

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



75.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones de heridas crónicas

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Juan Manuel García-Lechuz Moya

Autores

Gloria Martín-Saco
Fátima Galán Sánchez
Saray Mormeneo Bayo
Francisco Javier Candel
Juan Manuel García-Lechuz Moya



ISBN: 978-84-09-39122-6

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:

Martín-Saco G, Galán-Sánchez F, Mormeneo-Bayo S, Candel FJ, García-Lechuz JM. 2022. 75. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de heridas crónicas. García-Lechuz JM (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2022.

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

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

75. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de heridas crónicas.2022

Coordinador:

Juan Manuel García-Lechuz Moya¹

Autores:

Gloria Martín-Saco¹

Fátima Galán Sánchez²

Saray Mormeneo Bayo³

Francisco Javier Candel⁴

Juan Manuel García-Lechuz Moya¹



Servicios de Microbiología. ¹Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza; ²Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz; ³Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Lleida; ⁴Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid.

ÍNDICE

1.	Introducción. Evaluación de la evidencia	5
2.	Consideraciones clínicas: generalidades.....	6
	2.1. Conceptos: contaminación, colonización, colonización crítica, infección.....	6
	2.2. TIME. Conceptos básicos de manejo de las heridas crónicas.....	7
	2.3. Infecciones de úlceras crónicas. Úlceras vasculares (arteriales, venosas, mixtas). Úlceras por presión.....	8
	2.3.1. Definición y epidemiología.....	8
	2.3.2. Patogenia.....	9
	2.3.3. Etiología.....	9
	2.3.4. Diagnóstico microbiológico.....	9
	2.4. Infecciones de quemaduras.....	10
	2.4.1. Definición y epidemiología.....	10
	2.4.2. Patogenia.....	11
	2.4.3. Etiología.....	11
	2.4.4. Diagnóstico microbiológico.....	12
	2.5. Infecciones del pie diabético.....	13
	2.5.1. Definición y clasificación.....	13
	2.5.2. Patogenia.....	13
	2.5.3. Etiología.....	13
	2.5.4. Diagnóstico microbiológico.....	14
3.	Procedimiento diagnóstico de la infección heridas crónicas.....	16
	3.1. Toma de muestras.....	16
	3.2. Transporte y conservación de las muestras.....	21
	3.3. Recepción en el laboratorio de Microbiología. Incidencias.....	22
	3.4. Procesamiento de las muestras.....	22
	3.4.1. Procesamiento.....	22
	3.4.2. Inoculación en medios de cultivo y tinción de Gram.....	23
	3.4.3. Tipos de cultivos y su interpretación.....	24
	3.4.4. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación.....	25
	3.5. Criterios para la interpretación de resultados. Información o expresión de resultados.....	27
	3.6. Técnicas rápidas de diagnóstico.....	31
4.	Bibliografía.....	31

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- PNT-DMHC-01.** Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión
PNT-DMHC-02. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras
PNT-DMHC-03. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético

1. INTRODUCCIÓN. EVALUACIÓN DE LA EVIDENCIA

Los procesos inflamatorios que conllevan a la perpetuación de una lesión de piel y tejidos blandos hasta convertirla en una lesión crónica, están mediados por factores del propio paciente o endógenos y factores externos (presión, bacterias) que facilitan que la invasión o lesión del tejido persista durante un período largo de tiempo. Las heridas crónicas se caracterizan por el declive, atenuación y en algunos casos desaparición de la respuesta vascular local, un cambio en el predominio del infiltrado (de leucocitos a macrófagos) y la presencia de fibroblastos y tejido cicatricial desestructurados.

La presencia de microorganismos en las heridas crónicas favorece la persistencia de la fase inflamatoria de la herida e impide la fase proliferativa que conllevaría a la cicatrización de la misma. Aunque es conocido que no toda presencia de microorganismos en una herida conlleva la infección de la misma, en el caso de las heridas crónicas, como las que se van a tratar en este Procedimiento, ya existe una predisposición a la infección que depende de la persistencia del trastorno subyacente que sufre el paciente, ya sea éste local o sistémico (quemaduras, neuropatía diabética, encamamiento, vasculopatía subyacente) y que dificultan más el diagnóstico de la infección real o la "sobreinfección". Además, en este tipo de heridas crónicas, el diagnóstico clínico es incompleto en cuanto a la presentación de los signos y síntomas clásicos (dolor, eritema, calor, edema y exudado purulento) y los cultivos microbiológicos, por sí solos y sin contexto clínico ni calidad de la muestra obtenida, pueden dar lugar a falsas interpretaciones e inducir a tratamientos innecesarios. Por ello, el diagnóstico microbiológico se reserva para los casos que sean de particular gravedad, donde exista una sospecha de infección fundamentada en la mala respuesta al manejo adecuado de una herida crónica (en tiempo y forma) y para aquellos en los que se retrase la normal cicatrización de la misma o aparezcan cambios muy llamativos en ausencia de signos clínicos o se detecte una alteración en el estado general de un paciente, habitualmente vulnerable (anciano, diabético, inmunodeprimido). Los cultivos de heridas crónicas con fines epidemiológicos sólo están justificados en pacientes ingresados en unidades especiales hospitalarias o residencias, para descartar la presencia de brotes de microorganismos con mecanismos de resistencia antibiótica de importancia epidemiológica (como *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente o enterococo resistente a la vancomicina). Debemos entender que la infección de estas heridas no siempre va a estar en la profundidad del tejido, o en la superficie, y seguro que tampoco en restos necróticos, escaras quemadas o esfacelos del lecho de la herida. Por tanto, la calidad en la toma de muestras, previa evaluación clínica, resulta crucial. Como consecuencia, no se deben realizar cultivos de estas heridas cuando clínicamente no resulte necesario por no existir signos de infección (1,2).

La calidad de la evidencia para determinar las recomendaciones más adecuadas en cuanto a la toma de muestras y el procesamiento de las muestras, está sometida a múltiples variables. Algunas de ellas, más técnicas, se han mantenido en el tiempo como estándares a través de guías de práctica clínica y ensayos clínicos aleatorizados para nuevas terapias, estas son las biopsias o la cuantificación de microorganismos por gramo de tejido por centímetro cuadrado (calidad de la evidencia ALTA). Otras de índole más práctico, tienen una interpretación más controvertida, como el cultivo de la herida recogida con hisopo con medio de transporte mediante técnica en Z (con una calidad de la evidencia BAJA).

En esta actualización utilizaremos la graduación del nivel de la evidencia (NE) de Oxford (3-5) según sean las referencias de tipo: meta-análisis y/o revisiones sistemáticas Cochrane, ensayos clínicos aleatorizados "ECAs" (NE- A, ALTA), estudios de cohortes, casos-controles, guías de práctica clínica, (NE-B, MODERADA), serie de casos clínicos, consenso de profesionales, capítulo de libro, sumario de evidencia, información y/o material de ayuda para pacientes (NE-C, BAJA). Además, el grado de recomendación (GR) para pruebas y procedimientos diagnósticos lo clasificaremos como nivel 1 FUERTE, nivel 2 MEDIO o nivel 3 DÉBIL, según la calidad de la evidencia, la validez interna, disponibilidad y reproducibilidad de las técnicas, así como la valoración de riesgo externo al aceptar la recomendación y sus consecuencias. Dentro de la complejidad de graduar las recomendaciones, deseamos que, en esta actualización, el documento

refleje lo mejor posible y de forma práctica, el día a día de nuestro desempeño en el manejo diagnóstico de las heridas crónicas, y que sirva de orientación y ayuda para el resto de microbiólogos del país.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS: GENERALIDADES

Herida crónica: es una herida que tiene un progreso lento a través de las fases de curación o muestra una curación demorada, interrumpida o detenida debido a factores intrínsecos y extrínsecos que impactan al individuo y a su herida. Una herida crónica que no se cura puede indicar la presencia de una biopelícula, siempre que una evaluación holística haya descartado o corregido patologías subyacentes como isquemia.

Biopelícula: es una comunidad estructurada de microorganismos con diversidad genotípica y fenotípica y capacidad para desarrollar o perpetuar infecciones únicas (infección crónica). Las biopelículas se caracterizan por una tolerancia significativa a los antibióticos y biocidas, permaneciendo además protegidas de la inmunidad del huésped.

Las heridas crónicas están favorecidas por determinados factores predisponentes del huésped, como déficits en la perfusión, daño en las terminaciones nerviosas o en la migración celular, presión extrínseca mantenida sobre la piel en prominencias óseas, o enfermedades metabólicas como la diabetes. Son ejemplo de ello, las úlceras vasculares, las úlceras por presión (o lesiones por presión) o la herida/úlceras del pie diabético. Estas infecciones suelen ser polimicrobianas, con participación de bacterias aerobias y anaerobias (estas últimas en mayor proporción que en las heridas agudas) (6,7).

La infección es un problema común en las heridas crónicas, retrasando su curación y aumentando la morbilidad y mortalidad en los pacientes. Hay controversias importantes en cuanto al concepto de colonización y colonización crítica, en lo referente al papel del biofilm, en el diagnóstico clínico y microbiológico de infección en una herida crónica, e incluso en el papel de los antimicrobianos tópicos o de los antibióticos sistémicos, cuándo usarlos y durante cuánto tiempo.

Los microorganismos que colonizan las heridas provienen del entorno ambiental, de la propia microbiota de la piel y de la microbiota comensal de mucosas (especialmente mucosa oral, gastrointestinal y genitourinaria). Se consideran potencialmente patógenos a los estreptococos beta-hemolíticos, *S. aureus*, *Bacillus anthracis*, *P. aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos como las *Enterobacterales*.

2.1. CONCEPTOS: CONTAMINACIÓN, COLONIZACIÓN, COLONIZACIÓN CRÍTICA, INFECCIÓN

Las condiciones que contribuyen a retrasar la cicatrización de heridas y a aumentar la susceptibilidad a infecciones incluyen diabetes, insuficiencia nutricional, insuficiencia vascular, defectos neurológicos y edad. Muchas veces estos factores se combinan, aumentando el potencial de infección y cicatrización tardía de la herida. La experiencia clínica de los últimos años y el consenso de sociedades científicas y grupos de trabajo en heridas crónicas han establecido, no sin controversias, el *continuum* en la evolución de la infección de las heridas crónicas, delimitando cuatro fases o estadios con características microbiológicas diferenciales (8-10):

- 1) Contaminación: la herida presenta microorganismos en superficie en fase estacionaria, no se multiplican. La herida requiere adoptar únicamente medidas de limpieza.
- 2) Colonización: la herida presenta microorganismos multiplicándose, pero sin presentar ningún problema clínico. La actitud requerida es de limpieza y desbridamiento e irrigaciones con diferentes soluciones para disminuir la carga bacteriana (11).
- 3) Colonización crítica: la herida presenta un desequilibrio con algunos signos de infección localizada y presencia de biopelícula (12,13). Estos casos requieren una limpieza eficaz, desbridamiento completo refrescando los bordes y aplicación de apósitos de cura con agentes antimicrobianos tópicos. Es importante

seguir la evolución en estas fases ya que puede poner en compromiso al paciente. Reconocer la presencia de biopelícula en las heridas crónicas no es fácil, ya que no existe un *gold standard* ni un biomarcador específico que lo cuantifique. Diferenciar el fenotipo planctónico del fenotipo patógeno en la biopelícula de una herida crónica infectada resulta crucial para optimizar el tratamiento. Es importante entender que tanto los métodos de cultivo tradicional como aquellos basados en detección de ADN bacteriano no diferencian entre bacterias que crecen planctónicamente de las que crecen en comunidades dentro de la biopelícula. Esto justificaría la realización de microscopía y cultivo selectivo para su detección. La presencia del biofilm inicia el estancamiento del proceso normal de cicatrización y aumenta el riesgo de que la herida se infecte. Sabemos que en la fase inicial de formación, las bacterias libres en la superficie o planctónicas se adhieren a ésta en pocos minutos, crecen y colonizan a las 2-4 horas formando fuertes agregados de microcolonias, excretando polímeros extracelulares (proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y ADN extracelular) que a las 6-12 horas confieren tolerancia a desinfectantes, antisépticos y antibióticos, permitiendo la maduración de la biopelícula formando múltiples capas y originando signos indirectos de infección a los 2-4 días.

