas con el uso de dispositivos intrauterinos, en mujeres embarazadas por fecundación *in vitro*, después de una amniocentesis y en el contexto de rotura prolongada de membranas.

Aunque no se ha estudiado ampliamente, los virus no son una causa frecuente de corioamnionitis. Se han aislado en el líquido amniótico algunos virus como: citomegalovirus, adenovirus, enterovirus, virus respiratorio sincitial y el virus de Epstein-Barr. La evidencia de que estos virus sean capaces de causar corioamnionitis clínica es muy limitada. Sin embargo, se ha demostrado que la infección placentaria por adenovirus está asociada con corioamnionitis histológica.

3.4. CORIOAMNIONITIS: FACTORES DE RIESGO, DIAGNÓSTICO CLÍNICO, EFECTOS SOBRE EL RECIÉN NACIDO E INDICACIÓN DE DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

3.4.1. Factores de riesgo de la corioamnionitis

Los principales factores de riesgo de la corioamnionitis son la rotura prolongada de la bolsa amniótica, el parto prolongado, la nuliparidad, la monitorización interna durante el parto, las exploraciones vaginales repetidas, la vaginosis bacteriana previa, la edad (joven), el tabaquismo, el abuso de alcohol o drogas, la inmunosupresión, la colonización por estreptococo beta-hemolítico del grupo B o por *Ureaplasma* spp. y las infecciones genitales de transmisión sexual.

Aunque la rotura prematura de membranas es uno de los principales factores de riesgo de la corioamnionitis clínica, hay que señalar que junto con el parto prematuro, la rotura prematura de membranas pretérmino es frecuentemente una consecuencia de la corioamnionitis subclínica.

3.4.2. Diagnóstico clínico de la corioamnionitis

La corioamnionitis clínica se diagnostica basándose únicamente en los signos y síntomas clínicos. Se requiere la presencia de fiebre materna, además de otros dos signos de los siguientes criterios clínicos menores: taquicardia materna, taquicardia fetal, leucocitosis materna, dolor uterino y líquido amniótico maloliente. La fiebre materna es el signo clínico más importante de la corioamnionitis y está presente entre el 95-100% de los casos de corioamnionitis clínica. La taquicardia materna y/o fetal también se presenta en el 50-80% y 40-70% de los casos, respectivamente de corioamnionitis clínica.

Aparte de fiebre y la taquicardia, otros signos que se utilizan para el diagnóstico de la corioamnionitis clínica son muy subjetivos y menos frecuentes. El dolor uterino y el mal olor del líquido amniótico se presentan entre el 4-25% de los casos de corioamnionitis.

Los criterios clínicos individuales tienen una sensibilidad variable y una baja especificidad por lo que, para un diagnóstico correcto de corioamnionitis clínica, hay que considerar otras posibles causas de la fiebre y de los síntomas clínicos. Aunque, en ausencia de otras etiologías, la combinación de tres criterios clínicos proporciona un diagnóstico altamente preciso de la corioamnionitis clínica. Además, tener algún factor de riesgo de corioamnionitis, especialmente la rotura de membranas, refuerza más el diagnóstico.

Ante la sospecha de corioamnionitis, y cuando no se cumplen los criterios clínicos para establecer el diagnóstico, se puede recurrir a pruebas complementarias de laboratorio. La leucocitosis materna con desviación izquierda se presenta entre el 70-90% de los casos de corioamnionitis clínica. Sin embargo, es difícil de establecer para todos los casos un valor fiable de recuento leucocitario que permita distinguir si el origen de la fiebre es infeccioso o no y, en ausencia de otros signos o síntomas, la leucocitosis tiene un valor limitado, ya que puede estar inducida por otras causas, como el tratamiento con corticoides antes del parto.

Otras pruebas analíticas como altos niveles de proteína C reactiva, de proteína de unión al lipopolisacárido, de la molécula soluble de adhesión intercelular 1 y de la interleucina 6, también se han asociado con un mayor riesgo de corioamnionitis.

Los estudios de bienestar fetal tienen un papel esencial en el diagnóstico de la corioamnionitis y deben realizarse de forma sistemática. En el test basal no estresante, un dato precoz de la infección intraamniótica es la aparición de un patrón no reactivo asociado a taquicardia fetal. En la ecografía, la corioamnionitis se asocia precozmente con ausencia de movimientos respiratorios y, de forma más tardía, con ausencia de movimientos fetales y de tono fetal.

El diagnóstico se puede completar con la amniocentesis cuando existan dudas razonables a través de la clínica o de las exploraciones complementarias anteriormente citadas. Además de confirmar la sospecha de corioamnionitis clínica, la amniocentesis es de gran utilidad para diagnosticar la corioamnionitis subclínica en mujeres con riesgo de parto prematu-

ro espontáneo y rotura de membranas en pretérmino con edad temprana de gestación. En el líquido amniótico obtenido se determina el recuento leucocitario, la concentración de glucosa y se realiza la tinción de Gram y el cultivo microbiológico. En condiciones normales no debe haber leucocitos en el líquido amniótico. Se considera un resultado positivo si presenta >50 leucocitos/mm³. La concentración de glucosa de menos de 14 mg/dl tiene una sensibilidad para detectar un cultivo positivo en líquido amniótico del 87% y una especificidad del 91,7%. Si el punto de corte se baja a menos de 5 mg/dl, aumenta la correlación con el cultivo positivo a un 90%. La tinción de Gram es diagnóstica si se observan microorganismos, pero en caso de ser negativa, no excluye el diagnóstico de corioamnionitis. Uno de los inconvenientes de la tinción de Gram es que no se visualizan algunos microorganismos como los micoplasmas genitales. La tinción de Gram tiene una sensibilidad que oscila entre el 36-80% y una especificidad entre el 80-97%. El cultivo de líquido amniótico es la prueba más fiable y se considera el patrón de referencia para el diagnóstico de la corioamnionitis. Sin embargo, se estima que aproximadamente el 30% de los cultivos bacterianos son negativos, a pesar de que otros análisis y pruebas de laboratorio sugieran la infección intraamniótica. Esto se puede producir por diferentes causas, entre ellas están, el tratamiento previo con antimicrobianos o que se trate de microorganismos que no crecen con los métodos de cultivo convencionales. Se han utilizado métodos moleculares como la PCR universal (16S ARNr) para la detección bacteriana en líquido amniótico. En comparación con el cultivo convencional, estas técnicas tienen mayor sensibilidad y especificidad y facilitan la detección de la mayoría, si no de todas, las especies bacterianas presentes en el líquido amniótico. Además, están cambiando nuestro conocimiento de la frecuencia y el tipo de microorganismos que participan en las infecciones intrauterinas pero, a pesar de toda la información que aportan, todavía no están estandarizadas y no están disponibles en todos los laboratorios clínicos. Por el contrario, los resultados obtenidos por estos métodos moleculares en muestras de placenta no son satisfactorios porque hay evidencias que indican que algunas sustancias presentes en el corion impiden la detección del ADN bacteriano mediante PCR.

También se puede realizar la detección de citocinas proinflamatorias en el líquido amniótico que indican invasión bacteriana de la cavidad amniótica como: la interleucina-1, el factor de necrosis tumoral, la interleucina-6, la interleucina-8 y la metaloproteínasa-9 de

matriz. Por último, en todas las pacientes con sospecha de corioamnionitis deben realizarse hemocultivos.

3.4.3 Efectos de la corioamnionitis sobre el recién nacido

La corioamnionitis se asocia con un aumento de la morbilidad y mortalidad maternal y perinatal. Las complicaciones maternas, además de la sepsis, se relacionan con el parto y la alteración del mismo, como: parto pretérmino, cesárea, atonía uterina, hemorragia postparto. Además, en caso de cesárea en una gestante diagnosticada de corioamnionitis se incrementa el riesgo de complicaciones como: hemorragia, infección, absceso pélvico, tromboembolismo y endometritis.

La morbilidad y mortalidad neonatal relacionada con la corioamnionitis es inversamente proporcional a la edad gestacional al nacimiento e incluye: sepsis neonatal, neumonía, hemorragia intraventricular y daño de la sustancia blanca cerebral con posibles secuelas a corto y largo plazo como la parálisis cerebral. En niños prematuros, la tasa de complicaciones por la corioamnionitis es aún mayor que en los recién nacidos a término, e incluye: la muerte perinatal (25% vs. 6%, en prematuro vs. a término), sepsis neonatal (28% vs. 6%), neumonía (20% vs. 3%), los grados 3 o 4 de hemorragia intraventricular (24% vs. 8%) y distress respiratorio (62% vs. 35%). Globalmente, la corioamnionitis se asocia con hasta un 40% de los casos de sepsis neonatal de aparición temprana. La rotura patológica de las membranas ovulares, tanto la rotura prematura como la rotura prolongada, se asocian a un aumento de sepsis neonatal. En recién nacidos a término asociados con corioamnionitis la frecuencia de neumonía neonatal, sepsis y muerte perinatal es respectivamente de un 4%, 8% y 2%. La frecuencia de distress respiratorio en los recién nacidos a término varía en presencia y ausencia de corioamnionitis (20% y 2%, respectivamente).

La corioamnionitis también está bien establecida como un factor de riesgo a largo plazo en trastornos del neuro-desarrollo especialmente cuando ocurre antes de término. En neonatos a término y cerca de término la corioamnionitis se asocia con un aumento de 4 veces en la frecuencia de parálisis cerebral.

3.4.4. Indicación para la realización del diagnóstico microbiológico

El objetivo del cultivo y la tinción de Gram del líquido amniótico es confirmar los casos sintomáticos de corioamnionitis clínica y detectar los casos asintomá-

ticos. En los casos de sospecha de corioamnionitis clínica, el cultivo del líquido amniótico puede confirmar el diagnóstico, y reducir el riesgo de transmisión materno-fetal de la infección. En las pacientes con rotura prematura de membranas que están asintomáticas y en temprana edad de gestación, los resultados microbiológicos en el líquido amniótico, pueden orientar intervenciones específicas que disminuyan la morbi-mortalidad neonatal, porque cuando el cuadro clínico ya se ha establecido, aumenta significativamente el riesgo de graves secuelas fetales y neonatales. En el caso de no confirmarse la infección, se puede mantener el embarazo, ya que el riesgo de complicaciones neonatales puede ser mayor si el parto se realiza a muy temprana edad de gestación. Sin embargo, si por el contrario se confirma microbiológicamente la infección, se podría decidir inducir el parto o la cesárea. En este contexto, la tinción de Gram proporciona un diagnóstico rápido para establecer la estrategia terapéutica más adecuada en el manejo clínico de la paciente. Además, el cultivo permite conocer los microorganismos implicados y su patrón de sensibilidad frente a los antimicrobianos para instaurar un tratamiento eficaz. Las infecciones intraamnióticas son a menudo polimicrobianas, favoreciendo la sinergia entre los diferentes microorganismos involucrados, lo que en la mayoría de los casos aumenta la respuesta inflamatoria. Las citoquinas proinflamatorias implicadas en el proceso patogénico de la corioamnionitis son muy variables y pueden reflejar distintas respuestas según las especies bacterianas presentes.

El cultivo del líquido amniótico es el “patrón de referencia” para el diagnóstico de la infección intrauterina. Uno de sus inconvenientes es que no detecta las infecciones localizadas en las membranas fetales por lo que es conveniente complementarlo con el cultivo de la placenta. De hecho, cuando se realizan cultivos de las membranas corioamnióticas y del líquido amniótico en el mismo paciente, se demuestra que en las membranas se aíslan el doble de microorganismos que en el líquido amniótico (20% vs. 9%).

Aunque los cultivos de la placenta no se realizan de manera rutinaria, cada vez hay más datos que sugieren una estrecha relación entre la invasión microbiana de la cavidad amniótica y la corioamnionitis. El cultivo de la placenta puede proporcionar el diagnóstico y la etiología de la corioamnionitis después del parto. Aproximadamente, la mitad de todas las placentas con parto antes del segundo trimestre y el 41% de las placentas obtenidas por cesárea, portan microorganismos en el corion detectables mediante técnicas de

cultivo. El aislamiento de estos microorganismos proporciona información sobre los posibles daños fetales y secuelas neonatales.

3.5. MECONIO

El meconio es el término que describe las primeras heces del neonato, que se van formando durante el periodo fetal, y que normalmente se van expulsando en varias deposiciones durante las primeras 48 horas de vida. El meconio es una sustancia viscosa y espesa de color verde oscuro compuesto por restos de líquido amniótico deglutido, material de descamación y secreciones gastrointestinales fetales y bilis.

El meconio, al igual que tracto digestivo del feto, se considera estéril y se coloniza después del parto. En este contexto y con la evidencia disponible, se considera que el cultivo del meconio expulsado tras el parto no es útil para el diagnóstico de las infecciones bacterianas neonatales de transmisión vertical, ya que en la mayoría de los casos, su positividad sólo indica colonización bacteriana. Por ello, no se recomienda su cultivo en todos los recién nacidos como método de cribado para el diagnóstico de la infección neonatal, porque tiene una baja sensibilidad y especificidad para este propósito. No obstante, se ha demostrado su utilidad en algunas situaciones clínicas concretas como la granulomatosis infantiséptica (una forma diseminada de infección por *L. monocytogenes*). En este caso, observar abundantes bacilos grampositivos en la tinción de Gram del meconio, puede proporcionar una sospecha diagnóstica precoz. Sin embargo, en esta infección también se puede aislar el microorganismo en otras muestras del neonato como el líquido amniótico, la placenta, muestras superficiales (faringeo, ótico, nasal), sangre y a veces, en el LCR.

