

Anexo 22. Cultivo de la leche materna para el diagnóstico microbiológico de las mastitis⁸

1. Recogida, transporte y conservación de las muestras

1.1. Recogida de la muestra

- En los casos en los que se requiera, recoger la muestra antes del inicio del tratamiento antibiótico
- 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, no se debe aplicar ningún tipo de pomada o solución tópica (lanolina, antibióticos, antisépticos, antiinflamatorios, etc.) ni utilizar accesorios (conchas u otros) que provoquen un acumulo de leche en contacto directo con las areolas mamarias y pezones; en caso contrario, lavar dichas partes con agua templada y jabón neutro, y secarlos con una toalla limpia o 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.
- 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 recoger la leche de recipientes intermedios (cucharas, vasos etc.) donde la paciente haya depositado la leche previamente.
- Si los dos pechos están afectados, 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 un mL.

⁸ Adaptado del siguiente manual: Delgado S, García-Garrote F, Padilla B, Rodríguez Gómez JM, Romero B. 54. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio. 2015. Procedimientos en Microbiología Clínica.

1.2. Transporte y conservación de las muestras

- El transporte al laboratorio debe realizarse lo antes posible. Si no pueden ser enviadas en las dos primeras horas tras su recogida, las muestras pueden conservarse en nevera (refrigeración) hasta 24 h. Únicamente se deben congelar cuando el transporte al laboratorio se retrase más de dos 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, si es necesario, confirmaciones de los resultados obtenidos.

2. Procesamiento de las muestras

2.1. Recepción de las muestras

- Las muestras de leche que llegan al laboratorio 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.

2.2. Procesamiento de las muestras

El cultivo de la leche es la técnica de elección para el diagnóstico de la infección mamaria durante la lactancia.

El diagnóstico final debe sustentarse en dos pilares: el cultivo y la sintomatología clínica.

2.2.1. Medios de cultivo e inoculación

La siembra de las muestras se realizará mediante inoculación directa (asa de 10 μ l) 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.

2.2.2. 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 chocolate) 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.

2.2.3. 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 CLSI).

3. 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).