4) **Infección:** se produce una invasión bacteriana de la herida con deterioro tisular franco y aparición de signos locales (dolor, edema, rubor o eritema, calor, exudado purulento, retraso de cicatrización, mal olor) y/o síntomas generales (fiebre, desorientación, alteración de la homeostásis, mal control glucémico...). Si transcurrido un plazo de dos a cuatro semanas persisten estos signos de infección local o una resolución tórpida de la misma y una vez descartada la afectación ósea (osteomielitis), se considera que estamos ante una infección crónica.

Identificar la transición de la colonización crítica a la infección no es siempre evidente y sin embargo es relevante ya que plantea el inicio del tratamiento antibiótico. Las guías de práctica clínica (9,14) recomiendan que, ante un cultivo positivo con más de 100.000 unidades formadoras de colonias (UCF)/gramo (g) de tejido se establezca un tratamiento antibiótico específico y se reevalúe al paciente y a la lesión. Pero no concretan que en el caso de ser necesaria una toma de muestra, cuál sería el lugar idóneo de la herida crónica para tomarla, ni cuál sería el tamaño y profundidad suficiente para considerar dicha muestra representativa.

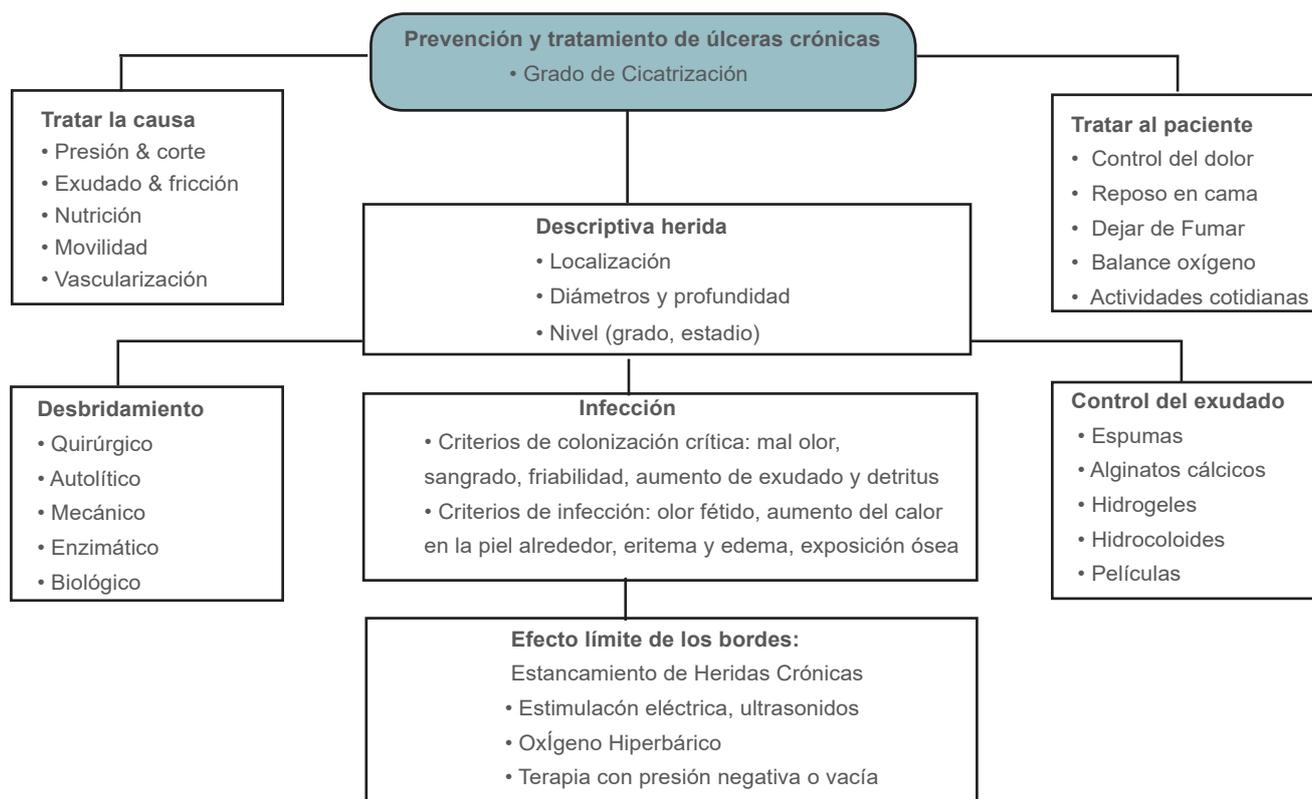
Por otro lado, no existen evidencias que justifiquen la utilización sistemática de antisépticos tópicos en heridas infectadas. Respecto al uso de antibióticos tópicos, un meta-análisis sistemático de Wang et al (15), que incluye 12 ECAs, concluye que la aplicación tópica de gentamicina aumenta significativamente la tasa de eficacia clínica y disminuye la duración de la cicatrización de las heridas en pacientes con infección local de la herida o riesgo infeccioso.

Un retraso o paralización de la cicatrización, asociado a una modificación senso-algésica o cambios en las características de la herida (color, olor, friabilidad, desgranulación), podrían ser signos de alarma para un cambio de actitud, diagnóstica (cultivo) (16) o terapéutica (tratamiento antimicrobiano y/o desbridamiento).

2.2. TIME. CONCEPTOS BÁSICOS DE MANEJOS DE LAS HERIDAS CRÓNICAS

Para un buen manejo de este tipo de heridas tanto en atención primaria como en especializada, se recomienda realizar las curas en ambiente húmedo (CAH) (GR-1) para conseguir las mejores condiciones del lecho, reducir la carga bacteriana, el exudado y el edema y facilitar el proceso de cicatrización (8,17). Los cuatro pilares de la CAH están basados en el protocolo *TIME Tejido-Infección-Moisture (exudado)-Edge* (bordes), capaz de adaptarse a las necesidades de la lesión y a su proceso de cicatrización. Esta estrategia fue descrita por la *European Wound Management Association* (EWMA) como referencia en la sistemática de tratamiento (18). En ella se describe que un buen manejo del tejido de una herida crónica, con buena limpieza y aplicando el tipo de desbridamiento más adecuado (quirúrgico, cortante, autolítico con hidrogeles, hidrocoloides o alginatos, enzimático con colagenasas, biológico con larvas, químico con cadexómeros) puede evitar complicaciones posteriores como la infección. Algunas de estas medidas son capaces de absorber el exudado que presentan estas heridas sometidas a curas húmedas. Del mismo modo, es importante el cuidado de la piel perilesional, protegiendo los bordes de la herida con sustancias-barrera que mantengan el trofismo epitelial para que no se debilite, impidiendo además el sobrecrecimiento bacteriano (19). Todos estos conceptos se resumen en la figura 1.

Figura 1. Preparación de la base de la herida crónica, paradigma del cuidado integral del paciente (Modificado de Sibbald RG, et al; referencia 19)



2.3. INFECCIONES DE ÚLCERAS CRÓNICAS. ÚLCERAS VASCULARES (ARTERIALES, VENOSAS, MIXTAS). ÚLCERAS POR PRESIÓN

2.3.1. Definición y epidemiología

Las **úlceras vasculares** venosas se definen como lesiones con pérdida de sustancia que asientan sobre una piel dañada por una dermatitis secundaria a una hipertensión venosa, la cual constituye la complicación principal de la insuficiencia venosa crónica. Se localizan preferentemente entre la rodilla y el tobillo.

Las úlceras isquémicas son el resultado de una perfusión inadecuada debida a obstrucción arterial, causada por arteriosclerosis que afecta a arterias de mediano calibre o por una variedad de otras enfermedades que afectan a pequeños vasos sanguíneos (vasculitis, escleroderma, etc.) (1,2).

Las úlceras vasculares venosas representan entre el 80-90% del total de las úlceras vasculares. En España, se detectan en el 2,5% de los enfermos de atención primaria y la incidencia aumenta a partir de los 65 años (5,6%). En definitiva, entre 250.000 y 300.000 personas están afectadas por úlceras venosas en España (9).

Se denomina **lesión por presión**, a toda lesión de la piel originada por una presión mantenida, durante un tiempo prolongado, sobre un plano o prominencia ósea. También por la fricción, cizallamiento o combinación de las mismas, causando una isquemia que provoca degeneración de la dermis, la epidermis o el tejido celular subcutáneo, y que puede afectar incluso a músculo y hueso (19). Los factores de riesgo incluyen edad avanzada, daños circulatorios, inmovilización e incontinencia. Se clasifican en varios estadios (NPIAP) que van desde eritema que no desaparece con la presión hasta necrosis de la piel con exposición de músculo y hueso (9,18,20-23). Las lesiones por presión son una complicación habitual en los enfermos hospitalizados y encamados, con estancias prolongadas. Conllevan dolor, infección y aumento de la estancia y del coste hospitalario. La prevalencia en España en 2017 fue del 8,7%. El 27% se localizan en el talón, el 26,7% en el sacro y el 7,8% en los trocánteres. La infección es rara en los estadios I o II (superficiales), pero mucho más frecuente en los estadios III o IV (profundas). Se considera que una lesión por presión

está infectada siempre que no se cure (en 4 a 6 semanas) a pesar de haber eliminado la presión constante. En España, el coste anual de la atención sanitaria a pacientes con lesiones por presión se ha estimado en torno a los 435 millones de euros correspondiendo el 18,9% a atención primaria, el 28% a atención hospitalaria y el 53,1% a la atención socio-sanitaria, dependiendo del estadio en que se encuentre (9,22).

2.3.2. Patogenia.

En las **úlceras venosas**, la hipertensión venosa mantenida produce: i) apertura *shunts* arteriovenosos, con incremento de permeabilidad vascular, ii) extravasación de proteínas de alto peso molecular (barrera que disminuye la oxigenación) y iii) acúmulo de leucocitos con trombosis local de las vénulas. La hipoxia perivascular, asociada a un bajo contenido en nutrientes y factores de crecimiento, provoca un retraso en la regeneración de los tejidos tras perderse la capacidad protectora de la epidermis. La infección de ambos tipos de úlceras arteriales y venosas, se produce tras la pérdida de la integridad de la piel, (por mínima que sea), por las modificaciones inducidas por la hipoxia tisular y por la contaminación desde áreas contiguas altamente colonizadas.