3.6. LOQUIOS

Los loquios es el nombre que se le da a la descarga del útero en su proceso de involución y regeneración tras el parto. Los loquios están compuestos de fibrina, células deciduales, eritrocitos, leucocitos y microorganismos que forman parte de la microbiota del tracto vaginal como por ejemplo, estreptococos anaerobios, *E. coli*, estafilococos y *Clostridium* spp. Los loquios no tienen mal olor y varían en la cantidad expulsada, la densidad y color durante el puerperio. Los primeros tres días contienen una mezcla de sangre fresca y decidua necrótica que les da un color rojo oscuro (*loquia rubra*). Si el proceso es normal, en los días siguientes disminuyen tanto en cantidad como en contenido san-

guíneo, tomando un color más rosa con un aspecto seroso (*loquia serosa*). Por último, entre los 7-14 días postparto, continúa disminuyendo la cantidad de líquido expulsado y se aclara a un color blanco amarillento (*loquia alba*). El proceso de eliminación de loquios dura aproximadamente entre 4 y 6 semanas. Si la madre tiene fiebre y los loquios son anormalmente densos, no varían en cantidad o color, y tienen mal olor, pueden indicar infección o retención de fragmentos placentarios. Aún en este caso, cuando hay sospecha de infección, los loquios no se consideran muestras útiles para cultivo microbiológico por ser una muestra de baja calidad, ya que están contaminados con la microbiota presente en el tracto genital, y puede que los resultados obtenidos no sean representativos del proceso infeccioso.

3.7. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.7.1. Obtención de las muestras

El diagnóstico microbiológico de la corioamnionitis se fundamenta en el cultivo y en el análisis microscópico de las muestras de líquido amniótico y de las membranas de la placenta. Además, en todos los casos sospechosos de corioamnionitis deben obtenerse siempre muestras de sangre para la realización de hemocultivos. Se estima que el 10% de las mujeres con infecciones intraamnióticas tienen bacteriemia.

En las pacientes con factores de riesgo de corioamnionitis está indicado el cultivo de orina para la detección de infección urinaria o bacteriuria asintomática. Del mismo modo, puede ser útil el cultivo vaginorectal para detectar el estreptococo beta-hemolítico de grupo B y el cultivo de exudados vaginal y cervical. Aunque conviene señalar que el aislamiento de microorganismos en la vagina o el cérvix, no implica necesariamente que estos sean los causantes de la corioamnionitis si esta se produce.

Las infecciones intraamnióticas producidas por *Candida* spp. son infecciones con mal pronóstico clínico y con una alta mortalidad en los recién nacidos prematuros, por lo que se precisa que el diagnóstico sea lo más rápido posible para poder instaurar precozmente el tratamiento antifúngico. Aunque es posible recuperar las levaduras en los medios bacteriológicos convencionales es recomendable el uso de al menos un medio selectivo de cultivo de hongos (agar Sabouraud o similar).

La calidad de las muestras clínicas recibidas en el laboratorio depende del cumplimiento de una serie de

normas relacionadas con el procedimiento de obtención y transporte. Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano, siempre que las condiciones clínicas de la paciente lo permitan, y con las máximas condiciones de asepsia evitando la contaminación con microbiota comensal y ambiental.

Las muestras se introducirán en contenedores estériles con cierre hermético adecuados a su tamaño, que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad, sin añadir formol ni otros conservantes.

1. Líquido amniótico

La recogida de líquido amniótico para estudios microbiológicos se realiza por amniocentesis transabdominal, aspiración con aguja en el momento de la cesárea o a través de un catéter transcervical intrauterino. El volumen mínimo requerido dependerá de los estudios que se desee realizar pero se recomienda al menos un mínimo de 1 mL.

2. Placenta

Las muestras de placenta se deben tomar de la capa coriónica junto con su tejido subyacente, el trofoblasto. En esta capa, que no tiene contacto directo con la cavidad amniótica y el exterior es menos probable que se produzca contaminación. Los cultivos de la superficie de las membranas (amnios) son de valor limitado para la detección de las infecciones intrauterinas porque los resultados positivos pueden representar contaminación de la microbiota vaginal o comensal.

Antes de tomar la muestra se debe verificar que el amnios está adherido al disco placentario. Si hay zonas donde el amnios se ha separado o despegado dejando expuesto el corion subyacente, se tomara la muestra de otra zona del disco placentario, que mantenga ambas capas unidas. El área idónea para tomar la muestra es en el punto medio de la distancia más larga entre la zona de inserción del cordón y el borde del disco placentario. Una vez identificado el lugar de la toma de la muestra, se levanta con unas pinzas estériles la capa superior de las membranas (amnios), y se corta con unas tijeras estériles separándola de la capa coriónica. Cuando estén bien separadas ambas capas, con un segundo conjunto de pinzas estériles, se ejerce tracción del corion hacia fuera y se cortan con otro bisturí estéril trozos de unos 10 mm de esta membrana coriónica y el trofoblasto subyacente. Estas muestras de tejido se introducen en un envase estéril adecuado para su tamaño y cierre hermético que no contenga ni formol ni conservantes.

3. Sangre

Se debe obtener muestra de sangre para hemocultivo en todas las pacientes que presenten signos o síntomas de infección sistémica.

3.7.2. Transporte y conservación de las muestras

El transporte adecuado de las muestras es determinante en la fiabilidad del resultado final. Se realizará de forma inmediata tras su obtención. En general la recuperación de los microorganismos anaerobios disminuye si el tiempo de transporte es superior a las tres horas. Las muestras deben procesarse lo antes posible tras su llegada al laboratorio, y en caso de que esto no sea posible, se deberán conservar a temperatura ambiente hasta que sean procesadas.

3.7.3. Recepción de las muestras

Una vez que la muestra se recibe en el laboratorio hay que verificar que cumple los requisitos de calidad necesarios para su procesamiento como se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1a (2ª edición): "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología".

3.7.4. Criterios de rechazo de las muestras

Los criterios de rechazo que incumplan los requisitos de calidad establecidos deben estar reflejados en un manual elaborado en el laboratorio. En caso de rechazo de la muestra se debe informar por escrito al clínico solicitante el motivo del mismo.

Las muestras de placenta son únicas y las de líquido amniótico de difícil obtención por los riesgos que conlleva su extracción para la paciente, por lo que los criterios de rechazo, deben reducirse al máximo. No deben aceptarse las muestras sin identificar o en las que los datos no coincidan con los del volante de petición. Tampoco se aceptarán las muestras derramadas, las recogidas en recipientes no estériles ni las conservadas en formol u otros aditivos. No obstante antes de rechazar la muestra se debe consultar con el clínico responsable de la solicitud. Si la muestra es insuficiente para todas las determinaciones solicitadas, también 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".

3.8. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El pretratamiento de las muestras debe realizarse según recoge el punto 7 del Procedimiento en Microbio-

logía Clínica de la SEIMC nº1a (2ª edición): “Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras”. 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, micobacterias, micoplasmas y ureaplasmas, se seguirán las recomendaciones de los Procedimientos en Microbiología de la SEIMC nº 9a “Micobacterias”, nº 21 “Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudio de la sensibilidad a los antifúngicos” y nº 40 “Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp.”.

El procesamiento se realiza según los protocolos establecidos en el laboratorio y de la información que aporta el servicio solicitante sobre la muestra y el paciente. Por tanto, el procesamiento dependerá de varios factores: la petición del servicio solicitante, el tipo de muestra, el método de obtención, la sospecha diagnóstica, cuadro clínico, enfermedades de base y el motivo de la 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 considere convenientes. Se recomienda conservar una porción de las muestras refrigeradas durante al menos siete días por si se necesitara realizar estudios complementarios o confirmar los resultados con un nuevo procesamiento.

1. Líquido amniótico

El líquido amniótico se debe centrifugar a 1200x g durante 5-10 minutos. Una vez centrifugado se transfiere todo el sobrenadante excepto los últimos 0,5 mL con una pipeta estéril a otro envase por si fuera necesario para realizar pruebas adicionales (por ejemplo, estudios moleculares o virología). El sedimento se vuelve a suspender con el líquido restante. Las extensiones para la tinción de Gram se realizan tomando directamente del sedimento con una pipeta una gota que se deposita y se extiende con un asa de siembra en un porta. La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el sedimento a los medios de cultivo.

2. Placenta

Las muestras de placenta si son suficientemente grandes se deben fraccionar con bisturí en una placa de Petri estéril. Después cada trozo se debe homogeneizar en un dispositivo tipo estomacher o en un mortero estéril con una pequeña cantidad de tampón fosfato salino (PBS), hasta que la muestra de tejido de placenta

se disgregue completamente, antes de su siembra en los medios de cultivo. La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el homogeneizado a los medios de cultivo.

Las extensiones para la tinción de Gram se realizan directamente de la muestra, del sedimento o del material homogeneizado mediante pipeta o asa de siembra.

3.8.1. Medios de cultivo

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 de líquido amniótico y los homogeneizados de placenta se realizará en medios convencionales para bacterias aerobias y facultativas (agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey). Para el cultivo de las bacterias anaerobias se debe utilizar un medio no selectivo como el agar Brucella o agar Schaedler y otros medios selectivos para anaerobios como: el agar *Bacteroides bilis* esculina con amicacina (BBE), el agar con alcohol fenil-étilico (PEA) y un agar sangre selectivo, como el agar Schaedler con neomicina y vancomicina (SNV) o con kanamicina y vancomicina (SKV) o el agar Brucella con kanamicina, vancomicina y sangre lacada (ASLKV). 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 caldo tioglicolato o BHI.

3.8.2. Condiciones de incubación

Las placas de agar sangre se incubarán a 35-37°C en aire o atmósfera con 5% de CO₂. Las placas de agar chocolate o CNA también a 35-37°C siempre con atmósfera enriquecida en 5% de CO₂. Las placas para el cultivo de anaerobios a 35-37°C en atmósfera de anaerobiosis (jarras o cámaras). Los caldos se incubarán a 35-37°C. Se comprobará diariamente el crecimiento de microorganismos mediante visualización de turbidez, y en caso de que este aparezca se realizará subcultivo en los medios sólidos descritos previamente. El tiempo de incubación de las placas y los caldos de enriquecimiento será de al menos 5 días.

3.9. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN E INFORMA DE LOS RESULTADOS

3.9.1. Tinción de Gram

Se evaluará la presencia o ausencia de bacterias, elementos fúngicos y células inflamatorias. Se valorará la

presencia o ausencia de leucocitos polimorfonucleares al microscopio con el objetivo 40x y se registrará su presencia con esquema no cuantitativo: como aislados (≤ 1 PMN/campo), escasos (1-10 PMN/campo), moderados (11-25 PMN/campo) y abundantes (> 25 PMN/campo). La presencia de al menos 6 leucocitos por campo es altamente sugestivo de un proceso infeccioso. Se valorará cualquier microorganismo que se visualice en la tinción de Gram porque esta técnica tiene una alta correlación con los resultados del cultivo.

Los resultados de la observación microscópica de las extensiones se informarán lo antes posible al clínico peticionario y quedarán registrados en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra. Esto permitirá correlacionar los morfotipos visualizados con los aislados.

3.9.2. Cultivos

Las placas de agar y los medios líquidos serán examinados diariamente para detectar la presencia de crecimiento. La primera lectura de los medios incubados en aerobiosis y atmósfera de CO_2 se realizará a las 24 horas de incubación y la de los medios incubados en anaerobiosis a las 48 h.

Si se obtienen cultivos mixtos se realizarán los subcultivos necesarios para obtener los microorganismos en cultivo puro. Una vez obtenido el cultivo puro, se hará una identificación presuntiva mediante pruebas rápidas como tinción de Gram, y las técnicas que estén disponibles en cada laboratorio, pruebas bioquímicas o espectrometría de masas. Estos sistemas permiten realizar las identificaciones en unos minutos directamente de las colonias en las placas de cultivo primario reduciendo significativamente el tiempo en la emisión de los resultados.

Históricamente el útero se ha considerado estéril. Sin embargo, existe evidencia que indica la presencia de microorganismos en el líquido amniótico, las membranas fetales y la placenta. De hecho, la presencia de bajos niveles de microorganismos puede servir como un importante estímulo temprano para el desarrollo del sistema inmune fetal. Sin embargo, si no se controla la cantidad y los microorganismos presentes, puede producirse un proceso inflamatorio que puede afectar el desarrollo fetal y provocar un parto prematuro. En la interpretación de los resultados microbiológicos de la infección intrauterina, se debe valorar el potencial patógeno e invasivo de los microorganismos aislados, y su capacidad para inducir una respuesta inflamatoria sistémica, independientemente de que otros factores

prenatales y postnatales, también puedan contribuir a esta reacción. Además, hay que tener en cuenta el carácter polimicrobiano de estas infecciones que favorece la sinergia entre los microorganismos presentes, lo que en muchos casos aumenta la respuesta inmune. Por ello, se deben identificar, valorar e informar todos los microorganismos aislados en estas muestras. Los microorganismos especialmente virulentos e invasivos, como *S. agalactiae*, *E. coli* (u otras enterobacterias) o *L. monocytogenes* que son microorganismos capaces de escapar de los tejidos, causar una infección generalizada y una elevada respuesta inflamatoria, deben valorarse siempre. Los microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana como *G. vaginalis*, *Streptococcus* spp., bacilos gramnegativos anaerobios como *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. y grampositivos anaerobios como *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., deben valorarse como clínicamente significativos ya que son capaces de producir de forma individual citoquinas, quimiocinas o enzimas destructivas de tejidos. Pero además, cuando se aíslan estos microorganismos en cultivos polimicrobianos, se produce un efecto sinérgico que incrementa la respuesta inflamatoria.

También, se identificarán e informarán otros microorganismos que suelen aislarse menos frecuentemente como: *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., *Capnocytophaga* spp. *Actinomyces* spp. o cualquier especie del género *Candida*.

Se valorarán los microorganismos de la microbiota de la piel como los estafilococos coagulasa negativa o *Propionibacterium* spp. como microorganismos de baja virulencia que no inducen una elevada respuesta inflamatoria ni suelen producir una infección generalizada. Estos microorganismos, en general, se consideran colonizadores o contaminantes, pero se deben identificar e informarse, al igual que cualquier otro microorganismo aislado. La interpretación de su relevancia clínica dependerá del contexto clínico de la paciente y de otras pruebas analíticas. También se valorarán las especies de *Lactobacillus* porque aunque tienen escaso poder patógeno, su importancia clínica reside en su efecto supresor de la respuesta inflamatoria.

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.

Si se considera relevante el hallazgo se avisará al clínico responsable del paciente. Se identificarán todos los

aislados clínicamente significativos a nivel de especie y se realizarán las pruebas de sensibilidad a los antibióticos según las normas de cada laboratorio.

No se recomienda la realización rutinaria de las pruebas de sensibilidad a todos los aislamientos de bacterias anaerobias. Sin embargo, existen situaciones concretas en las que puede tener interés realizar pruebas de sensibilidad a los microorganismos anaerobios: cuando se aislen en cultivo puro o predominante y se les considere significativos clínicamente, en las infecciones graves o complicadas o en aislados de pacientes que hayan sido previamente tratadas y que no responden al tratamiento.

Si no hay crecimiento se reincubarán todas las placas. Si se observa turbidez indicativa de crecimiento en el caldo de enriquecimiento se realizará tinción de Gram y según los microorganismos que se observen, se realizarán los subcultivos en los medios generales y selectivos adecuados para su aislamiento.

3.9.3. Informe de resultados

Para que la información microbiológica tenga utilidad en el manejo de la paciente cualquier información sobre la tinción de Gram o los cultivos, que pueda tener significado clínico e influencia en el tratamiento debe ser notificada lo antes posible al clínico responsable, mediante informes provisionales escritos o telefónicos, máxime si se tiene en cuenta que estos resultados pueden reconducir la actitud terapéutica e influir en el desarrollo del embarazo.

1. Tinción de Gram. Se debe comunicar el resultado de la tinción de Gram el mismo día en que se recibe la muestra. Se informarán todos los microorganismos visualizados y la presencia de leucocitos polimorfonucleares, que se pueden informar como aislados, escasos, moderados o abundantes.

2. Cultivos. Si el resultado del cultivo es positivo, el informe de resultados incluirá todos los microorganismos aislados y su sensibilidad a los diferentes antimicrobianos según las normas de cada laboratorio.

Si el resultado del cultivo es negativo, al finalizar el periodo de incubación de los medios de cultivo, se emitirá un informe en el que conste "No se aíslan microorganismos".

4. MASTITIS: DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

4.1. INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

En los últimos años, la lactancia materna está siendo objeto de un renovado interés debido a los múltiples beneficios que este tipo de alimentación proporciona a la pareja madre-hijo a corto, medio y largo plazo. En este sentido, la OMS recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses y que, llegada esta edad, el destete se realice de forma gradual, de tal manera que la lactancia se mantenga durante un tiempo no inferior a los dos años. Hoy en día, estas recomendaciones son difíciles de cumplir en nuestro entorno debido a los condicionantes laborales y/o a la falta de información y apoyo.

Desde el punto de vista médico, las mastitis constituyen la principal causa de destete no deseado; sin embargo, resulta sorprendente la escasez de estudios microbiológicos sobre mastitis humanas a pesar de que en la mayoría de los casos tienen una etiología bacteriana. Esta situación contrasta con la existente en medicina veterinaria, donde el conocimiento sobre la etiología, patogenia, diagnóstico y tratamiento de las mastitis es notablemente mayor, dado que implica un problema económico y de calidad de primera magnitud en los sistemas de producción láctea. Actualmente, la ausencia de un diagnóstico etiológico y de antibiogramas provoca que, en muchas ocasiones, se prescriba un tratamiento inadecuado y que, en tales circunstancias, las mujeres con mastitis tengan que optar por continuar con un amamantamiento doloroso o abandonar la lactancia.

La mastitis es más frecuente en la segunda y tercera semanas posparto y la mayoría de los estudios indican que entre el 75% y el 95% de los casos se producen en las primeras doce semanas. Sin embargo, puede ocurrir en cualquier momento de la lactancia. La incidencia de esta enfermedad oscila, dependiendo de los estudios, entre el 5% y el 33% de las madres lactantes. Las diferencias entre esas cifras se debe a las diferencias en la definición de caso; así, las cifras más bajas suelen incluir únicamente las mastitis agudas mientras que en las más elevadas incluyen también las subagudas, que siguen estando muy infradiagnosticadas. En cualquier caso, se trata de una patología común entre las madres lactantes y que, con excesiva frecuencia, conduce a un abandono precoz e innecesario de la lactancia. Las mastitis infecciosas pueden ser unilaterales o bilaterales y, en ambos casos, afectar a una o más unidades glandulares de cada pecho.

Aproximadamente, un 5% de los casos de mastitis cursan con la formación de un absceso mamario. El

principal agente etiológico de abscesos mamarios es *S. aureus*, seguido de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. agalactiae*. Más del 50% de las cepas de *S. aureus* causantes de abscesos son resistentes a metilicina. La mayoría de los abscesos mamarios tienen su origen en la complicación de una mastitis infecciosa debido a un tratamiento tardío o inadecuado, a las características de la cepa bacteriana implicada o a la respuesta de la propia glándula mamaria. El dolor es más intenso que en las mastitis y los signos externos muy evidentes ya que la piel de la zona donde se localiza el absceso suele estar enrojecida, caliente, turgente y descamada, observándose en muchos casos una evidente deformación del pecho y fiebre.

4.2. PAPEL DE LA MICROBIOTA

Estudios recientes han revelado que tanto el calostro como la leche humana son una fuente de bacterias que colonizan y dominan el intestino del lactante. Las primeras descripciones de la diversidad bacteriana en muestras de leche procedentes de mujeres sanas se basaron en el empleo de medios de cultivo y pusieron de manifiesto la presencia de diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*, incluyendo nuevas especies como *Streptococcus lactarius*. Estas bacterias constituyen la microbiota natural de la glándula mamaria durante la lactancia y, por ende, de la leche humana.

El número de especies bacterianas cultivables existentes en la leche de mujeres sanas parece ser bajo, oscilando entre 2 y 15. A pesar de ello, existe una gran variabilidad interindividual, de tal manera que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, a modo de huella dactilar, de forma análoga a lo que sucede con la microbiota intestinal de niños y adultos. Los estafilococos coagulasa negativa, con *S. epidermidis* a la cabeza, y los estreptococos del grupo *viridans*, son las bacterias dominantes en leche materna, mientras que la presencia de especies de otros géneros es más variable. Por lo tanto, no es casualidad que en los últimos años se esté poniendo de manifiesto que la presencia de *S. epidermidis* sea una característica diferencial de las heces de los niños amamantados. Por otra parte, se ha observado que la concentración de lactobacilos, enterococos y bifidobacterias es significativamente más elevada en la microbiota de lactantes que en la de niños alimentados con fórmulas infantiles.

El empleo de métodos moleculares que no requieren el cultivo de los microorganismos (particularmente aquellos basados en el gen que codifica la fracción 16S del ARNr) ha proporcionado una visión complementaria de la biodiversidad del microbioma de la leche humana. Su aplicación ha confirmado que la leche materna es una fuente de estafilococos, estreptococos, bacterias lácticas, corinebacterias, propionibacterias o bifidobacterias. También ha puesto de manifiesto que algunas bacterias anaerobias estrictas de los géneros *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, etc, típicamente asociadas a la microbiota intestinal, pueden estar presentes en este fluido.

El origen de las bacterias presentes en la leche humana es un tema de gran actualidad. Tradicionalmente se había considerado la leche materna humana como un fluido estéril y que la colonización del intestino del neonato empezaba durante el parto debido a la contaminación de su cavidad oral con bacterias procedentes de las microbiotas vaginal e intestinal de la madre; posteriormente, las bacterias pasarían de la boca del niño al pecho de la madre y, junto con las bacterias existentes en la piel de la madre, contaminarían la leche al ser eyectada. Sin embargo, en los últimos años, se ha confirmado que al menos algunas de las bacterias que habitan la leche proceden del intestino materno y emplean ciertas células del sistema inmunitario como vehículos para la colonización del epitelio mamario. Este flujo bacteriano se conoce como ruta o circulación entero-mamaria. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una elevada tasa de traslocación bacteriana desde el intestino hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, primero, y la glándula mamaria, después, al final de la gestación y durante la lactancia. En esos mismos periodos, las mujeres lactantes poseen bacterias asociadas a células del sistema inmunitario tanto en la propia leche como en sangre periférica, además de una gran cantidad de ADN bacteriano libre. La traslocación desde el intestino materno es un hecho fisiológico al final del embarazo y durante la lactancia, resultando beneficioso para la maduración del sistema inmunitario neonatal o como vía de comunicación madre-hijo.

4.3. MASTITIS: ASPECTOS CLÍNICOS, ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

Las mastitis consisten en la inflamación de uno o varios lóbulos de la glándula mamaria acompañada o no de infección. La etiología infecciosa es tan elevada que algunos autores definen directamente "mastitis" como

un proceso infeccioso de la glándula mamaria que se acompaña de diversos síntomas locales y sistémicos. De hecho, cada vez resulta más evidente que las mastitis se deben a una disbiosis (o alteración de la composición de la microbiota normal) de la glándula mamaria.

En la práctica, coexisten diversos términos relacionados con problemas de lactancia (“ingurgitación”, “obstrucción”, “retención”, “induración”, “estasis de leche”, “pezones doloridos”, etc.), que crean mucha confusión ya que, en muchos casos, se solapan o son sinónimos. Por ejemplo, las obstrucciones han sido tradicionalmente consideradas como factores que predisponen a la mastitis cuando, realmente, constituyen manifestaciones de la propia mastitis.

Las mastitis se han clasificado tradicionalmente en diferentes subgrupos dependiendo de diversos criterios, tales como su relación o no con la lactancia (lactacionales/puerperales o no lactacionales), su curso (agudas, subagudas, crónicas, recurrentes, etc) o la presencia o no de síntomas clínicos (clínicas o subclínicas). En cualquier caso, conviene matizar que en este protocolo se van a considerar únicamente las mastitis relacionadas con la lactancia, dejando a un margen otro tipo de procesos inflamatorios de la mama, como aquellos asociados con el cáncer de mama.

En general, se pueden distinguir diversos tipos de mastitis infecciosas durante la lactancia, que difieren en su etiología, patogenia, sintomatología y tratamiento. Además, dentro de cada tipo, los casos pueden oscilar desde leves a muy severos dependiendo de diversos factores, como la concentración bacteriana, las glándulas afectadas, el estado inmunitario de la mujer o la capacidad de succión del niño, entre otros.

4.3.1. Mastitis clínicas

4.3.1.1. Mastitis agudas.

Son cuadros caracterizados por una intensa inflamación local (dolor, enrojecimiento, tumefacción, induración e ingurgitación) y de síntomas sistémicos similares a los de la gripe: fiebre (que puede ser alta), escalofríos, dolores musculares y articulares, malestar general e, incluso, náuseas y vómitos. En ocasiones, los ganglios axilares están inflamados, aunque hay que señalar que, a veces, este signo se confunde con la inflamación de la extensión axilar de una de las glándulas mamarias.

4.3.1.2. Mastitis subagudas.

Son cuadros caracterizados por una inflamación local (dolor punzante, calambres, sensación de quemazón,

induración) con ingurgitación pero, en general, sin la aparición de zonas de enrojecimiento en el pecho. Normalmente no hay síntomas sistémicos o estos suelen ser muy leves. Este tipo de mastitis está muy infravalorado e infradiagnosticado, a pesar de que representa la mayor parte de los casos de mastitis y de que pueden provocar síntomas locales intensos.

4.3.1.3. Mastitis granulomatosas.

Son inflamaciones de la glándula mamaria poco frecuentes pero cuyo diagnóstico suele crear confusión. Generalmente afectan a mujeres en edad fértil y pueden presentarse incluso algunos meses después de haber finalizado la lactancia. Habitualmente es un proceso unilateral que se manifiesta por una o más masas inflamatorias dolorosas, de consistencia firme y, a veces, con inflamación cutánea que casi siempre se ubica fuera de la areola mamaria y que puede evolucionar hacia la formación de úlceras y abscesos, fistulización y/o supuraciones crónicas. En este sentido, poseen un gran potencial para la deformación morfológica del pecho afectado. Al examinar las zonas inflamadas (bien externamente o bien mediante técnicas de imagen), éstas se asemejan a las que se observan en mujeres con carcinoma de mama.

Si no se tratan adecuadamente, todas las mastitis pueden devenir en cuadros recurrentes o convertirse en mastitis crónicas. Por otra parte, el tratamiento incompleto o inadecuado de una mastitis aguda puede conducir a una mastitis subaguda. Tanto las mastitis agudas como las subagudas pueden ir acompañadas o no de grietas o heridas en la areola mamaria o pezón.

4.3.2. Mastitis subclínicas

Además, también existen **mastitis subclínicas**. Se trata de cuadros causados generalmente por las mismas especies bacterianas que las subagudas, pero que no cursan con dolor o este es muy leve. Se caracterizan por una falsa sensación de poca producción de leche (que, en general, también sucede en los otros tipos de mastitis) y suelen corresponder con comentarios habituales del tipo “*mi leche no alimenta al niño*”, “*no tengo suficiente leche*”, “*mi leche no es nutritiva*”, etc. En la gran mayoría de los casos ni la producción de leche está comprometida ni la composición nutricional es inadecuada; simplemente, la formación de biopelículas o *biofilms* en el interior de los conductos galactóforos impide la correcta secreción de la leche.

4.3.3. Etiología

Los principales agentes etiológicos de mastitis infecciosas pertenecen a los géneros *Staphylococcus* y

Streptococcus. Así, los estafilococos son las bacterias implicadas en un mayor porcentaje de casos debido a que las condiciones existentes en los conductos galactóforos al final del embarazo y durante las primeras semanas de lactancia son ideales para su crecimiento. Entre ellos, *S. aureus* suele ser responsable de las mastitis agudas y de la formación de abscesos. Mucho más infrecuentemente, *S. pyogenes* y *S. agalactiae* también pueden causar este tipo de cuadros. Los estafilococos coagulasa negativa, y especialmente *S. epidermidis*, son la principal causa de mastitis subagudas y, de hecho, constituyen a día de hoy la primera causa de mastitis en términos cuantitativos. Este hecho se ha observado reiteradamente en mastitis porcinas, caninas, bovinas, ovinas y caprinas y la situación parece similar en las mastitis humanas. Es más, la inoculación de cepas de *S. epidermidis* aisladas de casos de mastitis humana en las glándulas mamarias de ratonas lactantes provoca la aparición de mastitis.