Las **lesiones por presión** se producen a consecuencia del aplastamiento tisular entre dos planos, uno perteneciente al enfermo (hueso) y otro externo a él (sillón, cama, etc.). La presión sobre un área concreta desencadena un proceso isquémico que origina la muerte celular y su necrosis. Es más importante la continuidad en la presión, incluso aunque sea moderada, que su intensidad. Otros factores predisponentes son la edad, la incontinencia (urinaria o fecal), la disminución de la sensibilidad, actividad y/o movilidad, el dolor, la presión arterial baja, el déficit nutricional y las cifras de hemoglobina baja (23).

2.3.3. Etiología.

La etiología de las infecciones de estos tipos de heridas es habitualmente polimicrobiana, siendo *S. aureus* el principal patógeno. Los bacilos gramnegativos anaerobios y aerobios pigmentados (*Chromobacterium violaceum* y *Sphingobacterium* spp.) y no pigmentados representan el 30% de todos los microorganismos que colonizan estas heridas y, cuando hay síntomas de infección, se aíslan en el 41-49% de los casos. Al igual que ocurre en las infecciones agudas de piel y partes blandas, parece que las interacciones entre aerobios y anaerobios son más importantes en la patogenia de la infección que la presencia en sí de determinados microorganismos.

El diagnóstico de infección de una úlcera crónica, vascular o por presión (UPP), se basa únicamente en los signos clásicos (eritema, edema, aumento de la temperatura y dolor). Sin embargo, estos signos suelen existir en ausencia de infección, ya que son lesiones en un estado de inflamación crónica. Es más importante determinar si hay cualquier cambio, por muy sutil que sea, que indique infección (17,18).

2.3.4. Diagnóstico microbiológico. (Ver apartado 3. Procedimiento diagnóstico)

No se deben realizar cultivos rutinarios de las úlceras crónicas sin signos ni sospecha de infección (GR-1). El cultivo de la herida de una úlcera no debería ser el sustituto del juicio clínico de infección (1). Se recomienda obtener la muestra antes de iniciar un tratamiento antibiótico empírico y únicamente de aquellas lesiones que presenten signos clínicos de infección, que se estén deteriorando o que no cicatricen después de un periodo de tiempo largo (superior a 4-6 semanas con manejo adecuado) (GR-1).

El diagnóstico de infección es difícil en algunos casos por la inflamación crónica y un 26% de las muestras son positivas aun sin signos inflamatorios. Los cultivos de este tipo de heridas son difíciles de interpretar, sobre todo cuando son polimicrobianos y/o la muestra no se ha recogido mediante un procedimiento invasivo. La formación de biopelículas en este tipo de muestras debe tenerse en cuenta

La mayoría de los microbiólogos están de acuerdo en qué microorganismos se consideran patógenos en este tipo de cultivos, si bien existe diferencia de opiniones en cuanto a cómo valorar el aislamiento de tres o más de estos patógenos potenciales. La presencia de especies del género *Proteus* que con frecuencia dificultan la lectura de las placas o de varios tipos de bacterias no fermentadoras en cultivos polimicrobianos reflejan una mala calidad en la recogida de la muestra y deben ser rechazadas (GR-2).

El estándar de oro para determinar la infección de una úlcera crónica es el cultivo cuantitativo en la biopsia de tejido, pero muchas heridas se cultivan con hisopo para descartar o confirmar infección (24). No seríamos realistas ni prácticos, si esperáramos que la enfermería de centros sociosanitarios o de atención primaria, utilizara la biopsia o la aspiración con aguja para determinar que una infección de la piel fuera causada por una bacteria resistente como SARM, si estas técnicas no se utilizan de forma rutinaria en pacientes hospitalizados en hospitales universitarios. Pero debemos conocer que, en caso de úlceras en estadios avanzados, las muestras superficiales de hisopos no son válidas para alcanzar un diagnóstico etiológico preciso. Por ello, es crucial delimitar el valor de los aislamientos en cultivo en base a tres pilares fundamentales, siempre teniendo en cuenta la información clínica aportada y antecedentes de cultivos previos:

- Tipo de muestra (hisopo, aspirado jeringa, biopsia de tejido).
- Calidad de la muestra (presencia de células, de leucocitos polimorfonucleares y/o de microbiota colonizadora, mono/polimicrobiana)
- Tipo de cultivo (cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo)

Las muestras de exudados recogidos con hisopo son cada vez más frecuentes, especialmente en centros sociosanitarios (24), a pesar de que es recomendable formar y promocionar la recogida de muestras por punción-aspiración. Por ello, ante la evidencia controvertida sobre el resultado de la toma de muestras con hisopo (técnica de Levine) comparado con la biopsia (25-27) o el aspirado (28), debemos interpretar con precaución los resultados de los cultivos y la visión microscópica tras tinción de Gram.

Se han buscado reglas para diferenciar la colonización crítica (tratamiento tópico) de la infección (tratamiento sistémico) pero no existe acuerdo internacional. En cuanto a los cultivos semicuantitativos y cuantitativos, numerosos estudios han demostrado que recuentos bacterianos superiores a 10^5 UFC/g de tejido (en cultivos semicuantitativos crecimiento en 3º y 4º cuadrante) en una herida son predictores de infección o lo que es lo mismo, ausencia de cicatrización a pesar de una correcta vascularización del injerto (1,8,16,17). Se valoran (identificación y antibiograma) los microorganismos que superen este dintel. La excepción a esta norma son *S. aureus*, *P. aeruginosa* o los estreptococos beta-hemolíticos, que se considerarán siempre con carácter patógeno (se deberá realizar identificación y antibiograma). Los anaerobios que se aislen en recuento significativo se identificarán sólo a nivel de morfotipos bacterianos, como se comentará en el apartado 3 (Procedimiento diagnóstico).

La dificultad que entraña la recogida de muestras de buena calidad para estudio microbiológico es un punto crítico. Debe tomarse de una zona representativa de la infección, en cantidad adecuada y evitando, en lo posible, la contaminación con la microbiota normal mediante un buen lavado de la superficie de la úlcera. En casos de sospecha de osteomielitis subyacente, el diagnóstico se basa en el examen histopatológico (punto clave). El cultivo de varias muestras de biopsia de la zona en cuestión (alta sensibilidad, pero baja especificidad), como en ocasiones sucede con las técnicas de imagen, no siempre aporta garantía suficiente para un diagnóstico de certeza (29).

2.4. INFECCIONES DE QUEMADURAS

2.4.1. Definición y epidemiología

Las quemaduras son lesiones producidas en los tejidos vivos como consecuencia de la acción de agentes térmicos, radiactivos, químicos o eléctricos. Para considerar que una quemadura está infectada se tienen que producir cambios en la apariencia de la quemadura (separación rápida de la escara, áreas de decoloración o edema en el margen de la herida) o que el paciente presente dos de los siguientes síntomas: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$) o hipotermia ($<36^{\circ}\text{C}$), hipotensión, oliguria ($<20\text{ cm}^3/\text{h}$), hiperglucemia o confusión mental. Además, se debe cumplir al menos uno de los siguientes criterios (30):

- Examen histológico de la biopsia donde se observe invasión de microorganismos en el tejido viable adyacente.
- Hemocultivo positivo en ausencia de otro foco de infección.

- Aislamiento de virus herpes, identificación histológica de inclusiones o visualización de partículas víricas en biopsias o raspado de la lesión.

Es importante tener en cuenta que la purulencia por sí sola no es un criterio adecuado para el diagnóstico de infección ya que puede reflejar un cuidado incompleto de la herida, al igual que la fiebre puede ser el resultado del trauma del tejido o de una infección en otro lugar.

La infección es la complicación más frecuente en los grandes quemados constituyendo una de las principales causas de morbimortalidad. El proceso de curación depende de muchos factores, como el grado de quemadura (tipo I a IV), causa, estado general del paciente y comorbilidades asociadas.

Se calcula que en EEUU más de 500.000 personas reciben tratamiento médico por quemaduras, requiriendo hospitalización 40.000 y produciéndose 4000 muertes al año. Todo esto supone un coste anual superior al billón de dólares, sin incluir los costes indirectos de discapacidad y rehabilitación (31). En España cada año se registran más de 6.500 visitas a urgencias debido a lesiones por quemaduras y más de 1.300 ingresos hospitalarios (32).

2.4.2. Patogenia

Las quemaduras se asocian con una liberación masiva de mediadores pro-inflamatorios, produciéndose un aumento en la permeabilidad vascular, con extravasación de líquido hacia el intersticio y aparición de edema. Todo ello contribuye a un estado hipovolémico que genera disminución en la perfusión y aporte de oxígeno a los tejidos (31). El paciente quemado presenta una inmunosupresión generalizada y por lo tanto un mayor riesgo de adquirir infecciones, siendo la neumonía (5,4 % pacientes) y la infección urinaria (3,4 %) las complicaciones infecciosas más habituales (33). La susceptibilidad a la infección es multifactorial y se ve favorecida principalmente por destrucción de la barrera mecánica, una función celular deprimida y translocación bacteriana por daño en la mucosa gastrointestinal. Además, los grandes quemados presentan una alteración de la inmunidad celular y humoral, con alteraciones en la activación y función de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B. La infección de una quemadura se puede manifestar localmente en forma de impétigo, celulitis o alteración del injerto en prendimiento, y en casos de quemaduras de gran espesor originar infecciones sistémicas (34).

2.4.3. Etiología

La infección en el paciente quemado se produce generalmente por bacterias endógenas. La formación de biopelículas adquiere también relevancia en este tipo de heridas. Cuando se produce una quemadura la estructura normal de la piel es reemplazada por una escara húmeda, rica en proteínas y avascular, constituyendo un ambiente ideal para el crecimiento de microorganismos (34-37). Inicialmente la superficie de la quemadura es estéril, pero a las 48 ó 72 horas empieza a colonizarse por bacterias grampositivas que residen en las glándulas sudoríparas y los folículos pilosos. A partir del 5-7 día, la quemadura se empieza a colonizar predominantemente con bacterias gramnegativas. Entre las bacterias grampositivas, *S. aureus* es uno de los principales microorganismos responsable de la infección de una quemadura, mientras que los estafilococos coagulasa negativa, micrococos y corinebacterias constituyen generalmente microbiota colonizadora de la piel y mucosas. El papel de los estreptococos beta-hemolíticos especialmente *Streptococcus pyogenes* seguido de *Streptococcus agalactiae* también es importante, aunque con un manejo más sencillo gracias a su sensibilidad a penicilinas. Dentro de los gramnegativos, destaca *P. aeruginosa*, con gran capacidad de invasión y de pasar fácilmente a través de la escara y producir diseminación sistémica, siendo la principal causa asociada a muerte por sepsis. Esta bacteria procede tanto del ambiente hospitalario como de la translocación gastrointestinal. *Acinetobacter* spp. es el segundo agente más implicado en patogenicidad gracias a su capacidad para habitar superficies tanto húmedas como secas y objetos animados e inanimados. Las enterobacterias también juegan un papel importante, aunque son menos problemáticas que los dos anteriores. Por otro lado, los anaerobios constituyen una causa infrecuente de infección invasiva, siendo *Bacteroides* y *Fusobacterium* los géneros más prevalentes.