El análisis del genoma completo de algunas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* de origen humano concuerda con su implicación en los distintos cuadros de mastitis. La primera especie está especialmente capacitada para causar infecciones agudas mientras que las propiedades de la segunda están más vinculadas con infecciones crónicas, insidiosas y/o recurrentes. Algunas especies de los géneros *Streptococcus* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*), *Enterococcus* (*Enterococcus faecalis*) y *Corynebacterium*, también están frecuentemente implicados en casos de mastitis subagudas. Además, algunos géneros (por ejemplo, *Rothia* o *Kocuria*) de la familia *Micrococcaceae* contienen especies que podrían actuar como agentes causales de mastitis subagudas y que, debido a los cambios taxonómicos sufridos por el grupo en los últimos años, han podido pasar desapercibidos o ser incorrectamente identificados. Las corinebacterias (*Corynebacterium kroppenstedti*, *Corynebacterium tuberculostearicum* *Corynebacterium amycolatum*) son, en la actualidad, la principal causa de mastitis granulomatosas.

Bastante más infrecuente es la implicación de diversas enterobacterias, como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Enterobacter* spp., a diferencia de lo que suele suceder en otras especies de mamíferos. Excepcionalmente, se han identificado especies como *Salmonella typhi* o *Salmonella paratyphi* como causantes de mastitis y abscesos mamarios, pero estos casos no tuvieron lugar durante la lactancia. *Mycobacterium tuberculosis* es otra causa rara de mastitis. La incidencia de la tuberculosis mamaria oscila entre el 0,1% de los países

desarrollados y el 0,3%–5% en las regiones endémicas.

4.3.4. Patogenia y sintomatología

Como se ha comentado anteriormente, las **mastitis agudas** se deben, en la mayoría de los casos, a la presencia de *S. aureus* en la glándula mamaria. Esta especie, a diferencia de otras del mismo género, no suele estar presente en la glándula mamaria en condiciones fisiológicas; sin embargo, muchas personas son portadoras en las mucosas del tracto nasofaríngeo, digestivo o genitourinario, desde donde pueden colonizar la glándula mamaria durante la lactancia. Una vez allí, pueden proliferar y sintetizar toxinas que provocan una gran inflamación del tejido mamario, dando lugar a síntomas locales intensos. Además, pueden provocar una importante ingurgitación del pecho a través de la formación de biopelículas en los conductos galactóforos, tal y como se detallará más adelante al hablar de las mastitis subagudas. Teniendo en cuenta la gran vascularización de la glándula mamaria durante la lactancia, las toxinas se absorben, alcanzan la circulación sistémica y provocan un cuadro sistémico, muy semejante al que se produce durante un episodio similar al de la gripe.

Las **mastitis subagudas** son las más frecuentes y, además, las que causan un mayor número de casos de interrupción precoz de la lactancia por lo que merecen una atención especial. En este caso, el problema se debe a un sobrecrecimiento de ciertas especies de estafilococos coagulasa negativa, estreptococos de los grupos *mitis* o *salivarius* y algunas especies del género *Corynebacterium* en el interior de los conductos galactóforos. Todas ellas, a diferencia de *S. aureus*, son habituales en la glándula mamaria durante la lactancia pero a concentraciones muy moderadas ($<10^3$ ufc/mL). En condiciones fisiológicas, se disponen formando una película fina en los bordes internos de los conductos, permitiendo un flujo completamente normal de leche (Figura 1A). La presión de la leche al salir hace que algunas de estas bacterias se pongan en suspensión en este fluido. No obstante, existen ciertos factores (que se contemplarán posteriormente) que hacen que estas bacterias puedan proliferar y alcanzar concentraciones por encima de las fisiológicas ($>10^3$ ufc/mL) provocando un cuadro de mastitis subaguda. Las especies implicadas en estos casos no sintetizan toxinas por lo que no pueden provocar ni un cuadro local agudo ni síntomas sistémicos. En este caso, el dolor se debe a que las bacterias, al sobrecrecer, forman densas biopelículas en el interior de los conductos galactóforos (Figura 1B). Este hecho

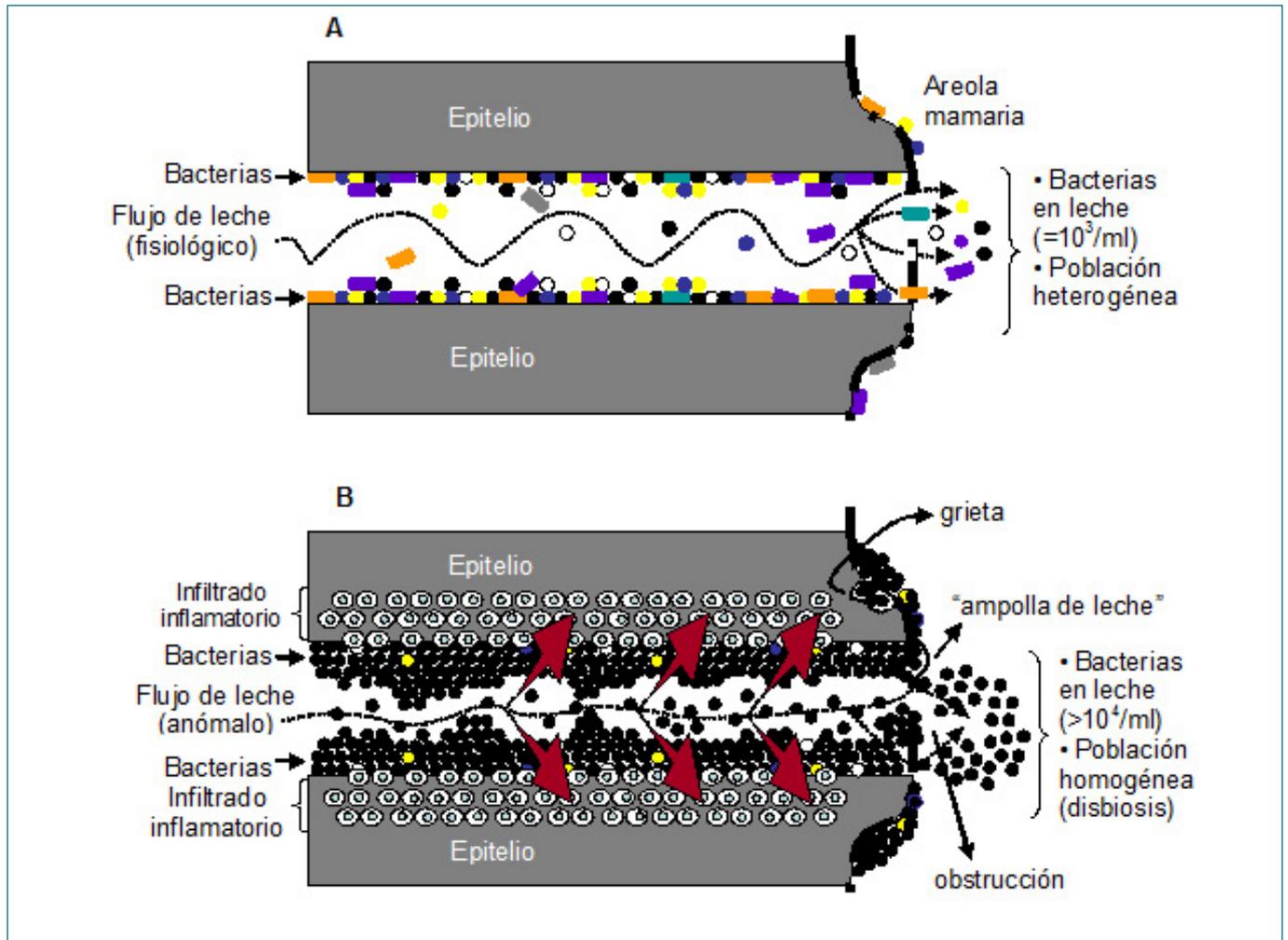


Figura 1. Representación esquemática de la etiopatogenia de las mastitis humanas. Disbiosis del epitelio mamario. Epitelio mamario en condiciones fisiológicas (A) y durante las mastitis (B). Las flechas rojas indican el aumento de presión de la leche al pasar por una luz disminuida. Esta presión sobre una zona inflamada es la responsable del dolor punzante, los calambres y/o la sensación de quemazón.

conduce, por una parte, a la inflamación del epitelio mamario (al estar soportando una densidad bacteriana mucho mayor de lo normal) y, por otra, a que la leche tenga que pasar por un conducto cuya luz es cada vez más estrecha; al pasar por un lugar cada vez más estrecho, la leche (como cualquier otro fluido) ejerce una presión cada vez mayor. Esa mayor presión se ejerce sobre un epitelio que está inflamado, de tal manera que cuando la leche pasa por ese conducto origina dolor (referido en muchas ocasiones como "cristales" o "agujas"), con calambres ocasionales (que pueden llegar a ser intensos y reflejar hacia la espalda o la axila) y, a veces, sensación de quemazón. Si el crecimiento es particularmente elevado ($>10^3$ ufc/mL), las bacterias pueden llegar a obstruir totalmente los conductos galactóforos; en consecuencia, se produce una ingurgitación (también conocido como éxtasis o retención

de leche) que empeora los síntomas locales (dolor, zonas de induración en el interior del pecho). Es frecuente que este hecho proporcione a la madre la falsa sensación de que la producción de leche ha disminuido; sin embargo, en estos casos, no está afectada la producción sino la secreción: una parte importante de la leche que se produce no se secreta sino que se retiene y se reabsorbe, lo que afecta sensiblemente al caudal que se eyecta al exterior. Muchas veces, la disminución de caudal es perceptible a simple vista ya que la leche en vez de salir simultáneamente por varios orificios del pezón y a propulsión, acaba saliendo por uno o dos orificios y escurriendo o en forma de goteo. El hecho de que no se suelen acompañar de enrojecimiento local ni de síntomas sistémicos confunde frecuentemente el diagnóstico clínico y provoca que se trate de un problema infradiagnosticado.

Tabla 1. Tipos de mastitis, principales agentes etiológicos y sintomatología.

Tipo	Principales agentes etiológicos	Sintomatología
Agudas	<i>Staphylococcus aureus</i>	Síntomas locales: enrojecimiento, tumefacción, calor, dolor, ingurgitación (zonas de induración), disminución de la secreción de leche. Posibilidad de formación de abscesos. Síntomas sistémicos: fiebre, dolores musculares, dolores articulares, escalofríos, etc (similares a gripe)
Subagudas	<i>S. epidermidis</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Rothia</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp.	Síntomas locales: dolor (pinchazos, calambres, sensación de quemazón), ingurgitación (zonas de induración), disminución de la secreción de leche. La leche sólo sale por 1-2 orificios del pezón y escurre/gotea (en vez de salir en forma de chorro). Niños: tomas largas y/o frecuentes Alternan momentos en los que están relajados con fases en las que hacen un amamantamiento agresivo (tiran del pezón, movimientos característicos de cabeza)
Granulomatosas	<i>Corynebacterium</i> spp. <i>Mycobacterium</i> spp.	Ausencia de dolor Resto similar al de las subagudas

La disminución del caudal de leche tiene dos efectos sobre el niño: a) que las tomas sean más largas y/o más frecuentes; y b) que el niño tenga dos tipos de comportamiento durante las mismas; en algunas ocasiones el niño está tranquilo, relajado, pero en otras está enfadado y hace un amamantamiento más agresivo, tirando bruscamente del pezón y haciendo unos movimientos muy característicos con la cabeza. El hecho de que el niño tenga que estar más tiempo en un pecho inflamado unido a que, en ciertas fases, tenga un amamantamiento más agresivo hacen que la glándula mamaria se siga inflamando y determina un círculo vicioso característico de las mastitis subagudas. En ocasiones, cuando estas obstrucciones ocurren en los propios orificios del pezón, se forman unas estructuras características, integradas por una matriz de calcio recubierta de bacterias, conocidas como “ampollas” o “perlas” de leche.

Por lo que respecta a las **mastitis granulomatosas**, las corinebacterias se encuentran en preparaciones histológicas de tejido mamario profundo, rodeadas por una reacción inflamatoria granulomatosa. Histológicamente, las lesiones se caracterizan por una lobulitis crónica, necrosante, no caseificante, con formación de granulomas. Los granulomas tienen una apariencia muy característica: una capa externa de histiocitos epitelioides que rodea a una colección de

polimorfonucleares neutrófilos. A su vez, los polimorfonucleares neutrófilos se disponen alrededor de una vacuola central que contiene lípidos disueltos (motivo por el que también reciben el nombre de lipogranulomas supurativos) y en la que se encuentran las corinebacterias. Las corinebacterias implicadas suelen tener un marcado carácter lipofílico, propiedad que parece particularmente relevante en la patogenia de este tipo de mastitis. De hecho, su lipofilia le permite crecer firmemente adherido a los glóbulos de grasa, lo que le proporciona acceso a una abundante fuente exógena de ácidos grasos. El hecho de que estas bacterias afecten especialmente a mujeres en edad fértil, entre algunos meses y pocos años después de haber tenido un hijo, sugiere que su sobrecrecimiento puede estar estrechamente ligado a la gran disponibilidad de ácidos grasos durante la lactancia. Como los granulomas se desarrollan lentamente, es frecuente que el cuadro clínico aparezca incluso algunos meses después de haber finalizado la lactancia. En la Tabla 1 se recogen los principales agentes etiológicos implicados en los distintos tipos de mastitis, así como la sintomatología asociada a cada uno de ellos.

4.3.5. Factores predisponentes

El ecosistema mamario resulta adecuado para la colonización y el crecimiento de muchas especies bac-

terianas durante la lactancia y este proceso de co-evolución ha conducido a un estado de aceptación o tolerancia mutua. Sin embargo, cualquier alteración de ese equilibrio puede conducir a una infección. Existen dos hechos fisiológicos que permiten que algunas bacterias (especialmente estafilococos y estreptococos) que se encuentran normalmente en la glándula mamaria durante la lactancia puedan alcanzar concentraciones muy elevadas en un tiempo muy breve si fallan los mecanismos de control de sus poblaciones. En primer lugar, son los microorganismos con mayor capacidad para crecer en sistemas de conductos, independientemente de que sean conductos naturales o artificiales. En ese sentido, es bien conocido que *S. epidermidis* representa la primera causa de infecciones hospitalarias, generalmente asociadas a catéteres, sondas y dispositivos similares. Por lo tanto, la glándula mamaria representa un ecosistema ideal para su crecimiento y para la formación de biopelículas. En segundo lugar, los estafilococos y estreptococos son las bacterias con sistemas más eficientes para utilizar la lactosa y los oligosacáridos de la leche humana. Es decir, se encuentran en un ecosistema ideal y con nutrientes que favorecen su crecimiento selectivo.

Aparte de estos hechos fisiológicos, existen otros factores que predisponen al desarrollo de una mastitis infecciosa. En general, estos factores se pueden clasificar en tres grandes grupos: 1) factores que dependen del propio hospedador (polimorfismos en ciertos genes; mayor o menor activación de receptores de tipo Toll en las células presentadoras de antígenos, alteraciones en la producción extracelular de proteínas que intervienen en las reacciones de estrés celular, capacidad de reclutamiento de neutrófilos sanguíneos por parte del tejido mamario, funcionalidad de las lectinas de unión de manosas, nivel de expresión de compuestos antimicrobianos a nivel mamario, etc.); 2) factores que dependen de las bacterias implicadas (factores de virulencia; resistencia a antibióticos, capacidad de formación de biopelículas, mecanismos de evasión de las respuestas del sistema inmunitario, etc.); y (3) factores médicos (antibióterápia durante embarazo, parto y lactancia, niveles de hierro, etc.).

4.3.6. Factores protectores

Al igual que hay factores que predisponen a las mastitis, existen factores que protegen a la madre de este problema y que se pueden clasificar en los mismos grupos que los que predisponen a la mastitis: 1) factores que dependen del propio hospedador (algunos polimorfismos en genes implicados en la regulación del sistema inmunitario, la producción de ciertos oli-

gosacáridos de la leche humana, concentración de inmunoglobulinas A, CD14, lactoferrina, lisozima y péptidos antimicrobianos; 2) factores que dependen de la microbiota mamaria (diversidad, mecanismos de competencia, producción de bacteriocinas, etc.); y 3) factores médicos (empleo de ciertos probióticos, prebióticos y simbióticos, reducción del uso de antibióticos y de la administración de hierro cuando sea posible, etc.).

4.3.7. Efectos de la mastitis en el lactante

Desde el punto de vista microbiológico, es evidente que la leche de una mujer con mastitis está aportando una concentración superior a lo normal de ciertas especies bacterianas al niño. Sin embargo, esto no supone un riesgo de infección infantil. En este sentido, se ha observado que las mastitis son compatibles con la lactancia, incluyendo el periodo de tratamiento con ciertos antibióticos, antiinflamatorios y/o probióticos. Ante cualquier duda sobre la compatibilidad entre un medicamento y la lactancia, la información proporcionada por las bases de datos *Drugs and Lactation Database (LactMed, United States National Library of Medicine; <http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/lactmed.htm>)* y *e-lactancia* (Servicio de Pediatría del Hospital de Denia; <http://e-lactancia.org/>) resulta una fuente de consulta muy útil para el facultativo. Por otro lado, desde el punto de vista nutricional, no existe hasta la fecha ningún dato que demuestre que la composición de macronutrientes de la leche de mujeres con mastitis sea inferior a la de la leche fisiológica. En consecuencia, ni los tratamientos que pueda recibir la madre, ni los posibles riesgos para la salud del niño, ni la pérdida de calidad de la leche son argumentos que justifiquen la interrupción de la lactancia en los casos de mastitis infecciosa.

4.4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: INDICACIÓN DE REALIZACIÓN

La mastitis humana, como ya se ha señalado anteriormente, constituye un problema tan infravalorado como infradiagnosticado. Este hecho se debe, por una parte, a que únicamente se suelen considerar como tales los casos agudos que cursan con enrojecimiento del pecho y fiebre elevada. Por otra, a que los casos en los que se realiza un cultivo de leche son verdaderamente excepcionales y, cuando se hacen, la recogida de la muestra y/o la interpretación de los resultados suele ser errónea debido a la ausencia de protocolos estandarizados. En tales circunstancias, el diagnóstico de "mastitis" se suele basar en la inspección visual del pecho, lo que no sólo excluye a la mayoría de los ca-

sos sino que fomenta falsas creencias, como la de que el amamantamiento doloroso se debe a una infección fúngica. En consecuencia, la posibilidad de error en el diagnóstico de mastitis es muy elevada. Por lo tanto, estaría indicado realizar un diagnóstico microbiológico en todas aquellas mujeres con un amamantamiento doloroso, independientemente de que sea unilateral o bilateral.

En este sentido, el análisis microbiológico de la leche es el único medio posible de obtener un diagnóstico etiológico de mastitis. El cultivo de leche no sólo es esencial para el diagnóstico etiológico de una mastitis, sino que puede ser clave para el éxito del abordaje terapéutico, mediante la realización de los correspondientes antibiogramas. Habitualmente, el tratamiento de las mastitis se instaura de forma empírica y suele consistir en la prescripción de cloxacilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, mupirocina, etc. Desafortunadamente, un porcentaje cada vez más elevado de cepas implicadas en mastitis son resistentes a estos antibióticos, una situación que se ha descrito previamente para las cepas asociadas con mastitis bovina.

4.5. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

4.5.1. Recogida

Como se ha mencionado anteriormente, la leche no es un fluido estéril. No obstante, se puede contaminar con microorganismos ambientales por lo que es muy importante dar instrucciones claras a la paciente para realizar una recogida adecuada de la muestra.

Deben seguirse las recomendaciones generales detalladas en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1ª (2ª edición): "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología", teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano siempre que las condiciones clínicas de la paciente lo permitan.
- La limpieza de la areola mamaria y el pezón antes de la recogida de la leche no disminuye la concentración bacteriana de la muestra.
- Las muestras se deben recoger inmediatamente antes de una toma y, si es posible, tras haber transcurrido al menos dos horas desde la toma anterior. El mejor momento para su recogida es la primera toma de la mañana (06:00 h -08:00 h).
- Tras la toma anterior a aquella en la que se vayan a recoger las muestras para el cultivo, no se debe aplicar ningún tipo de pomada o solución tópica (lanolina, antibióticos, antisépticos, antiinflamatorios, etc.) ni tampoco utilizar ningún tipo de accesorio (conchas u otros) que provoque un acumulo de leche en contacto directo con areolas mamarias y pezones; en caso contrario, se deben lavar dichas partes del pecho con agua templada y jabón neutro, y secarlos con una toalla limpia o una toallita de un solo uso inmediatamente antes de la recogida.
- Inmediatamente antes de la recogida, la paciente debe lavarse las manos con agua caliente y jabón (o producto similar) y secárselas con una toalla limpia o una toallita de un solo uso.
- La recogida de muestras de leche se debe efectuar mediante extracción manual, sin la ayuda de ningún tipo de accesorio (pezoneras y otros). En ningún caso se deben emplear bombas extractoras (sacaleches). Todos estos utensilios pueden ser una fuente importante de microorganismos ajenos a la glándula mamaria (por su manipulación y por los microorganismos que contiene el agua potable con la que se lavan o aclaran).
- Se deben desechar las primeras gotas de leche (aproximadamente 4-5 primeras gotas).
- La recogida de leche se debe realizar en un recipiente de plástico estéril, de boca ancha, sin fugas y la paciente debe cerrarlo correctamente. Nunca se debe recoger la leche de recipientes intermedios (cucharas, biberones, vasos, botellas, etc.) donde la paciente haya depositado la leche previamente.
- Si los dos pechos están afectados, hay que recoger una muestra de cada uno en un envase independiente, empezando por el pecho que esté menos afectado.
- El volumen necesario para el cultivo de una muestra de leche es de 1 mL.

4.5.2. Transporte y conservación de las muestras

El transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse lo antes posible. Si no pueden ser enviadas en las dos primeras horas tras su recogida, pueden conservarse en nevera (refrigeración) hasta 24 h. Aunque la leche actúa como crioprotector para los microorganismos, únicamente se deben congelar cuando el transporte al laboratorio se retrase más de 2 horas y no puedan ser conservadas en nevera. Las muestras deben procesarse con rapidez a su llegada al laboratorio y, una vez procesadas, pueden conservarse en

nevera un máximo de 48 horas para realizar, en caso que sea necesario, posibles confirmaciones de los resultados obtenidos.

4.6. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

4.6.1. Recepción de las muestras

Las muestras de leche que llegan al laboratorio deben cumplir con las normas establecidas para la aceptación de las muestras. Deben estar correctamente identificadas y acompañadas de su volante de petición, en papel o electrónico, perfectamente cumplimentado. Se deberá comunicar al laboratorio cualquier otra información que sea imprescindible para la interpretación de los resultados.

No deben aceptarse las muestras sin identificar o en las que los datos no coincidan con los de la petición, ni aquellas muestras derramadas o recogidas en envases no estériles. En caso de rechazo, se informará detalladamente del motivo al clínico solicitante.

4.6.2. Procesamiento de las muestras

El cultivo de la leche es la técnica de elección para el diagnóstico de la infección mamaria durante la lactancia, no sólo porque permite identificar y cuantificar e los agentes causales y estudiar su sensibilidad a los antibióticos, sino porque permitirá conocer la epidemiología real de la infección. Este aspecto es importante teniendo en cuenta que el diagnóstico microbiológico de las mastitis constituye una novedad para la mayor parte de laboratorios de Microbiología Clínica. El diagnóstico final debe sustentarse en dos pilares: el cultivo y la sintomatología clínica.

4.6.2.1. Medios de cultivo e inoculación.

La siembra de las muestras se realizará mediante inoculación directa (asa de 10 µl) de los medios de cultivo convencionales para bacterias grampositivas aerobias y facultativas (agar sangre, agar chocolate). Para obtener un recuento cuantitativo, la leche debe ser previamente homogeneizada, moviendo la muestra con suavidad para evitar la formación de espuma. EL cultivo se realiza sembrando la superficie total de la placa para poder realizar el recuento bacteriano.

No se debe sembrar más de una muestra de leche por placa.

4.6.2.2. Condiciones de incubación de los cultivos.

Los cultivos de leche se deben incubar a 35-37°C en atmósfera aerobia (agar sangre) o en CO₂ (agar choco-

late) antes de ser interpretados. La mayoría de bacterias causantes de infección mamaria se pueden poner en evidencia en 18-24 horas. En casos determinados, bacterias exigentes o cultivo negativo, podría ser necesario ampliar el periodo de incubación a las 48 horas.

4.6.2.3. Lectura de los cultivos.

Las placas se deben examinar para su valoración después del tiempo adecuado de incubación (este aspecto es importante para leches sembradas durante la tarde o noche).

- Cultivos sin crecimiento: si las placas no presentaran crecimiento después del tiempo adecuado de incubación, el cultivo debe considerarse como negativo. En este caso, y también cuando aparezcan colonias muy pequeñas, se prolongará la incubación otras 24 o 48 horas, para su posterior valoración.
- Cultivos con crecimiento: es importante discriminar entre especies causantes de mastitis (*S. aureus*, *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativa, *Rothia* spp., *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Corynebacterium* spp., *E. faecalis*, etc) de aquellas especies que pueden formar parte de la microbiota mamaria y que no causan mastitis (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, otras bacterias lácticas, *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., etc) y también de aquellas que pueden proceder de la manipulación o lavado de dispositivos empleados para la recogida de la leche (Enterobacteriaceae, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp, levaduras, etc.) que no se considerarán valorables, aunque, por supuesto, siempre deben considerarse en el contexto clínico del paciente.

Se deberán valorar los posibles morfotipos presentes y realizar el recuento de colonias para cada una de las posibles especies cuando el recuento total sea mayor o igual a 1.000 ufc/ml. Para la identificación se remite al Procedimiento de la SEIMC nº 37 (2ª edición) "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología". La utilización de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) reduce significativamente el tiempo en la emisión de los resultados. El informe final es de suma importancia al permitir ajustar el tratamiento empírico dado previamente a la paciente. Se realizarán las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los aislados clínicamente significativos según las normas de cada laboratorio (consultar los Procedimientos en Microbiología de la SEIMC números 38 y 39 y los correspondientes de los comités EUCAST y GLSI).

4.7. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN E INFORME DE LOS RESULTADOS

Al igual que sucede con el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos, en estas muestras se deben valorar como significativos los aislados de microorganismos que en otras muestras biológicas, como la piel, se considerarían como microbiota normal (estafilococos coagulasa negativa, corinebacterias, estreptococos de los grupos *mitis* y *salivarius*, etc). En condiciones fisiológicas, la concentración total de bacterias en muestras recogidas en las condiciones descritas anteriormente suele oscilar entre $1-3 \times 10^2$ ufc/mL, con un límite máximo de, aproximadamente $6-8 \times 10^2$ ufc/ml. Cualquier valor por encima de esta concentración puede ser compatible con un cuadro de mastitis infecciosa. No obstante, el valor suele estar notablemente aumentado en estos casos. La concentración máxima de bacterias que se puede esperar en una muestra de leche con mastitis se sitúa es de $1-3 \times 10^6$ ufc/ml. Por lo que respecta a *S. aureus*, esta especie no es frecuente en leche humana en condiciones fisiológicas (<10%) y puede provocar mastitis a concentraciones mucho más bajas que las de las bacterias citadas anteriormente. También, es posible que existan cultivos mixtos (diversas especies de los grupos anteriores) en pacientes con mastitis, sin que este hecho indique una contaminación de las muestras.

La información emitida por el laboratorio debe ser exacta y clara, no dando lugar a falsas interpretaciones. Debe contener los elementos necesarios que ayuden al clínico en la interpretación del resultado. En cuanto al cultivo, si no se observa crecimiento o este no es significativo se informará como “Cultivo negativo” o “Crecimiento no significativo”. En ocasiones, este tipo de resultados puede deberse a la antibioterapia aplicada previamente a la recogida de las muestras. Si se observa un recuento significativo de un solo microorganismo, se informará del mismo con la identificación de la bacteria y la sensibilidad a los antibióticos apropiados. En los cultivos mixtos en los que se valoren todos los morfotipos presentes en el medio de cultivo, se informará del recuento de cada microorganismo, su identificación y sensibilidad.