La infección fúngica se está convirtiendo en un grave problema, debido al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y a la introducción de antibióticos tópicos. El incremento de los aislamientos de *Candida no albicans* resistentes a fluconazol puede ser causa de candidiasis invasiva. Aunque el aislamiento de *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y zigomycetos (*Rizhopus spp.* y *Mucor spp.*) es infrecuente, tienen mayor potencial patógeno que las levaduras debido a su capacidad de invasión. Finalmente, la infección vírica es infrecuente. La causa más frecuente es la reactivación de infecciones latentes secundarias al estado de inmunosupresión del paciente. Los virus más prevalentes son herpes simplex y varicela-zoster. Estos suelen aparecer en fase de curación o en la quemadura recién cicatrizada y en ocasiones alrededor de los márgenes de los lechos donantes de injertos cutáneos a las 2- 6 semanas.

2.4.4. Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de infección de las quemaduras es complicado y exige una vigilancia clínica diaria (áreas focales de decoloración, aparición de exudado purulento, signos inflamatorios en el margen sano de la herida, separación precoz de la escara, datos clínicos o analíticos de sepsis) (38). Los cultivos de la piel mediante torunda o biopsia pueden originar errores en el muestreo e informar de bacterias colonizadoras, con mala correlación y escasa utilidad clínica (2). La tinción de Gram permite orientar sobre la calidad de la muestra, pero en ausencia de leucocitos y de microorganismos, no sirve de ayuda en la interpretación de los cultivos. El diagnóstico definitivo de infección es fundamentalmente histopatológico con invasión de microorganismos en tejidos viables o vasos sanguíneos, pero la mayor parte de los centros carece de experiencia y de una obtención rápida de los resultados (34-36).

El cultivo microbiológico de utilidad debe ser cuantitativo o semicuantitativo y se debe realizar cuando exista sospecha clínica de infección (GR-1), ya que, en ausencia de la misma, la presencia de microorganismos indicará en la mayoría de los casos colonización de la quemadura con microbiota de la piel (2,16,37). Sin embargo, los cultivos superficiales se realizan de forma habitual en muchas unidades de quemados con el objetivo de detectar los microorganismos que están colonizando la quemadura antes de que se produzca la invasión de la misma y en ocasiones con fines epidemiológicos (2,34).

La Asociación Americana de Quemaduras (*American Burn Association, ABA*) define colonización (32), cuando los microorganismos están presentes en la superficie de la quemadura en bajas concentraciones ($<10^5$ UFC/g de tejido). Se denomina infección, cuando los microorganismos están presentes en la herida y en la escara que la recubre, en altas concentraciones ($\geq 10^5$ UCF/g de tejido) y se considera infección invasiva cuando los patógenos se encuentran en concentraciones suficientes ($\geq 10^5$ UFC/g de tejido), en profundidad y superficie de la misma, para causar separación supurativa de la escara o la pérdida del injerto, invasión del tejido adyacente no quemado o causar sepsis (36).

El cultivo se puede realizar a partir de frotis con hisopo, del aspirado tomado con jeringa o de biopsia (38,39). La biopsia proporciona información tanto cualitativa (identificación de los microorganismos) como cuantitativa (UFC/g de tejido), pero el procedimiento es más invasivo y costoso. Un método intermedio entre la biopsia y los hisopos es la aspiración con aguja, pero tiene los inconvenientes de que la porción muestreada es limitada.

Respecto al frotis con hisopo existen principalmente dos técnicas (39), la técnica de Levine (rotación de un hisopo sobre un área de 1 cm², con presión suficiente para extraer fluido desde dentro del tejido de la herida) y la técnica en zig-zag (desplazamiento con rotación del hisopo por 10 puntos a través de todo el lecho de la herida, sin tocar esfacelo ni los bordes de la lesión). La técnica de Levine, (recuento de 10⁶ bacterias en el exudado correlaciona con 10⁵ UFC/gramo de tejido) tiene mejor rendimiento ya que se extrae muestra tanto de la superficie como de dentro de la herida, además en heridas pequeñas es difícil lograr diez puntos de contacto. Los estudios que comparan la toma de muestra mediante hisopo, aspirado y biopsia son escasos, con pocos pacientes y con heridas de diferentes etiologías (pie diabético, úlcera por presión, quemadura...) (34,38,39). La correlación entre el hisopo y la biopsia es buena en algunos estudios mientras que en otros no existe correlación ni comparando múltiples muestras (38,39). El hisopo podría ser una alternativa a la biopsia y al aspirado siempre y cuando se realice una buena limpieza y desbridamiento de la zona para que la carga bacteriana superficial se corresponda con la existente en tejidos profundos. Se

recomienda el cultivo cuantitativo del material exprimido del hisopo, realizando una estría con asa calibrada y siembra en toda la placa de forma similar a un urocultivo (38).

En el caso de que la quemadura no mejore a pesar de tratamiento antibiótico y adecuado desbridamiento, se aconseja recurrir a la extracción de varias biopsias con cultivos cuantitativos de las mismas junto al estudio histológico para alcanzar un diagnóstico de infección más preciso (34,38). En caso de infección sistémica está indicado obtener urocultivo y hemocultivos (36,38).

2.5. INFECCIONES DEL PIE DIABÉTICO

2.5.1. Definición y clasificación

La diabetes mellitus es un problema sanitario de primer orden que afecta a 400 millones de personas en todo el mundo, aproximadamente el 9% de la población adulta. La Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vasculare define el pie diabético como una alteración clínica, de base etiopatogénica y/o neuropática, e inducida por la hiperglucemia mantenida, en la que con o sin coexistencia de isquemia, y tras un desencadenamiento traumático, produce lesión y/o ulceración del pie (40). Datos de prevalencia de la Federación Internacional de Diabetes estiman que entre 9,1 y 26,1 millones de personas con diabetes desarrollan úlceras del pie diabético en todo el mundo cada año, de los que el 50-60% progresará a infección del pie diabético (IPD). Las infecciones del pie que afectan a la piel y tejidos blandos, y al hueso, con o sin repercusión sistémica, son la causa más frecuente de hospitalización de los diabéticos (25%), produciendo con estancias prolongadas (41).

El clínico, ante una úlcera de pie diabético, debe siempre valorar la presencia de infección y si está presente, clasificar la gravedad de dicha infección (42). Se han propuesto muchos sistemas de clasificación para las úlceras de pie diabético. Debido a que todas las úlceras están colonizadas con patógenos potenciales, la infección se diagnostica con la presencia de al menos dos signos o síntomas de inflamación (rubor, calor, induración, dolor/sensibilidad) o presencia de secreción purulenta, aunque desafortunadamente, estos signos pueden estar disminuidos por la neuropatía o la isquemia, y los hallazgos sistémicos (por ejemplo, dolor, fiebre, leucocitosis) están a menudo ausentes en infecciones leves y moderadas. El diagnóstico de osteomielitis subyacente requiere pruebas de imagen compatibles. Las infecciones deben ser clasificadas utilizando los sistemas de clasificación de la IDSA/IWGDF (43), como leve (grado 2, superficial con celulitis mínima), moderada (grado 3, profunda o de mayor extensión) o severa (grado 4, acompañada de signos sistémicos de sepsis), así como si hay presencia o no de osteomielitis (si la osteomielitis se demuestra en ausencia de dos o más signos de inflamación, se clasifica el pie como grado 3 (O) o grado 4 (O), según el número de criterios de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que se cumplan).

2.5.2. Patogenia

Dentro de la fisiopatología de la úlcera del pie diabético concurren una serie de factores predisponentes, como son la neuropatía asociada en mayor o menor grado a la macro y microangiopatía y unos factores precipitantes o desencadenantes, el más frecuente de ellos es el traumatismo mecánico, que desencadena una úlcera o necrosis. Del mismo modo existen una serie de factores agravantes que determinan el pronóstico de la extremidad, que son la infección, que provocará daño tisular extenso, la isquemia, que retrasará la cicatrización, y la neuropatía, que evitará el reconocimiento tanto de la lesión como del factor precipitante. La infección no suele ser la causa de la úlcera, pero va a determinar en gran manera el pronóstico y el tratamiento de cualquier lesión del pie, sobre todo si se asocia a isquemia.

2.5.3. Etiología

La microbiología de la infección del pie diabético varía según la localización geográfica, la gravedad de la enfermedad y las características del paciente (antibióticos previos, hospitalización reciente) (41-44). En pacientes con estadios iniciales de infección superficial, los cocos grampositivos aerobios son los organismos predominantes, de los cuales *S. aureus* y los estreptococos beta-hemolíticos son los más frecuentemente aislados, especialmente en los países occidentales. En la India, el porcentaje de aislamientos de alguna especie de enterobacterias y *P. aeruginosa* iguala o incluso supera al de *S. aureus*. Las heridas crónicamente

infectadas que presentan estos pacientes, con necrosis extensa, gangrena o sometidas al uso prolongado de antibióticos, tienen etiología mixta, pudiendo aislarse simultáneamente en el cultivo, cocos grampositivos, bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores y anaerobios. A veces son infecciones monomicrobianas, pero en la mayoría de casos son polimicrobianas. La complejidad en la valoración de estos pacientes se incrementa con el aislamiento de la microbiota hospitalaria asociada a los múltiples ingresos, la duración clínica de la úlcera, la profundidad/gravedad de la lesión y los tratamientos antimicrobianos previos. Los microorganismos anaerobios pueden aislarse principalmente en heridas profundas o más crónicas, y son más fácilmente identificados usando secuenciación de la región del ADN_r16S (45). La información sobre el papel de los hongos en la patogénesis de la infección del pie diabético (IPD) es limitada, ya que la colonización por hongos es difícil de diferenciar de la infección. En las osteomielitis, un importante número de muestras tomadas por biopsia o aspiración son estériles, y en las que se obtiene crecimiento bacteriano se suelen encontrar pocas especies bacterianas, con frecuencia solamente una. Los microorganismos aislados son similares a los encontrados en las úlceras crónicas.

Nuevos datos derivados de herramientas moleculares y secuenciación masiva (metagenómica) sugieren que las heridas crónicas contienen múltiples microorganismos diferentes que coexisten como combinaciones de comunidades altamente estructuradas, destacando el papel de la cooperación bacteriana entre bacterias comensales y patógenas en la evolución de las heridas (46,47). Las biopelículas son frecuentes en las infecciones crónicas de las úlceras, en las que están incluidas numerosas bacterias. La utilización de estas técnicas de secuenciación en estudios longitudinales está permitiendo evaluar la dinámica temporal de la composición microbiana en relación a la evolución del paciente, y su complementación con técnicas de metatranscriptómica permitirá conocer la implicación funcional de cada microorganismo durante el proceso infeccioso. Algunos de estos estudios sobre la microbiota del pie diabético han demostrado que determinadas agrupaciones de microorganismos se asocian con características clínicas específicas, incluyendo la profundidad de la úlcera (marcador subrogado de gravedad) o su duración (46).

En los últimos años se ha venido documentando un incremento de la resistencia bacteriana, especialmente en *S. aureus*. En un reciente estudio observacional prospectivo realizado en España por García-Zafra et al. (48), en el que se incluyeron 167 pacientes consecutivos con infecciones del pie del diabético, *S. aureus* fue el microorganismo más aislado (n= 82; 37,9 %) seguido por *Escherichia coli* (n= 40; 18,5%). El 57,3% de *S. aureus* fueron resistentes a metilicina (SARM) y el 70% de *Klebsiella pneumoniae* y el 25% de *E. coli* eran productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Los factores de riesgo independientes de las infecciones por SARM fueron las úlceras profundas, el uso previo de fluoroquinolonas y la vasculopatía periférica, mientras que para las infecciones por enterobacterias productoras de BLEE lo fueron la osteomielitis y el uso previo de cefalosporinas.

2.5.4. Diagnóstico microbiológico. (Ver apartado 3. Procedimiento diagnóstico)

El diagnóstico microbiológico sólo está indicado cuando hay criterios de infección clínica. La recogida de una muestra adecuada es determinante para que el diagnóstico microbiológico sea útil. La toma de los tejidos debe evitar el material superficial, que puede reflejar tan solo la microbiota colonizadora. Por ello es útil, tras realizar un desbridamiento quirúrgico, proceder a una limpieza con una gasa empapada con suero fisiológico. Opcionalmente tras el desbridamiento se puede hacer una desinfección con un desinfectante que se elimina después con suero fisiológico. Las opciones disponibles son la biopsia o el raspado del fondo de la úlcera, la aspiración con jeringa de las colecciones purulentas y la recogida con torunda, aunque esta última opción solo debe usarse si la toma es profunda, ya que si es superficial no ayuda a distinguir entre patógenos y contaminantes, ni a recuperar anaerobios. En una persona con diabetes y sospecha de osteomielitis en el pie, en la que es necesario realizar un diagnóstico definitivo o determinar un agente patógeno causante para seleccionar el tratamiento, se debe recoger una muestra ósea para el cultivo de microorganismos clínicamente relevantes, así como para un estudio histopatológico. La evidencia disponible sugiere que la toma de muestra ósea de manera aséptica, bien de forma percutánea o en el acto quirúrgico, pero no a través de la úlcera, es la forma más segura y proporciona la evaluación más precisa de los verdaderos patógenos. Si la infección es grave, con manifestaciones sistémicas, se deben extraer y procesar hemocultivos (49-51). En la tabla 1, se recogen los principales aspectos sobre la adecuada toma de muestras.

Aunque algunos autores (52-54) han relacionado la presencia de un gran número de bacterias en el cultivo ($>10^5$ UFC por gramo de tejido) con la presencia de infección, pero es necesario indicar que la realización de cultivos cuantitativos es bastante compleja y no se recomienda su realización rutinaria para el diagnóstico de la infección del pie diabético. En estas infecciones, por la complejidad del ecosistema microbiano, con participación de aerobios y anaerobios, existe una mal correlación entre la tinción de Gram y los resultados del cultivo en el caso de biopsias de tejidos profundos (abscesos, fascitis), aunque esta tinción puede permitir la valoración de la calidad de la muestra por la presencia de leucocitos polimorfonucleares y ser útil en caso de observar bacilos gramnegativos, lo que puede ser muy apreciado por los clínicos (54).

Tabla 1. Recomendaciones generales para la toma de muestras del pie diabético (*Modificada de Lipsky BA, et al; referencia 51*)

Qué hay que hacer:

- Obtener una muestra apropiada solamente si hay criterios de infección clínica
- Limpiar con suero fisiológico y desbridar la herida antes de obtener la muestra
- Obtener una muestra de tejido mediante raspado o biopsia del fondo de la úlcera tras desbridarla
- Aspirar cualquier colección purulenta con jeringa y aguja estériles
- Enviar rápidamente las muestras en contenedores estériles adecuados, evitando la desecación, y a ser posible en un medio de transporte que permita la recuperación de anaerobios

Qué no hay que hacer:

- Cultivar material procedente de lesiones sin criterios de infección, salvo con fines epidemiológicos
- Obtener una muestra para cultivo sin limpiar ni desbridar previamente la herida
- Obtener una muestra para cultivo mediante toma superficial con torunda

En general, existe una buena correlación entre los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva y los métodos de cultivo convencionales respecto a los patógenos clínicamente más relevantes, aunque las técnicas de metagenómica presentan una resolución muy superior a la del cultivo. Sin embargo, es difícil saber cuáles de los muchos géneros identificados por métodos moleculares contribuyen al estado clínico de infección o requieren terapia antibiótica dirigida. Se ha propuesto la detección, mediante PCR, de marcadores genéticos de factores de virulencia o producción de toxinas como ayuda diagnóstica o pronóstica, aunque los estudios (53,55) hasta ahora solamente han incluido infecciones monomicrobianas por *S. aureus*, y se desconoce si esta práctica proporcionará beneficios clínicos adicionales. Aunque aún no hay evidencia suficiente (47), es posible que las nuevas técnicas moleculares multiplex a tiempo real, que proporcionan la identificación de patógenos y de determinantes de resistencia (47), puedan ofrecer resultados rápidos que permitan ajustar precozmente la terapia, sobre todo en infecciones graves, pero hay que considerar también que pueden detectar un mayor número de especies bacterianas que el cultivo, y podrían conducir innecesariamente a la administración de antibioterapia de mayor espectro. Por lo tanto, por ahora los clínicos deben continuar solicitando un cultivo convencional de las muestras para determinar la identidad de los microorganismos causantes y su sensibilidad a los antibióticos, y los laboratorios de Microbiología no deben utilizar técnicas de microbiología molecular (en lugar de cultivo convencional) como primera línea para la identificación de patógenos (GR-2). Debido al problema de la multiresistencia en los microorganismos más frecuentemente implicados en la infección del pie diabético, sería aconsejable, especialmente en pacientes ingresados y si la epidemiología local lo justifica, utilizar técnicas rápidas para la detección de determinantes de resistencia (técnicas colorimétricas, inmunocromatográficas o moleculares)

en aislados de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, lo que permitiría informar de estos resultados antes de la lectura del antibiograma completo (45,53).

3. PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE HERIDAS CRÓNICAS

3.1. TOMA DE MUESTRAS

El cultivo de la herida no debería ser el sustituto del juicio clínico de infección. Se recomienda obtener la muestra antes de iniciar un tratamiento antibiótico empírico y únicamente en aquellas lesiones que presenten signos clínicos de infección, que se estén deteriorando o que no cicatricen después de un periodo de tiempo largo (1-2, 56-59).

La toma de muestras debe precederse de la limpieza y desinfección del área de la toma. En biopsias y heridas cerradas, se recomienda desinfectar la piel con clorhexidina al 2% o etanol de 70°, seguidamente pintar con povidona yodada al 10%, dejar secar y eliminar el yodo con etanol antes de tomar la muestra. En heridas abiertas, se recomienda eliminar el material necrótico y los tejidos desvitalizados, lavando a chorro con suero salino estéril antes de tomar la muestra. Se recomienda tomar muestra de tejido viable infectado y no de restos superficiales.

El método considerado estándar de oro de la toma de muestras es la biopsia de tejido (NE-A, GR-1). Esto se logra mediante el uso de una técnica aséptica para obtener una muestra de tejido, generalmente mediante biopsia por punción (trocar, *punch* 3 mm) o con bisturí. A pesar de su precisión para determinar la infección, la biopsia de tejido para cultivo no se realiza comúnmente porque es un procedimiento invasivo, requiere un conjunto de habilidades específicas, es difícil de ejecutar en el entorno de atención primaria y es doloroso y costoso. Aunque la muestra de biopsia de tejido o la obtenida por aspiración con aguja fina (PAAF) son las mejores desde el punto de vista microbiológico, ya que permiten realizar estudios cuantitativos, la dificultad técnica en su realización o metodológica en su procesamiento hacen que sean poco reproducibles sin el material y la formación adecuados (NE-A, GR-1). Esta técnica se mantiene como de elección para estudios comparativos de otras técnicas diagnósticas, ensayos clínicos y estudios de investigación de distintas terapias (59,60).

Para muestras de tejidos obtenidos mediante curetaje o biopsia, se recomienda obtener suficiente muestra, evitando las zonas necróticas, bien sea mediante punción-aspiración con aguja fina o con cualquier dispositivo al efecto (por ejemplo, biopsia con sacabocados también llamada *punch*), o mediante procedimiento quirúrgico abierto. En algunos casos se recomienda recoger más de una muestra, de diferentes zonas de la herida, porque una única muestra puede no reflejar todos los microorganismos productores de la infección.

Las biopsias se deben fraccionar en dos mitades, una se enviará para estudios microbiológicos y la otra para estudio histológico. Las biopsias se transportarán en contenedores estériles con unas gotas de suero salino estéril para prevenir la desecación (2,56). Si se demora el transporte, se debe evitar envolver las biopsias en gasas secas. Los aspirados percutáneos se enviarán en la propia jeringa a la que se le habrá quitado la aguja y se habrá tapado con el obturador o inoculados en medios semisólidos para anaerobios.

De forma general, en este tipo de heridas crónicas, basándose en revisiones sistemáticas previas, no se recomendaba tomar muestras mediante torunda o hisopo (10,25,62,63) (NE-1, GR-2). En estudios comparativos entre cultivos mediante PAAF y muestras superficiales tomadas con hisopo de heridas crónicas infectadas, el porcentaje de concordancia alcanza hasta el 80% de casos, atribuyéndose a la PAAF mayor porcentaje de falsos negativos (28,61). A pesar de ser un método sencillo, barato, no invasivo que puede sustituir a los anteriores para la mayoría de las heridas crónicas abiertas, se ha cuestionado debido a que la microbiología de la superficie de la herida puede no reflejar exactamente lo que ocurre en profundidad, y que pueden aislarse microorganismos de la microbiota comensal del individuo e incluso microorganismos

patógenos que no participan en la infección. Sin embargo, dado que la mayoría de las heridas están colonizadas con microorganismos de origen endógeno, cualquier microorganismo presente en la profundidad de la herida es muy probable que también esté en la superficie. Además, la toma con hisopo puede realizarse ambulatoriamente y en centro-sociosanitarios (24), estas muestras permiten cultivos semicuantitativos más fáciles de realizar que los estudios cuantitativos y se ha demostrado que existe correlación entre cultivos semicuantitativos de torundas y los cultivos cuantitativos de biopsias, aunque el porcentaje de concordancia entre ambos métodos puede variar desde un 77 a un 96% en los mejores casos (26,61,64,65).

La técnica de Levine, es el método considerado por muchos autores (denostado por otros) para realizar la toma de muestra con hisopo (11,63-66) (NE-2, GR-2). Consiste en muestrear presionando sobre un área de aproximadamente 1 cm² de tejido celular subcutáneo del interior de la base de la lesión hasta conseguir que fluya líquido de dentro hacia fuera empapando el hisopo. No se debe frotar para evitar el sangrado. Actualmente este es el método más recomendado según trabajos comparativos cuantitativos con cultivos de biopsias y con otros métodos de hisopado (como la técnica de Essen o la técnica en Z) (64,65-68).