La presencia de una concentración baja ($<5 \times 10^2$ ufc/mL) de corinebacterias en mujeres con mastitis supurativas que aparecen incluso algunos meses después de finalizar la lactancia puede sugerir la presencia de granulomas generados por estas bacterias. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de bacterias gramnegativas (Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*

spp., *Stenotrophomonas* spp.) y levaduras (*Candida* spp.) suele estar asociada a un protocolo inadecuado de recogida de las muestras. En tales casos, pueden estar presentes en concentraciones muy elevadas ($>1 \times 10^4$ ufc/mL).

5. LECHE MATERNA DONADA: BANCO DE LECHE

5.1. INTRODUCCIÓN Y CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y las diversas sociedades científicas pediátricas recomiendan el inicio de la lactancia materna en la primera hora de vida, la lactancia exclusivamente materna durante los primeros 6 meses, e introducir alimentos complementarios seguros y nutricionalmente adecuados, continuando con la lactancia materna hasta los dos años de vida o más. La leche materna aporta muchos beneficios tanto a la madre como al niño y protege al recién nacido frente a infecciones, reduciendo así la mortalidad neonatal. Más allá del aporte de sustratos energéticos, proteínas, vitaminas y minerales, la lactancia materna comprende aspectos como: la influencia en la relación madre-hijo, el establecimiento de la microbiota intestinal, la prevención de la enterocolitis necrosante, la prevención de infecciones, el establecimiento de hábitos y ritmos biológicos, la maduración del sistema nervioso central, la selección celular y la programación de sistemas, así como la prevención de enfermedades crónicas en el futuro.

La alimentación con leche materna, comparada con la leche de fórmula, posee importantes ventajas sobre todo para los prematuros, los recién nacidos de muy bajo peso al nacer y los neonatos enfermos. El recién nacido prematuro presenta características nutricionales y funcionales diferenciales que, según el peso al nacimiento y la edad gestacional, serán la base para llevar a cabo su soporte nutricional. La evidencia científica avala la superioridad nutricional y de compuestos bioactivos de la leche materna: especificidad de nutrientes, máxima biodisponibilidad, aporte de células vivas: linfocitos y macrófagos, enzimas digestivas, inmunomoduladores y factores de crecimiento. Desafortunadamente, la lactancia materna no siempre es posible, bien porque no se dispone de leche de la propia madre o, en otras ocasiones, la cantidad producida no es suficiente para cubrir las necesidades del recién nacido. En estos casos, la ESPGHAN (*European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology*

and Nutrition) recomienda la alimentación con leche humana donada debido a sus efectos beneficiosos a corto y largo plazo. En los últimos años, conforme se ha ido avanzando en los cuidados de los niños prematuros y enfermos, se han ido creando potentes redes de bancos de leche que intentan promocionar la creación de nuevos centros y unificar criterios en la selección y procesamiento de la leche. En España durante el 2008, se constituyó la *Asociación Española de Bancos de Leche Humana* (AEBLH), entidad no lucrativa que tiene como finalidad genérica la de fomentar todas las actividades relacionadas con la obtención, conservación, manipulación y distribución de leche humana. La AEBLH tiene entre sus objetivos la creación de unos estándares de calidad españoles para todos los bancos de leches, así como promocionar y fomentar todas aquellas actividades que favorezcan la lactancia materna. Agrupados en la AEBLH, existen actualmente los siguientes bancos de leche en activo en España: Palma de Mallorca, que entró en funcionamiento en 2001, Madrid (2007), Valencia (2010), Granada (2010), Barcelona (2011), Zaragoza (2011) y Mérida (2012). Desde Marzo del 2015, la comunidad de Castilla y León cuenta también con un banco de leche materna y en otras ciudades, como en Oviedo y en Sevilla, ya se ha anunciado su implantación para los próximos años.

Mientras que Francia cuenta con una legislación vigente en lo referente a la recogida, manipulación y distribución de la leche materna donada, en la legislación española no hay nada específicamente a este respecto. Es por ello que en España se están siguiendo los procedimientos para la donación y el procesamiento establecidos en otros bancos de leche, así como la normativa aplicable para la manipulación de alimentos (reglamento ce 852/2004). Se han establecido a su vez, sistemas de seguridad y trazabilidad de las muestras de leche donadas con igual rigor que para la donación y recepción de la sangre (RD 1088/2005).

La leche humana donada destinada al consumo de recién nacidos, particularmente en las unidades de cuidados intensivos neonatales, no debe presentar microorganismos en cantidad o calidad capaces de poner en riesgo la salud del neonato. De esta forma, es preciso que se disponga de procedimientos capaces de asegurar la calidad sanitaria de la leche. La pasteurización representa una alternativa eficaz, conocida desde hace mucho tiempo y practicada en el campo de tecnología de los alimentos, la cual asegura la inactivación del 100% de los microorganismos patógenos no esporulados (las esporas de *Bacillus* spp. proce-

denes de contaminación ambiental pueden resistir la pasteurización) sin que se vea alterada la composición nutricional de la leche. Sin embargo, éste tratamiento térmico puede reducir determinados componentes biológicos de la leche materna y elimina también la mayor parte de microbiota endógena presente de forma natural en la misma. Aunque en la mayor parte de los guías se recomienda la pasteurización de la leche humana mediante el método Holder (62,5° C, 30 min) para asegurar la seguridad microbiológica de la leche donada, se han descrito métodos alternativos de pasteurización, a altas temperaturas y tiempos cortos (72°C, 5-15 segundos), para reducir también la alteración de compuestos con actividad biológica.

5.2. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: INDICACIÓN DE REALIZACIÓN

Los organismos internacionales dedicados a la salud de la población infantil como la OMS y UNICEF, así como importantes sociedades científicas, afirman que la lactancia materna es la forma de alimentación ideal para el crecimiento y desarrollo de todos los niños, y recomiendan que cuando no se disponga de leche de la propia madre, la leche pasteurizada de madres donantes seleccionadas sea la siguiente opción para la alimentación, sobre todo si se trata de recién nacidos muy prematuros o lactantes con problemas de salud. Sin embargo, hay que tener en cuenta que sin el cribado de las donantes y los controles oportunos no es posible conocer el verdadero riesgo a que se expone a los lactantes cuando se comparte leche materna. Por esta razón, se hace necesaria la realización de controles microbiológicos para confirmar la seguridad de la leche en los bancos. Bajo la perspectiva microbiológica, la calidad de la leche donada depende principalmente de las condiciones higiénico-sanitarias en su manipulación, principalmente, en lo que respecta a la obtención y recogida de la leche materna. A su vez, hay que tener en cuenta que determinadas infecciones víricas y bacterianas se pueden transmitir a través de la leche humana, así como drogas legales e ilegales.

Las mujeres candidatas para ser donantes deben estar lactando, gozar de buena salud y tener un hábito de extracción de leche, así como estar dispuestas a extraerse su propia leche. Es necesario que firmen un consentimiento informado de todo el proceso. En los bancos de leche, las donantes son sometidas a un escrupuloso proceso de selección, que incluye una revisión de los antecedentes médicos, hábitos y/o estilo de vida y un estudio serológico para descartar enfermedades infecciosas potencialmente transmi-

bles (hepatitis B-C, VIH, HTLV, sífilis). También se les recomienda una serie de pautas para realizar la extracción, almacenamiento y transporte de la leche con las máximas garantías higiénico-sanitarias y evitar así, en la medida de lo posible, la contaminación de las mismas. Aún en estas circunstancias, un pequeño porcentaje de las muestras que llegan a los bancos de leche se pueden descartar si muestran unos niveles de contaminación bacteriana por encima de los límites establecidos que desaconsejen su utilización.

Los criterios que determinan la calidad y seguridad microbiológica de la leche, previa pasteurización, no están estandarizados a nivel internacional. Aunque en este documento solo se desarrollan aspectos como el control microbiológico post-pasteurización y no se hace referencia a criterios pre-pasteurización, si es necesario mencionar que en algunos países existen requisitos específicos de la leche materna donada, basados bien en el grado de acidez de la leche o en criterios microbiológicos (recuentos de determinados microorganismos), siendo aconsejable seguir las recomendaciones hechas por estas guías internacionales y los propios protocolos de los bancos de leche.

Para proveer leche humana donada con garantías sanitarias el procedimiento de funcionamiento en el banco de leche es el siguiente: la leche se extrae en el propio domicilio de la donante mediante un sacaleches o de forma manual, en unos recipientes específicos y según las indicaciones que se han proporcionado previamente en el banco. La leche materna deberá permanecer congelada hasta su llegada al banco de leche y ser transportada en neveras con acumuladores de frío para evitar la ruptura de la cadena de frío. Una vez allí, se procede al registro en base de datos y se comprueba que los recipientes están en buenas condiciones, correctamente etiquetados y conservados. Las muestras de leche donadas serán entonces almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. Previamente a la pasteurización, se procede a la descongelación controlada de la leche. Posteriormente se analiza la composición de nutrientes mediante un analizador basado en espectrometría infrarroja (*human milk analyzer MIRIS®*) y, en función de los criterios internos en cada banco de leche, se mide la acidez en grados Dornic o se hacen recuentos bacterianos. La leche de cada uno de los lotes se divide entonces en alícuotas y se procede a la pasteurización de las mismas mediante el método Holder ($62,5^{\circ}\text{C}$, 30 minutos) seguida de un enfriamiento hasta 4°C . Se recogerá una alícuota de la leche ya pasteurizada para el control microbiológico, y otra alícuota se guarda como muestra testigo.

5.3. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: RECOGIDA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez finalizado el proceso de pasteurización, se recogerá en un tubo estéril una muestra de 2 ml de leche pasteurizada y enfriada de cada uno de los lotes al que se le haya realizado el proceso. Se almacenará a -20°C en el banco de leche una muestra de 1 ml de leche de cada lote, por si fuese necesario la repetición del cultivo.

De forma inmediata, se enviara 1 ml de la muestra de leche al laboratorio de Microbiología para la realización del cultivo microbiológico. La muestra deberá estar debidamente cumplimentada con los datos de la madre y con el código de lote y el código correspondiente para microbiología.

5.4. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El cultivo de la muestra de leche se realizará de manera que nos permita hacer un recuento cuantitativo del número de colonias. Previamente, es necesario que la leche este bien homogeneizada, moviendo la muestra con suavidad para evitar la formación de espuma. La muestra de leche se sembrará, con un asa de siembra de 10 μl , en los medios de cultivo de agar sangre y agar McConkey, los cuales se mantendrán en incubación en estufa a 37°C durante 18-24 horas. En caso de que sea necesario, las placas se reincubarán hasta las 48 horas después de la siembra.

Para la identificación de cada una de las colonias crecidas se utilizarán diferentes métodos de identificación bacteriana disponibles en cada laboratorio (Procedimiento de la SEIMC nº 37). La utilización de espectrometría de masas (MALDI-TOF) permite realizar las identificaciones directamente de las colonias de las placas de cultivo reduciendo significativamente el tiempo en la emisión de los resultados.

5.5. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN E INFORME DE LOS RESULTADOS

Se considerarán aptos para el consumo aquellos lotes con cultivo estéril o con un crecimiento < 5 ufc/10 μl de microorganismos formadores de esporas como *Bacillus* spp. o de otros contaminantes ambiental inocuos que pueden colonizar los sacaleches.

Todos los lotes que presenten algún crecimiento bacteriano de enterobacterias o de cualquier otro tipo de

microorganismo potencialmente patógeno se considerarán como no aptos para el consumo y por lo tanto deberán ser desechados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alós Cortés JI, Andreu Domingo A, Arribas Mir L, Cabero Roura L, de Cueto López M, López Sastre J et al. Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 31:159-172.
- Arroyo R, Mediano P, Martín V, Jimenez E, Delgado S, Fernandez L et al. Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuestas de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Acta Pediatr Esp* 2011; 69:276-281.
- Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto P, De Nisi G, Ambruzzi AM, Biasini A, et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. Italian Association of Human Milk Banks. *Journal of Maternal-Fetal and neonatal Medicine* 2010; 23:1-20.
- Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, Conti A, et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Frontiers in Bioscience* 2011; 1: 818-829.
- Cagno CK, Pettit JM, Weiss BD. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease: Updated CDC Guideline. *Am Fam Physician*. 2012; 86: 59-65.
- Contreras GA, Rodríguez JM. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16:339-356.
- Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* 2008; 8:51.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). *Acta Pediatr Esp* 2009; 67:77-84.
- Di Renzo GC, Melin P, Berardi A, Blennow M, Carbonell-Estrany X, Donzelli GP et al. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a European consensus conference. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014; Early Online:1-17.
- ESPGHAN Committee on Nutrition. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; 57:535-542.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2012; 69:1-10.
- Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes* 2014; 5:169-183.
- Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, Delaney ML, DuBois AM, Allred E, Leviton A; Extremely Low Gestation Age Newborns (ELGAN) Study Investigators. Maternal Microbe-Specific Modulation of Inflammatory Response in Extremely Low-Gestational-Age Newborns. *MBio*. 2011; 2:e00280-10.
- Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD. The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeed Med* 2009; 4:57-61.
- Hartmann BT, Pang WW, Keil AD, Hartmann PE, Simmer K; Australian Neonatal Clinical Care Unit. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Hum Develop* 2007; 83:667-673.
- Hecht JL, Onderdonk A, Delaney M, Allred EN, Kliman HJ, Zambrano E, Pflueger MS, Livasy CA, Bhan I, Leviton A, and for the ELGAN study investigators (2008) Characterization of Chorioamnionitis in 2nd-Trimester C-Section Placentas and Correlation with Microorganism Recovery from Subamniotic Tissues. *Pediatric and Developmental Pathology*: January 2008; 11:15-22.
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 2011; 6:e21313.
- Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). *Acta Pediatr Esp* 2009; 67:125-132.
- Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Ped Gastroenterology Nutr* 2009; 49:343-348.
- Onderdonk AB, Delaney ML, DuBois AM, Allred EN, Leviton A; Extremely Low Gestational Age Newborns (ELGAN) Study Investigators. Detection of bacteria in placental tissues obtained from extremely low gestational age neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198:110.e1-7.
- Protocolos SEGO. Diagnóstico de la Corioamnionitis. *Prog Obstet Ginecol*. 2005; 48: 316-317.
- Tita AT, Andrews WW. Diagnosis and Management of Clinical Chorioamnionitis. *Clin Perinatol*. 2010; 37: 339-354.
- The American Academy of Pediatrics. Policy Statement – Recommendations for the Prevention of Perinatal Group B Streptococcal (GBS) Disease. *Pediatrics* 2011; 128:611-616.
- Vázquez S, Alonso C, Medina C, Bustos G, Martínez MV, Pallás CR. Puesta en marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *An Pediatr* 2009; 71:343-348.
- Verani JR, McGee L, Schrag S; Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease-revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010; 59 (RR-10):1-36.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta	PNT- IPP- 01	
		Edición N° 01	Página 1 de 5

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento del líquido amniótico y la placenta para el diagnóstico microbiológico de la corioamnionitis, así como los criterios de interpretación de los cultivos.