En el caso de heridas muy secas, se recomienda impregnar la torunda con suero salino estéril antes de realizar la toma. Se recomienda que las torundas sean floccadas y de alginato (no algodón) y enviarlas al laboratorio en medio de transporte específico (medio de Stuart Amies/medio de transporte para anaerobios). Existe cierta controversia acerca de la utilidad de la toma de muestras con torunda para el aislamiento de anaerobios. En esos casos, es preciso y necesario que la muestra se envíe en un sistema de transporte adecuado. Los sistemas Swab EZII de BD Diagnostic Systems o ES-wabs de Copan Diagnostic son los mejores para aislamiento de aerobios y anaerobios usando una sola muestra (69), y tienen demostrada capacidad para recuperar la viabilidad de microorganismos como SAMR y enterococos resistentes a vancomicina hasta 14 días después de su recogida (70).

Si la muestra se recoge con hisopo, siempre que sea posible, se deben utilizar dos hisopos para tomar la misma muestra; una se empleará para inocular los medios de cultivo y la otra para realizar la extensión para tinción de Gram. En caso de utilizar una sola torunda se inocularán primero los medios de cultivo y en último lugar se realizará la extensión para la tinción de Gram (56).

Consideraciones generales en la toma de muestras:

1. Preferentemente realizar la **toma sin antibiótico** (sistémico o tópico) al menos una semana previa a la toma, si la situación clínica lo permite.
2. Si el paciente tuviese más de una lesión **se tomará una sólo muestra por cada una de las úlceras** y se especificará en el volante la localización de cada una de las tomas.
3. En el volante además de los datos identificativos del paciente se recogerán los siguientes **datos clínicos**:
 - Localización de la lesión
 - Procedencia de residencia o centro socio-sanitario
 - Incontinencia urinaria o fecal
 - Diabetes/Pie diabético
 - Inmunosupresión
 - Tratamiento antibiótico previo (dosis, duración)
 - Otras patologías de base

4. La toma de muestras de las úlceras cutáneas crónicas en los centros de atención primaria y especializada se puede realizar por los siguientes métodos:

A. Biopsia percutánea de tejido: recomendable especialmente para muestras de tejido óseo en infección del pie diabético (GR-1) aunque también puede realizarse del fondo de una úlcera sin osteomielitis asociada. Realizable de forma ambulatoria, mediante aguja fina, trocar o punch (bajo anestesia local) en campo estéril (29,71). Ver Figura 2.

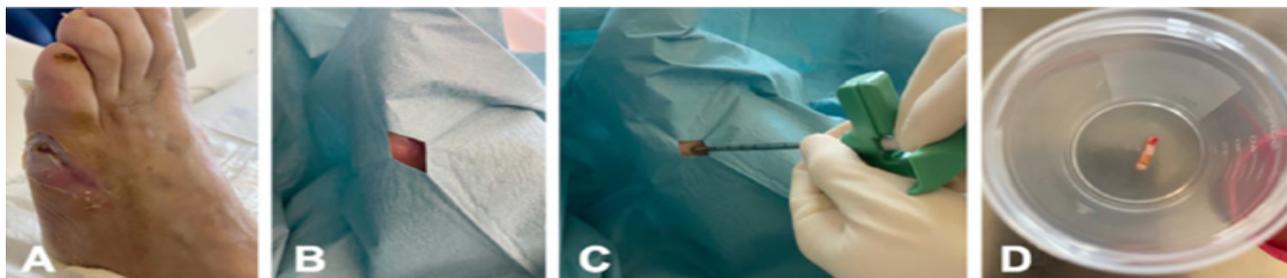


Figura 2. Biopsia percutánea en pie diabético. A. Osteomielitis del 5º metatarsiano. B. Campo quirúrgico preparado. C. Biopsia ósea practicada con aguja fina (PAAF). D. Cilindro óseo listo para enviar al *laboratorio* (Modificado de Goldberg S, et al; referencia 72)

B. Punción-aspiración percutánea de exudado: muy recomendable por su relativa sencillez, valores cuantitativos y evita contaminaciones (NE-2 GR-1).

Material necesario:

- Clorhexidina 2% o povidona yodada al 10%
- Gasas y guantes estériles
- Jeringa y aguja estériles IM (0,8 x 0,4).
- Solución salina estéril al 0.9%
- Vial de transporte tipo frascos Portagerm™
- Obturador/tapón para jeringa (figura 3)



Figura 3. Tapón de jeringa

Descripción de la técnica: (figuras 4-7)

- Informar al paciente de la técnica a realizar
- La punción se realiza a través de la piel perilesional, seleccionando el lado de la lesión con mayor presencia de tejido de granulación o ausencia de esfacelos y necrosis.
- Retirar el apósito y limpiar cuidadosamente la lesión con solución salina al 0,9%.
- Después desinfectar de forma concéntrica la piel perilesional y la zona de la punción con clorhexidina o povidona. Dejar secar 30 segundos (si se utiliza povidona yodada el tiempo de espera será de 1-2 minutos)
- Previo a la aspiración valorar la posibilidad de anestésico tópico tipo lidocaína según grado de dolor.
- Realizar una punción-aspiración con la jeringa y aguja, sobre piel íntegra manteniendo una inclinación aproximada de 45º, aproximándose a la pared de la lesión. El volumen óptimo es de 1 a 5 ml de aspirado.



Figura 4. Limpieza de la herida y bordes con povidona Figura 5. Técnica punción-aspiración (45°)

- En procesos no supurados o sin exudado, preparar la jeringa con 0,5-1 ml de suero fisiológico estéril, inyectándolo y aspirándolo nuevamente con la jeringa. Se debe anotar la cantidad de líquido añadido para realizar el recuento posterior a la hora del cultivo.



Figura 6. Diferentes momentos de la técnica de punción-aspiración con jeringa con suero estéril.

- Si se dispone de medio de transporte semisólido (tipo Portagerm™) para anaerobios, inocular el líquido aspirado, tras sacar el aire de la jeringa, finalizando con aspiración inversa para evitar que entre aire de la jeringa al vial.



Figura 7. Inoculación en medio de transporte semisólido (tipo Portagerm™)

- Si no se dispone de medio semisólido, lo mejor es quitar la aguja y tapar jeringa con el obturador (figura 8).



Figura 8. Jeringa con tapón lista para enviar al laboratorio

- Etiquetar el vial o la jeringa (nunca con aguja) y enviar a laboratorio. Mantener a temperatura ambiente y preservar los viales de la luz con papel de plata para evitar la degradación del medio.

- Entregar en el laboratorio lo antes posible (recomendable período inferior a 2 horas). Si se demora la entrega al laboratorio, refrigerar (2-8°C) un máximo de 24 h.

C. Recogida de la muestra mediante hisopo: cuando no sea posible la recogida de muestra por otro método.

Las muestras así recogidas han sido tradicionalmente de escasa rentabilidad no sólo por tener escaso contenido y deficiente recuperación de microorganismos anaerobios sino porque además sin una adecuada técnica se detectaban sólo bacterias colonizadoras de la superficie, teniendo un dudoso valor diagnóstico (10,25,62,63). En las últimas dos décadas, han surgido varios trabajos comparativos poniendo en valor los resultados de los cultivos de muestras de hisopo respecto a la biopsia o el aspirado, resaltando la mejor correlación de la técnica de Levine.

Se describe a continuación la técnica de Levine, la técnica en Z o zig-zag y la técnica rotacional de Essen.

Material necesario:

- Suero fisiológico.
- Jeringa 20 cm³ y aguja estéril 0,9 mm.
- Gasas y guantes estériles.
- Torundas de alginato flocadas (no usar torundas de algodón ni hisopos secos) con medio de transporte tipo Stuart/Amies (figura 9).



Figura 9. Hisopo con medio de transporte

Descripción de las técnicas: (17,67)

- Retirar el apósito que recubre la lesión.
- Si fuera preciso, proceder a realizar desbridamiento cortante de la lesión.
- Limpiar de forma meticulosa la herida con suero fisiológico estéril antes de proceder a la toma de la muestra utilizando jeringa y aguja (hacer presión suficiente en la irrigación (figura 10). Las presiones efectivas oscilan entre 1 y 4 kg/cm² y se pueden conseguir con una jeringa de 20 ml y con una aguja de 0,9 × 25 mm, lo cual proporciona la fuerza suficiente para eliminar tejido desvitalizado, bacterias y otros restos sin dañar los tejidos).
- Al limpiar la lesión, no frotar la úlcera con fuerza.
- Rechazar el pus, material necrótico o tejido desvitalizado.



Figura 10. Lavado de la herida a presión con jeringa

a) Técnica de Essen o rotacional (figura 11 a)

- Utilizar el hisopo con el medio de transporte. No utilizar torundas de algodón.
- Recorrer con el hisopo los extremos de la herida en sentido de las agujas del reloj, de forma centrípeta, desde fuera hacia el centro, circularmente, aplicando una ligera presión, intentando abarcar la mayor área posible de la herida.
- Colocar el hisopo en el medio de transporte cortando el mango que sobresale del tubo.

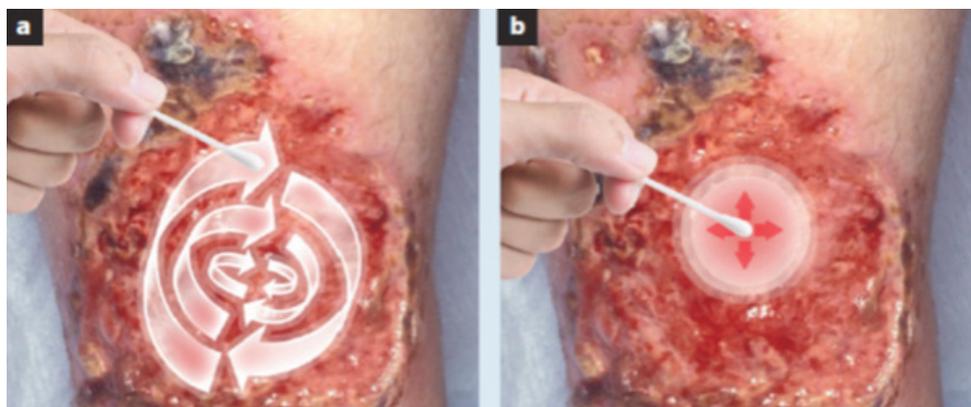


Figura 11. a) Técnica rotacional de Essen; b) Técnica de Levine

b) Técnica de Levine (figura 11 b)

Aplicar girando el hisopo una presión suficiente sobre un área de 1 cm² de la región de la herida con signos de infección (excluyendo los bordes o la piel perilesional), para que se produzca un flujo de líquido o exudado desde el interior de la herida.

c) Técnica en Z o zig-zag o de los 10 puntos (figura 12)

- Girar el hisopo sobre los dedos de la persona que toma la muestra realizando movimientos rotatorios de izquierda a derecha y de derecha a izquierda, abarcando en sentido descendente diez puntos distintos en los bordes de la herida, pero sin tocarlos, seleccionando las zonas donde los puntos de infección sean más visibles y evitando las zonas con tejido necrótico.