2. FUNDAMENTO

El líquido amniótico y la placenta son las muestras más importantes para el diagnóstico etiológico de las infecciones intrauterinas.

Son muestras que se obtienen mediante un procedimiento invasivo que conlleva riesgos para la mujer, 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 establecer intervenciones específicas en el manejo clínico de la paciente.

El diagnóstico microbiológico de la corioamnionitis se basa en el examen microscópico y el aislamiento de los microorganismos responsables a partir del cultivo del líquido amniótico y la placenta. En el presente documento se describen los métodos a seguir en el procesamiento de estas muestras.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Sánchez C (coordinador). Guerrero Gómez C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.
2. Pérez-Sáenz JL (coordinador). Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero 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. Meseguer MA (coordinadora). Acosta B, Codina MG, Matas L, Meseguer MA. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. Procedimientos en Microbiología Clínica 40. SEIMC 2011. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

La obtención de las muestras debe realizarse bajo estrictas condiciones de asepsia para evitar la contaminación con la microbiota comensal y ambiental y si es posible antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano.

El líquido amniótico se obtiene por amniocentesis transabdominal, aspiración con aguja en el momento de la cesárea o a través de un catéter transcervical intrauterino.

La obtención de las muestras de la placenta se realiza tras el parto, tomando una muestra de la capa coriónica junto con su tejido subyacente, el trofoblasto. Antes de tomar la muestra se debe verificar que el amnios está adherido al disco placentario. Si hay zonas donde el amnios se ha separado o despegado dejando expuesto el corion subyacente, se tomara la muestra de otra zona que mantenga ambas capas unidas. El área idónea para tomar la muestra es el punto medio de la distancia más larga entre la zona de inserción del cordón y el borde del disco placentario. Una vez identificado el lugar de la toma de la muestra, se levanta con unas pinzas estériles la capa superior de las membranas (amnios) y se corta con unas tijeras estériles, separándola de la capa coriónica. Cuando están bien separadas ambas capas, con un segundo conjunto de pinzas estériles, se ejerce tracción del corion hacia fuera y, con otro bisturí estéril, se cortan trozos de un 10 mm de esta capa coriónica y el trofoblasto subyacente. Estas muestras de tejido se introducirán en contenedores estériles con cierre hermético adecuados a su tamaño que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad sin añadir formol ni otros conservantes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta	PNT- IPP- 01	
		Edición N° 01	Página 2 de 5

Estas muestras se enviarán a laboratorio directamente del quirófano o de la sala de extracción.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El transporte se realizará de forma inmediata tras la obtención de la muestra y a temperatura ambiente. En general, la recuperación de los microorganismos anaerobios disminuye si el tiempo de transporte es superior a las tres horas. Las muestras deben procesarse a su llegada al laboratorio, y en caso de que esto no sea posible, se deberán conservar a temperatura ambiente.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Por tratarse de muestras obtenidas por procedimientos quirúrgicos o invasivos se intentará no rechazarlas salvo que se reciban en condiciones defectuosas que impidan completamente su procesamiento.

Se indicará en el informe de resultados cualquier incidencia relacionada con su identificación, transporte o conservación.

Se considerarán incidencias relacionadas con la recepción de la muestra: el retraso en el transporte, la conservación defectuosa (temperatura inadecuada o medio de transporte inadecuado) y que la muestra sea insuficiente para las determinaciones solicitadas. En este último caso se consultará al clínico responsable de la petición el orden de prioridad de las peticiones.

Se considerarán motivos de rechazo los siguientes:

- Muestras mal identificadas y que no haya sido posible resolver la incidencia.
- Muestras derramadas.
- Muestras recogidas en contenedor no estéril, en formol o con otros aditivos.

Si en la muestra se solicita estudio de micoplasmas genitales, se procederá según el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 40 "Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp".

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar colistina-nalidixico (CNA) (optativo)
- Agar MacConkey
- Agar Brucella para anaerobios/agar Schaedler o similar
- Agar sangre lacada con kanamicina, vancomicina (ASLKV) o similar
- Agar Bacteroides bilis esculina (BBE)
- Agar Sabouraud con antibióticos
- Caldo de enriquecimiento: tioglicolato/BHI o similar

5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS:

- Colorantes para tinción de Gram
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera anaerobia

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta	PNT- IPP- 01	
		Edición N° 01	Página 3 de 5

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturís estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Jeringas y agujas
- Asas de siembra estériles
- Portaobjetos
- Vórtex
- Estufa de aerobiosis a 35-37°C
- Estufa con 5% de CO₂ a 35-37°C
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis
- Centrífuga
- Microscopio
- Sistema automatizado de identificación y sensibilidad
- MALDI-TOF (deseable)

7. PROCEDIMIENTO

7.1 PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

- El procesamiento de las muestras se efectuará en una cabina de bioseguridad tipo II.
- El líquido amniótico se debe centrifugar a 1200x *g* durante 5-10 minutos. Una vez centrifugado se transfiere todo el sobrenadante, excepto los últimos 0,5 ml con una pipeta estéril, a otro envase para realizar pruebas adicionales si fuera necesario (por ejemplo, métodos moleculares o virología). El sedimento se resuspende con el líquido restante. Las extensiones para la tinción de Gram se realizan, tomando directamente del sedimento con una pipeta una gota que se deposita y se extiende con un asa de siembra en un porta. La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el sedimento a los medios de cultivo.
- Las muestras de placenta si son suficientemente grandes se deben fraccionar con bisturí en una placa de Petri estéril. Después cada trozo se debe homogenizar en un dispositivo tipo estomacher o en un mortero estéril con una pequeña cantidad de tampón fosfato salino (PBS), hasta que la muestra de tejido de placenta se disgregue completamente antes de su siembra en los medios de cultivo. La siembra se realizará con un asa de siembra o pipeta estéril, transfiriendo el homogenizado a los medios de cultivo. Las extensiones para la tinción de Gram se realizan directamente de la muestra, del sedimento o del material homogeneizado mediante pipeta o asa de siembra.
- Una vez procesadas las muestras, es conveniente conservarlas refrigeradas durante al menos siete días, por si se necesitara realizar estudios complementarios o confirmar resultados con un nuevo procesamiento.

7.2 CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar sangre, agar chocolate, agar CNA (35-37°C, 5-7% CO₂): 3- 5 días.
- Agar Brucella, agar ASLKV, agar BBE (35-37°C, anaerobiosis): 5-7 días.
- Agar Sabouraud-cloranfenicol (30°C, aerobiosis): 48 horas.
- Agar MacConkey (35-37°C, aerobiosis): 48 horas.
- Caldo tioglicolato (35-37°C, aerobiosis): 5-7 días.

7.3 LECTURA DE CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

7.3.1. Tinción de Gram

- Evaluar la presencia o ausencia de diferentes morfotipos bacterianos, elementos fúngicos y células inflamatorias. Valorar la presencia o no de leucocitos polimorfonucleares y registrar su presencia con esquema no

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta	PNT- IPP- 01	
		Edición N° 01	Página 4 de 5

cuantitativo: como aislados (≤ 1 PMN/campo), escasos (1-10 PMN/campo), moderados (11-25 PMN/campo) y abundantes (>25 PMN/campo).

- Informar los resultados lo antes posible al clínico peticionario y registrarlos en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra. Esto permitirá correlacionar los morfotipos visualizados con los aislados.

7.3.2. Cultivos en medios sólidos

- Examinar las placas y los medios líquidos diariamente para detectar la presencia de crecimiento. La primera lectura de los medios incubados en aerobiosis y atmósfera de CO₂ se hará a las 24 horas de incubación y los medios incubados en anaerobiosis a las 48h.
- Correlacionar los aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram. Si se obtienen cultivos mixtos realizar subcultivos. Una vez obtenido el cultivo puro realizar una identificación presuntiva mediante pruebas rápidas como tinción de Gram, catalasa, oxidasa, coagulasa en porta, etc. (o definitiva mediante espectrometría de masas). Si se considera relevante el hallazgo, proporcionar esta información al clínico responsable de la paciente.
- Identificar todos los microorganismos aislados en los distintos medios de cultivo y realizar las pruebas de sensibilidad a los antibióticos según las normas estandarizadas (EUCAST, CLSI).
- No se recomienda la realización rutinaria de las pruebas de sensibilidad a todos los aislamientos de bacterias anaerobias.
- Si no hay crecimiento reincubar todas las placas y reexaminar diariamente hasta el final del periodo de incubación.

7.3.3. Cultivos en medios líquidos

- Si hay turbidez realizar tinción de Gram y sembrar los medios generales y selectivos adecuados según los microorganismos observados.
- Si no hay crecimiento visible, reincubar hasta el final del periodo de incubación.
- Si la muestra se ha inoculado sólo en caldo de enriquecimiento, realizar al final del periodo de incubación, un subcultivo "de salida" en medios sólidos (agar chocolate y un medio no selectivo para anaerobios) aunque no se haya observado turbidez.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

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

8.1 TINCIÓN DE GRAM

- Se indicarán todos los morfotipos visualizados y la presencia de leucocitos polimorfonucleares, que se pueden informar como aislados, escasos, moderados o abundantes.

8.2 CULTIVOS

- Se valorarán, identificarán e informarán los microorganismos especialmente virulentos e invasivos, como *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* (u otras enterobacterias) o *Listeria monocytogenes*.
- También se identificarán e informarán aquellos microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana como *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus* spp., bacilos gramnegativos anaerobios como *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. y grampositivos anaerobios como *Peptostreptococcus* spp. y *Clostridium* spp.
- Igualmente, se identificarán y considerarán clínicamente significativos otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* spp., *Actinomyces* spp. *Capnocytophaga* spp. o cualquier levadura.
- Se deben valorar e informar los microorganismos pertenecientes a la microbiota de la piel como los estafilococos coagulasa negativa, *Propionibacterium* spp. y de la microbiota vaginal normal como *Lactobacillus* spp, con un comentario sobre su significado clínico en este tipo de infecciones.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico del líquido amniótico y de la placenta	PNT- IPP- 01	
		Edición N° 01	Página 5 de 5

- Si el cultivo es positivo, el informe de resultados incluirá todos los microorganismos aerobios y facultativos aislados y su sensibilidad a los antimicrobianos. También se incluirá la identificación de todos los microorganismos anaerobios aislados aunque en estos, no se informarán resultados de sensibilidad, salvo petición expresa o cuando las condiciones clínicas o microbiológicas lo aconsejen.
- Si el resultado del cultivo es negativo, se emitirá un informe en el que conste “No se aíslan microorganismos” o “Cultivo negativo”.
- Cualquier información sobre los cultivos que pueda tener significado clínico y pueda reconducir la actitud terapéutica, se debe informar con la mayor rapidez posible al clínico responsable del paciente mediante informes provisionales escritos o telefónicos.

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 personal técnico 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 supervisión de la técnica, 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, comunicación telefónica de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes.
- 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.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Al ser muestras de difícil obtención, con riesgos para la mujer, y en muchas ocasiones insustituibles, los criterios de rechazo deben reducirse al máximo.
- En la tinción de Gram, el empleo de fucsina (en lugar de safranina) facilita la visualización de los bacilos gram-negativos anaerobios.
- Una vez sembradas las placas para cultivo de bacterias anaerobias, no demorar la incubación para evitar la pérdida de viabilidad de estas bacterias.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede dar lugar a cultivos negativos.
- La recogida de muestra sin las medidas de asepsia adecuadas puede dar falsos resultados positivos por contaminaciones con microbiota de la piel.
- La demora superior a 3 horas en el transporte de las muestras disminuye la viabilidad de las bacterias anaerobias estrictas y puede dar falsos resultados negativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, Delaney ML, DuBois AM, Allred E, Leviton A. Extremely Low Gestation Age Newborns (ELGAN) Study Investigators. Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *MBio*. 2011; 2: e00280-10.
2. Hecht JL, Onderdonk A, Delaney M, Allred EN, Kliman HJ, Zambrano E, Pflueger MS, Livasy CA, Bhan I, Leviton A, and for the ELGAN study investigators Characterization of chorioamnionitis in 2nd-trimester C-section placentas and correlation with microorganism recovery from subamniotic tissues. *Pediatric Develop Pathol* 2008; 11: 15-22.
3. Onderdonk AB, Delaney ML, DuBois AM, Allred EN, Leviton A; Extremely Low Gestational Age Newborns (ELGAN) Study Investigators. Detection of bacteria in placental tissues obtained from extremely low gestational age neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 198:110.e1-7.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna	PNT-IPP-02	
		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 leche humana para realizar el diagnóstico microbiológico de mastitis durante la lactancia, 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 existían métodos microbiológicos de referencia establecidos para el procesamiento de la leche humana. De hecho, la posibilidad de realizar un diagnóstico microbiológico de las mastitis constituye una novedad para la mayor parte de laboratorios de microbiología clínica humana, pero su implantación progresiva responde a una demanda real. El estudio microbiológico de las mastitis implica una microbiota descubierta recientemente y relativamente compleja. Este PNT se ha elaborado pensando en un laboratorio que reciba diariamente un número relativamente reducido de muestras de leche, en el cual es posible el cultivo de cada una de ellas. El cultivo de la leche es la técnica de elección para el diagnóstico de la infección mamaria durante la lactancia, no sólo porque permite identificar y cuantificar los agentes causales y estudiar su sensibilidad a los antibióticos (que puede ser clave para el éxito del abordaje terapéutico) sino porque también permitirá conocer la epidemiología real de la infección.