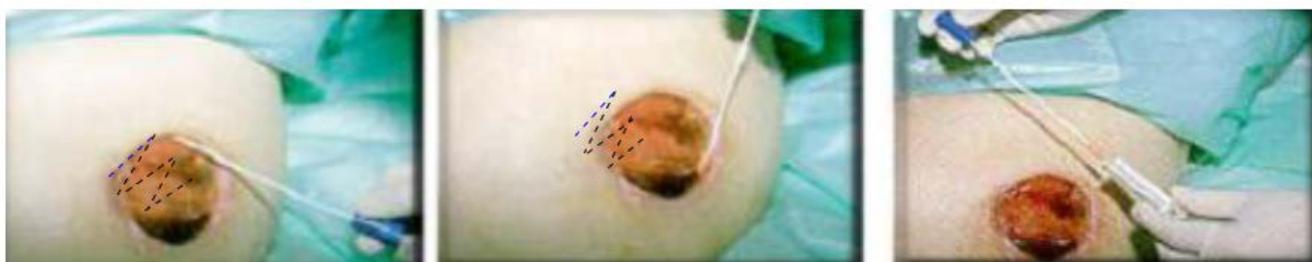


Figura 12. Técnica en Z

En todas las técnicas se puede humedecer previamente el hisopo con agua estéril o solución salina al 0,9% y se recomienda utilizar dos hisopos, uno para realizar la tinción de Gram (medio Stuart/Amies) y otro para cultivo (medio Stuart/Amies o Portagerm™).

3.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Conservar las muestras a temperatura ambiente (no es imprescindible refrigerar) y protegidas de la luz. Se deben entregar en el laboratorio lo antes posible. Para muestras que no se procesen en 2 horas, se aconseja refrigerarlas (2-8°C) sobre todo si se van a realizar estudios de biología molecular.

3.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras recogidas para estudios microbiológicos deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio de Microbiología, preferiblemente en las dos horas posteriores a la toma. Las muestras se podrán transportar a temperatura ambiente y en caso de no poder ser procesadas inmediatamente se pueden mantener refrigeradas (2-8°C) un máximo de 24 h hasta su procesamiento, aunque ello suponga perder viabilidad de los microorganismos anaerobios. Las jeringas con la aguja insertada no deben aceptarse por el riesgo biológico que suponen (56, 57).

En la sección de preanalítica del laboratorio se recepcionarán las muestras, asignándoles un código de entrada y verificando sus datos demográficos y la concordancia entre la muestra y las determinaciones solicitadas. Cualquier incidencia deberá ser registrada, siendo las más frecuentes:

- Identificación incorrecta: no se aceptará una muestra sin identificar, mal identificada o en la que no coincidan el número de petición con la de la muestra.
- Muestras derramadas: no se aceptarán muestras claramente derramadas y se procederá como en el caso anterior solicitando una nueva muestra.
 - Transporte/conservación inadecuados: si no se cumplen los requisitos para el transporte de muestras en el contenedor adecuado y en las condiciones necesarias, se solicitará una nueva muestra. No son válidas las muestras enviadas con formalina o formol.
- Tipo de muestra no adecuada para el estudio solicitado: si la muestra remitida no es adecuada para el estudio solicitado, no se aceptará y se informará al servicio solicitante de la inadecuación de la misma, aclarando el tipo de muestra que se requiere.

Criterios de rechazo:

- Las discrepancias entre la identificación de la muestra y la identificación en el volante de petición serán motivo de rechazo, aunque se debe consultar previamente con el clínico responsable de la solicitud.
- Se rechazarán las muestras remitidas en formol o conservantes similares.
- Se recomienda rechazar torundas sin medio de transporte cuando haya transcurrido más de 1 hora desde el momento de la toma.
- Si la muestra es insuficiente para todas las determinaciones solicitadas, se contactará con el clínico para decidir cuáles son más importantes y, para las restantes, se indicará en el volante: muestra insuficiente.

3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.4.1. Procesamiento

El trabajo con muestras biológicas y agentes biocontaminantes requiere, como norma general, la manipulación y procesamiento de las muestras dentro de dispositivos de seguridad biológica de tipo II (NE-B, GR-1), con lo que se minimiza el riesgo de contaminación tanto del manipulador como de la muestra.

Las muestras de tejido de gran tamaño o en casos de sospecha de infección fúngica invasiva (muy infrecuente en este tipo de heridas), con el fin de no alterar sus estructuras, no se deben triturar, se debe fraccionar la muestra con bisturí y realizar una impronta con el borde de la muestra recién cortado en los medios de cultivo, empezando por la placa de cultivo de anaerobios y terminando por la extensión sobre porta para la tinción de Gram (figura 13).

Las muestras de biopsias de tejido, por regla general, se deben procesar previamente al cultivo mediante una homogeneización controlada (71,72), bien de forma manual utilizando sistemas de morteros manuales, semi-automatizada (homogenizadores de bolas como que incluyen 5 ml de solución salina que permite conservar la muestra durante el transporte, y contiene 10 bolas de acero estériles para homogeneizar la muestra en un ultra-agitador (figura 14) o bien por medio de sistemas tipo Stomacher o Masticator, molinos trituradores automatizados.

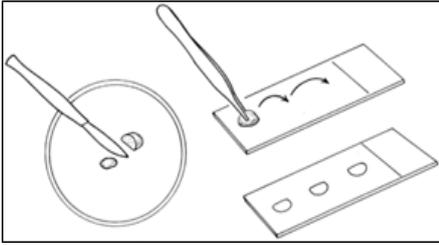


Figura 13. Procesamiento de biopsias

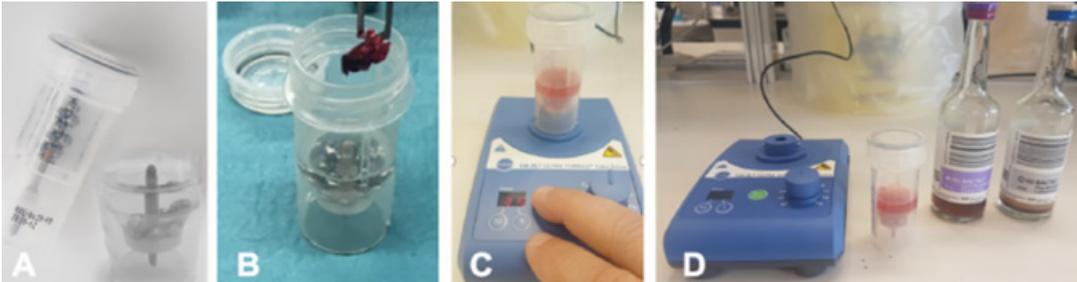


Figura 14. Tipo de procesamiento de muestra de tejido, homogeneización con bolas de acero (*modificado de Sousa R, et al; referencia 71*)

A. Frasco estéril con bolas. B. Introducción de la biopsia. C. Ultra-agitación. D. Homogeneizado listo para inocular en medios líquidos (frascos hemocultivos).

Las muestras muy pequeñas pueden inocularse directamente en el caldo de enriquecimiento. En el caso de fragmentos óseos o de tejido duro pueden inocularse directamente en caldo de enriquecimiento o si hay fragmentos de tejidos blandos se procede a separarlos del tejido duro sometiéndolos a sonicación previa en buffer PBS. La impronta para la extensión sobre porta de este tipo de muestras para conseguir una extensión fina, se realiza del sedimento del producto sonicado previa agitación y centrifugado.

Siempre que las condiciones de trabajo lo permitan se debe conservar una alícuota de la muestra original por si son necesarios estudios complementarios.

Respecto a las muestras recibidas en torundas, que es la opción menos deseable, si solo se recibe una muestra en medio de transporte semisólido, se introduce en 1-2 ml de caldo, se realiza una agitación y se exprime todo el contenido de la torunda. Si el medio de transporte es líquido se procederá a agitar en vórtex antes de la siembra. De ahí con una pipeta estéril se inocularán las placas de cultivo y las extensiones. Alternativamente puede usarse la torunda para inocular directamente las placas, rotándola varias veces en uno de los cuadrantes de la placa.

3.4.2. Inoculación en medios de cultivo y tinción de Gram

Posteriormente, las muestras se inoculan sucesivamente en los medios de cultivo seleccionados comenzando por los medios sólidos (primero los medios para cultivo de anaerobios), seguidamente los medios líquidos (caldos de enriquecimiento tipo tripticasa-soja con 10% sangre cordero, frascos de hemocultivos) y finalmente se procede a la extensión sobre un portaobjetos para la tinción de Gram. En el caso de muestras remitidas con 2 torundas una de ellas se empleará para la inoculación de los medios y la otra para preparar la extensión sobre un portaobjetos para tinción de Gram.

La tinción de Gram se realiza en todas las muestras y se utiliza para la evaluación de los cultivos como un método de despistaje para evaluar la calidad de diferentes tipos de muestras clínicas, incluyendo muestras no invasivas de heridas. La utilidad de esta tinción consiste en que la presencia de polimorfonucleares se considera indicativa de la existencia de inflamación o infección, y la de células epiteliales se considera

indicativa de contaminación superficial de la muestra. Esta tinción también se puede utilizar para decidir cuántos microorganismos se van a valorar en muestras con cultivos polimicrobianos. Si el paciente es inmunodeprimido o tiene insuficiencia vascular periférica, los leucocitos polimorfonucleares pueden estar ausentes en el Gram, dificultando la interpretación de los cultivos. La visualización de microorganismos en la tinción de Gram de muestras obtenidas con torunda se correlaciona con una carga bacteriana en el cultivo de $\geq 10^6$ UFC/g. La presencia de microorganismos en el Gram directo de muestras invasivas (biopsia de tejido) se correlaciona con $\geq 10^5$ UFC/g de tejido.

Tabla 2. Tipo de procesamiento recomendado para cada tipo de herida crónica y tipo de muestra.

Infección	Tipo de muestra	Cultivo cualitativo		Cultivo semicuantitativo		Cultivo cuantitativo	
		Gram	Cultivo	Gram	Cultivo	Gram	Cultivo
Heridas crónicas: UPP, úlceras vasculares	Hisopo	X	X	X	X		
	Bx o PAAF	X	X	X	X	X	X
Quemaduras	Hisopo	X	X	X	X		
	Bx o PAAF					X	X
Pie diabético	Hisopo	X	X				
	Bx o PAAF	X	X				

UPP: úlcera por presión. Bx: biopsia; PAAF: punción aspiración con aguja fina. (Adaptado de Burillo A, et al; referencia 2)

El tipo de procesamiento de la muestra varía en función del tipo de herida que se esté evaluando (2). Cada laboratorio elegirá las técnicas microbiológicas a aplicar en cada muestra en función de sus disponibilidades. Como orientación, se resumen las recomendaciones recogidas en este procedimiento en la tabla 2. Existe una fuerte asociación entre el número de microorganismos en una herida y la capacidad posterior de esa herida para lograr la curación, con una tendencia general hacia el retraso de la cicatrización una vez el crecimiento bacteriano alcanza una concentración de 10^5 UFC/gramo de tejido o superior. Por este motivo, cuantificar los aislamientos significativos en este tipo de heridas es primordial (NE-1, GR-2) aunque no siempre al alcance de todos los laboratorios.