El estudio microbiológico de la leche se realiza cuando existe sospecha de mastitis aguda, subaguda o subclínica. Los microorganismos más frecuentemente implicados son *Staphylococcus aureus*, en las mastitis agudas, y *Staphylococcus epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativa, *Rothia* spp., *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Corynebacterium* spp. y *Enterococcus faecalis*, en las subagudas y subclínicas. Más ocasionalmente, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* también pueden causar mastitis agudas.

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/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
2. Bou G (Coordinador). Fernández A, García C, Saéz JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica 37. SEIMC 2010. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
3. De Cueto M. (Coordinadora). De Cueto M, del Pozo JL, Franco F, Marín M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a dispositivos biomédicos. Procedimientos en Microbiología Clínica 52. SEIMC 2015. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia52.pdf>

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

En el apartado 5 del documento científico de este procedimiento y en el Procedimiento en Microbiología Clínica SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de muestras en el laboratorio de microbiología", se indican las directrices principales de la recogida, transporte y conservación de las muestras de leche.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna	PNT-IPP-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

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 apartado 5 del documento científico de este procedimiento y 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. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se indican en el apartado nº 7 correspondiente al procedimiento este PNT.

6. APARATOS Y MATERIAL

Se indican en el apartado nº 7 correspondiente a procedimiento en este PNT.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

El cultivo de leche es la técnica imprescindible y de elección para el diagnóstico de las mastitis, no solo porque ayuda a documentar la infección sino porque es necesario para identificar el microorganismo o microorganismos causales (aspecto importante en los episodios recurrentes y en el conocimiento de la epidemiología de la infección) y su sensibilidad antibiótica (aspecto importante para la selección del tratamiento y para la realización de guías de terapia empírica a partir de datos acumulados).

Hay que tener en cuenta que los microorganismos responsables de mastitis pueden ser algunos de los que se suelen considerar como parte de la microbiota habitual de la piel o de la cavidad oral, 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. MATERIAL

- Placas de medios de cultivo agar sangre (por ejemplo, agar Columbia) y agar chocolate
- Asas de 10 µL
- Estufa (aerobiosis) 35-37°C
- Estufa (con atmósfera enriquecida en CO₂) 35-37°C

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna	PNT-IPP-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

7.3. PROCESAMIENTO

La leche se debe inocular en medios de cultivo sólido para realizar recuentos de bacterias; la muestra se debe homogeneizar previamente mediante agitación, que debe ser suave para evitar la formación de espuma.

Los cultivos se deben incubar a 35-37°C en atmósfera aerobia antes de ser interpretados. La mayoría de bacterias causantes de infección mamaria se suelen poner en evidencia mediante el cultivo a las 18-24 horas de incubación. En casos muy determinados, como bacterias exigentes o si el cultivo es negativo a las 24 horas, es necesario extender el periodo de incubación a las 48 horas.

Se inocularán 10 µL de la leche homogeneizada en cada uno de los medios de cultivo citados anteriormente, ocupando toda la superficie del medio, de modo que pueda realizarse un recuento de colonias.

7.4. LECTURA DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Las placas deben ser examinadas para su valoración después del tiempo adecuado de incubación (este aspecto es importante para leches sembradas durante la tarde o noche).

- Cultivos negativos: en los casos donde no se observe crecimiento a las 48 h el cultivo debe considerarse como negativo. Si tras el periodo de incubación aparecen colonias muy pequeñas, se debe prolongar la incubación otras 24 o 48 horas.
- Cultivos con crecimiento: es importante discriminar entre especies causantes de mastitis (*S. aureus*, *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativa, *Rothia* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Corynebacterium* spp. o *Enterococcus faecalis*) de aquellas especies que pueden formar parte de la microbiota mamaria y que no causan mastitis (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis*, otras bacterias lácticas, *Bifidobacterium* spp., o *Propionibacterium* spp.) y también de aquellas que pueden proceder de la manipulación o lavado de dispositivos empleados para la recogida de la leche (*Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. o levaduras, entre otros) que no se considerarán valorables, aunque siempre deben considerarse en el contexto clínico del paciente.

Cuando el recuento total sea mayor o igual a 1.000 ufc/ml, valorar los posibles morfotipos presentes y realizar el recuento de colonias para cada una de las posibles especies, multiplicando el número de colonias por el factor de dilución empleado. Posteriormente, hay que 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) (consultar los Procedimientos en Microbiología de la SEIMC números 38 y 39). La identificación se realizará por normas estándar (consultar Procedimientos en Microbiología de la SEIMC número 37).

La utilización de técnicas moleculares (PCR universal del gen 16S ARNr y secuenciación) puede ser de utilizar en el caso de microorganismos de difícil crecimiento (ver PNT-DBM-02 del Procedimiento en Microbiología de la SEIMC nº 52).

La espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) reduce significativamente el tiempo en la emisión de los resultados y es recomendable su utilización.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En las muestras de leche se deben valorar como significativos los aislados de microorganismos que en otras muestras biológicas, como la piel, se considerarían como microbiota normal (estafilococos coagulasa negativa, corinebacterias, estreptococos de los grupos *mitis* y *salivarius*, etc). En condiciones fisiológicas, la concentración total de este tipo de bacterias en muestras de leche recogida en las condiciones descritas anteriormente suele oscilar entre 1-3 x 10² ufc/mL, con un límite máximo de, aproximadamente, 6-8 x 10² ufc/ml. Cualquier valor por

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna	PNT-IPP-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

encima de esta concentración puede ser compatible con una mastitis infecciosa. No obstante, el valor suele estar notablemente aumentado en estos casos. La concentración máxima de bacterias que se puede esperar en una muestra de leche con mastitis se sitúa es de $1-3 \times 10^6$ ufc/ml. Por lo que respecta a *S. aureus*, esta especie no es frecuente en leche humana en condiciones fisiológicas (<10%) y puede provocar mastitis a concentraciones mucho más bajas que las de las bacterias citadas anteriormente. Es posible que existan cultivos mixtos (diversas especies de los grupos anteriores) en pacientes con mastitis sin que este hecho indique una contaminación de las muestras.

La información emitida por el laboratorio debe ser exacta y clara, no dando lugar a falsas interpretaciones. Debe contener los elementos necesarios que ayuden al clínico en la interpretación del resultado. En cuanto al cultivo, si no se observa crecimiento o este no es significativo se informará como "Cultivo negativo" o "Crecimiento no significativo". En ocasiones, este tipo de resultados puede deberse al tratamiento antimicrobiano previo a la recogida de las muestras. Si se observa un recuento significativo de un solo microorganismo, se informará del mismo con la identificación de la bacteria y la sensibilidad a los antibióticos apropiados. En los cultivos mixtos en los que se valoren todos los morfotipos presentes en el medio de cultivo, se informará del recuento de cada microorganismo, su identificación y sensibilidad. La presencia de una concentración baja ($<5 \times 10^2$ ufc/mL) de corinebacterias en mujeres con mastitis supurativas que aparecen incluso algunos meses después de finalizar la lactancia puede sugerir la presencia de granulomas generados por estas bacterias. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de bacterias gramnegativas (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp.) y levaduras (*Candida* spp.) suele estar asociada a un protocolo inadecuado de recogida de las muestras (en tales casos, pueden estar presentes en concentraciones muy elevadas, mayor de 1×10^4 ufc/mL) y no se deberían contemplar como agentes causantes de mastitis, aunque, por supuesto, siempre deben considerarse en el contexto clínico del paciente.

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.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el Laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El resultado obtenido depende en gran medida de la calidad de la muestra remitida. Hasta la publicación de este procedimiento, no existían métodos microbiológicos de referencia establecidos para el procesamiento de la leche humana. En consecuencia, no existe un consenso específico de valoración de los recuentos bacterianos en la leche humana, por tanto los resultados deberían ser considerados dentro del contexto clínico de la paciente.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo R, Mediano P, Martín V, Jiménez E, Delgado S, Fernández L, et al. Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Acta Pediatr Esp* 2011; 69:276-281.
2. Contreras GA, Rodríguez JM. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16:339-356.
3. Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* 2008; 8:51.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna	PNT-IPP-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

4. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). Acta Pediatr Esp 2009; 67:77-84.
5. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. Pharmacol Res 2012; 69:1-10.
6. Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. Benef Microbes 2014; 5:169-183.
7. Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD. The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. Breastfeed Med 2009; 4:57-61.
8. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. PLoS One 2011; 6:e21313.
9. Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). Acta Pediatr Esp 2009; 67:125-132.
10. Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. J Ped Gastroenterology Nutr 2009; 49:343-348.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna donada al banco de leche	PNT-IPP-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 4

PNT-IPP-03

Procesamiento microbiológico de la leche materna donada al banco de leche

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 la leche materna donada al banco de leche	PNT-IPP-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 4

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir la metodología empleada para el procesamiento microbiológico de leche materna donada para la realización del diagnóstico microbiológico de la misma en los hospitales que cuenten con bancos de leche, 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

Cuando no hay disponible leche materna de la propia madre, los máximos organismos internacionales dedicados a la salud de la población infantil, como la Organización Mundial de la Salud y la UNICEF, así como las sociedades científicas pediátricas, recomiendan la alimentación con leche humana donada por otras madres para niños muy prematuros o enfermos.

Los beneficios demostrados de alimentar a los recién nacidos con leche materna donada frente a las fórmulas artificiales son a corto plazo su protección frente a la enterocolitis necrosante, la infección nosocomial y una mejor tolerancia digestiva. A largo plazo, presentan un mejor neurodesarrollo y un menor riesgo cardiovascular.

En este sentido, los bancos de leche humana deben asegurar la calidad y la seguridad de la leche donada, es decir, que sea segura desde el punto de vista microbiológico y tóxico, y que preserve al máximo sus propiedades nutricionales y biológicas.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. PATH. Strengthening Human Milk Banking: A Global Implementation Framework. Version 1. Seattle, Washington, USA: Bill & Melinda Gates Foundation Grand Challenges initiative, PATH; 2013.
2. 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/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
3. Bou G (Coordinador). Fernández A, García C, Saéz JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica 37. SEIMC 2010. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

El transporte de la muestra de leche (1 ml) al laboratorio de microbiología se realizará de forma inmediata, tras haberse producido el proceso de pasteurización y enfriamiento de la misma.

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 apartado 5 del documento científico de este procedimiento y en el Procedimiento en Microbiología de la SEIMC 1a: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología". Estos criterios incluyen entre otros:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna donada al banco de leche	PNT-IPP-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 4

- Una correcta identificación de la muestra y de la donante
- 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 personal del banco de leche 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. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Se indican en el apartado nº 7 correspondiente al procedimiento en este PNT.

6. APARATOS Y MATERIAL

Se indican en el apartado nº 7 correspondiente al procedimiento en este PNT.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

La leche humana donada destinada al consumo de recién nacidos, particularmente en las unidades de cuidados intensivos neonatales, no debe presentar microorganismos en cantidad o calidad capaces de poner en riesgo la salud del neonato. Por esta razón, se lleva a cabo la pasteurización de leche donada en los bancos de leche. Se hace necesaria la realización de controles microbiológicos post-pasteurización para comprobar la calidad y seguridad de la leche donada disponible en los bancos de leche antes de ser utilizada. El cultivo de leche es la técnica imprescindible y de elección para asegurar la seguridad de la misma.

7.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Agar sangre (35-37°C, 5-7% CO₂): 24-48 horas.

Agar MacConkey (35-37°C, aerobiosis): 24-48 horas.

7.3. PROCESAMIENTO

La leche debe ser inoculada en los medios de cultivo correspondientes, siendo previamente homogeneizada mediante agitación suave para evitar la formación de espuma. La siembra debe realizarse con un asa de siembra de 10µl ocupando toda la superficie del medio de cultivo para realizar posteriormente el recuento de bacterias.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considerarán aptos para el consumo aquellos lotes con cultivo estéril o con un crecimiento de < 5 ufc/10µl de microorganismos formadores de esporas como *Bacillus* spp. o de otros contaminantes ambientales inocuos que pueden colonizar los sacaleches.

Todos los lotes que presenten algún crecimiento bacteriano de enterobacterias o de cualquier otro tipo de microorganismo potencialmente patógeno se considerarán como no aptos para el consumo y por lo tanto deberán ser desechados.

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

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento microbiológico de la leche materna donada al banco de leche	PNT-IPP-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 4

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.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Hasta la publicación de este procedimiento, no existe consenso específico de procesamiento microbiológico a nivel nacional entre los bancos de leche, ni criterios de referencia establecidos pre-pasteurización y post-pasteurización para la leche humana donada. Por tanto, y aunque el propósito de la pasteurización es eliminar el 100% de las bacterias patógenas, y la presencia de las mismas en una muestra de leche pasteurizada caracteriza al producto como no apto para el consumo, los resultados y la valoración de los cultivos de la leche humana donada deberían ser considerados dentro del contexto de funcionamiento y los estándares y protocolos propios del banco de leche.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto P, De Nisi G, Ambruzzi AM, Biasini A, et al. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. Italian Association of Human Milk Banks. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2010; 23:1-20.
2. Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de Riscos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Avisa, 2008. Disponible en: www.friocruz.br/redeblh.
3. García-Lara NR, García-Algar O, Pallás-Alonso CR. Human milk banks and breastfeeding. *An Pediatr* 2012; 76:247-249.
4. Hartmann BT, Pang WW, Keil AD, Hartmann PE, Simmer K; Australian Neonatal Clinical Care Unit. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Hum Develop* 2007; 83:667-673.
5. Vázquez S, Alonso C, Medina C, Bustos G, Martínez MV, Pallás CR. Puesta en marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *An Pediatr* 2009; 71:343-348.