3.4.3. Tipos de cultivos y su interpretación

El cultivo cuantitativo para el procesamiento de muestras potencialmente colonizadas y biopsias de tejido, se describe a continuación (2, 56):

- Pesar el envase que contiene la muestra en una balanza de precisión.
- Sacar de forma aséptica la muestra e introducirla en 5 ml de suero salino estéril. Equivale a una dilución 1:5.
- Pesar de nuevo el envase vacío, se resta este peso del primero y así se obtiene el peso de la muestra.
- Homogeneizar la muestra durante 30 segundos.
- Inocular 0,1 ml del homogeneizado (dilución 1/10) en los medios de cultivo. La extensión para la tinción de Gram se prepara a partir del homogeneizado: se extienden 0,01 ml (equivalente a un asa calibrada de 10 μ L) sobre un área del portaobjetos de 1 cm de lado.
- Realizar 3 diluciones seriadas del homogeneizado (0,5 ml en 4,5 ml de suero salino estéril). Así se obtienen tres diluciones, 1/100, 1/1.000 y 1/10.000.
- Igualmente como alternativa, se puede obtener una dilución 1/1000 sembrando con asa calibrada de 10

μL a partir de la dilución 1/100; y se puede obtener una dilución 1/10.000 sembrando con asa calibrada de 1 μL a partir de la dilución 1/100.

- Sembrar con pipeta estéril 0,1 ml de cada una de las diluciones en medios de agar chocolate y MacConkey. Rotular cada placa con su dilución, como 1/100, 1/1.000 ó 1/10.000.
- Se pueden hacer cultivos cuantitativos para anaerobios, pero los resultados son peores porque las diluciones seriadas dificultan su crecimiento.

El recuento cuantitativo se obtiene a partir de la placa de recuento en la que se observe un crecimiento de entre 30 y 300 colonias de, al menos, un único morfotipo. Para realizar el recuento bacteriano, hay que observar en qué dilución de las sembradas se corresponde con un crecimiento de colonias entre 30 y 300. Hay que multiplicar el número de colonias en la placa x 5, factor de dilución del homogeneizado original, y por la dilución de la placa (10, 100, 1.000, 10.000) y dividirlo por el peso de la biopsia.

La microbiología cuantitativa, sin embargo, es cara, compleja, consume mucho tiempo y rara vez se utiliza en el manejo de la mayoría de las heridas crónicas. Como se ha comentado previamente, muchos autores y guías de práctica clínica (58,63-65) aconsejan realizar muestreo con hisopo mediante la técnica de Levine, utilizando técnicas de cultivo semicuantitativas o cualitativas.

Los **cultivos semicuantitativos** con hisopo parten de liberar microorganismos de la torunda, introduciéndola en 1-2 ml de caldo, sometiéndola a agitación con vórtex y diluyendo el contenido exprimido en 1 ml de diluyente (Ringer o suero estéril) (56). El fluido resultante se diluye en serie, se siembra con pipeta estéril y se incuba, generalmente en condiciones aeróbicas. Los cultivos de hisopos semicuantitativos se inoculan en un medio sólido y se siembran en cuatro cuadrantes (figura 15). Para ello, se realiza una descarga en el primer cuadrante y se siembra este cuadrante 1, y cambiando de asa y realizando estrías desde la zona final de siembra del cuadrante uno al cuadrante dos, del dos al tercer cuadrante y del tercero al cuarto cuadrante. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) se cuentan en cada cuadrante, y los resultados se informan como 1+ a 4+ según el número de cuadrantes con crecimiento bacteriano. En caso de cultivos semicuantitativos de quemaduras, se realiza una estría de descarga a lo largo del diámetro de la placa de agar chocolate y posteriormente se extiende perpendicularmente con un asa de 0,01 ml (10 μL) sobre toda la superficie de la placa (figura 15). La realización de cultivos semicuantitativos expresa una buena correlación con la concentración de bacterias en la muestra. El crecimiento en el primer cuadrante equivale a 10^3 UFC/ml, en el segundo cuadrante entre 10^3 y 10^4 UFC/ml, en el tercero entre 10^4 y 10^5 y en el cuarto a más de 10^5 UFC/ml respectivamente.

Los **cultivos cualitativos** se realizan en muestras de gran calidad (biopsias y aspirados) y se realiza el cultivo sembrando directamente la muestra sobre el borde de la placa estriando en cuatro cuadrantes (aunque no se informe la semicuantificación). En muestras de hisopo de buena calidad, como tomas de pie diabético (valoradas previamente con tinción de Gram) también se puede sembrar el hisopo sobre la placa, aunque es menos recomendable (NE-2, GR-3) siempre que previamente se haya recibido otro hisopo distinto para la tinción de Gram. En estos casos se identificarán hasta 3 microorganismos potencialmente patógenos, mientras que en muestras invasivas (biopsias y tejidos), cuando se procesan de manera cualitativa, y siempre que la toma se haya realizado de manera correcta sin contaminación superficial, se informan todos los morfotipos observados en la tinción de Gram y se valoran (identificación y antibiograma) todos los microorganismos aislados.

3.4.4. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

La frecuencia de aislamiento de microbiota polimicrobiana en este tipo de muestras y la posibilidad de aislar microorganismos de difícil crecimiento hace necesaria una buena elección de los medios de cultivo y como norma general se recomienda (2,55,56) inocular las muestras en:

- Medios sólidos: agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey/agar CNA (optativos), agar Sabouraud, agar para anaerobios (Brucella/Schaedler / agar kanamicina-vancomicina / agar BBE).
- Medios líquidos de enriquecimiento: caldo BHI, caldo TSB o caldo tioglicolato. Este último es el más indicado para el aislamiento de anaerobios. El empleo de caldo de enriquecimiento sólo está indicado en

las muestras invasivas, en las que la carga bacteriana puede ser baja y las características de obtención de la muestra obligan a apurar al máximo las posibilidades diagnósticas. En las muestras no invasivas no parece aportar ventajas y tiene el inconveniente de permitir el crecimiento de los microorganismos contaminantes de ciclo vital más rápido, que no reflejan la situación real de la infección (NE-B; GR-2).

- Las condiciones de incubación son las siguientes:

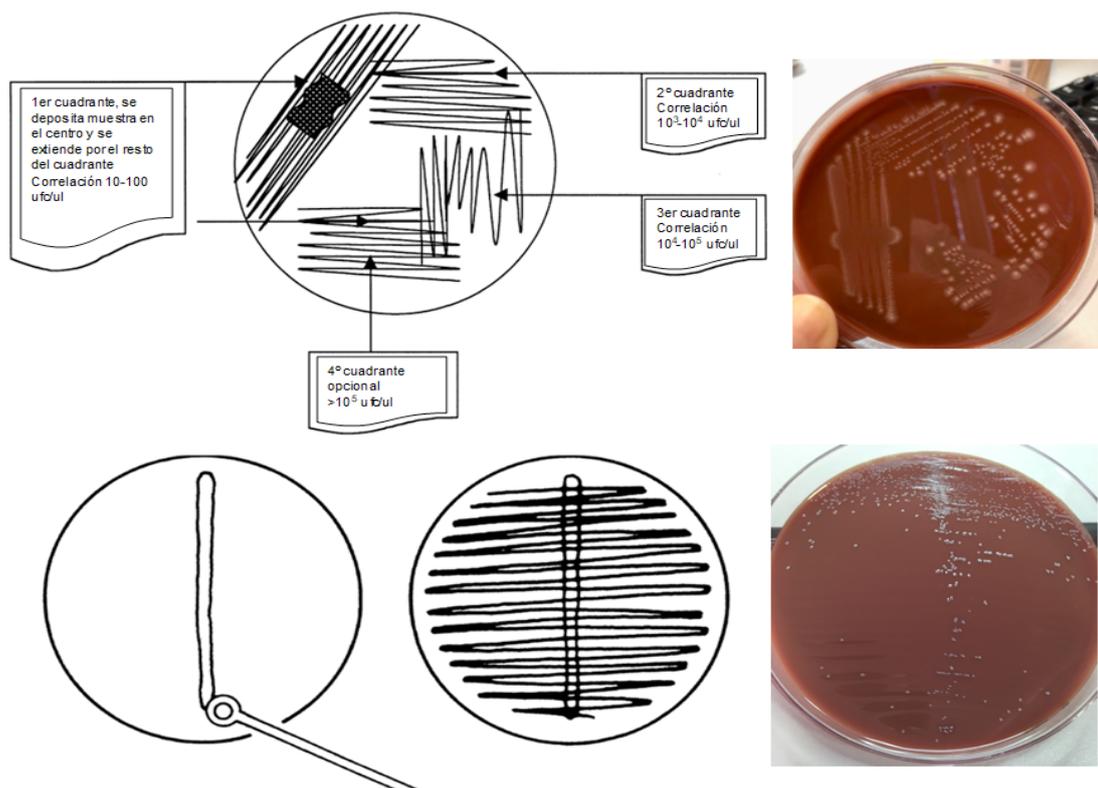
- Agar chocolate, agar sangre, agar CNA: atmósfera húmeda con 5-7% CO₂, 35°C
- Agar MacConkey: atmósfera aerobia, 35°C
- Agar Sabouraud: aerobia, 30°C
- Agar Brucella/ Schaedler/Columbia/agar FAA (medio recomendado por EUCAST): anaerobiosis, 35°C.

Tanto los medios de cultivo sólidos como los medios de cultivo líquidos se leen diariamente, salvo en el caso de los medios incubados en anaerobiosis, cuya primera lectura no puede realizarse hasta pasadas un mínimo de 48 horas de incubación.

En los cultivos semicuantitativos y cuantitativos, el recuento de colonias se realiza a las 48 horas de incubación. Los medios de cultivo para aerobios se incuban 48 horas cuando se trata de muestras no invasivas y al menos 4 días cuando se trata de muestras invasivas (hasta 7 días en el pie diabético). Los medios de cultivo para anaerobios se incuban durante 5 días. Los medios líquidos de enriquecimiento se incuban durante un mínimo de 5 días. Cuando se observa turbidez, se realiza un subcultivo a medios sólidos en las siguientes situaciones:

a) Si en los medios sólidos se aíslan <3 morfotipos bacterianos diferentes, se revisa la tinción de Gram buscando morfotipos que no se hayan visualizado en las placas y, si se observan, entonces se realiza un subcultivo. Los medios para realizar el subcultivo se eligen en función de lo observado en la tinción de Gram; b) si en las placas originales no se observa crecimiento; c) siempre que para el cultivo de la muestra sólo se haya inoculado caldo de enriquecimiento, como en el caso de fragmentos óseos.

Figura 15. Arriba: Cultivo por el método de los 4 cuadrantes en agar chocolate. Abajo: Cultivo semicuantitativo de muestra de quemadura en agar chocolate.



3.5. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS. INFORMACIÓN O EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Debemos considerar la valoración de los cultivos en función de una serie de datos: los aportados por la información clínica, los datos del tipo de muestra y su procesamiento, los resultados de la tinción de Gram y el tipo de cultivo realizado en calidad y cantidad. Desde hace muchas décadas, la tinción de Gram ha sido considerada una herramienta útil para valorar como interpretar el resultado de los cultivos aplicando el índice Q desarrollado por Bartlett en 1974 (73,74). En muestras de heridas crónicas, la tinción de Gram aplicando el índice Q ha sido valorada como herramienta eficaz para no procesar muestras de exudados de escasa calidad (índice Q=0, ver tabla 3) y para evaluar las consecuencias derivadas de su aplicación tanto en la evaluación del ahorro en la carga de trabajo y el gasto del laboratorio como en la prescripción o no de tratamiento antibiótico y la duración del mismo (74). Por tanto, es necesario organizar una sección de preanalítica con personal adiestrado para visualizar la tinción de Gram y un facultativo que valide o anule el procesamiento de la muestra previa información al clínico peticionario. Sin embargo, la observación de cocos grampositivos en racimos o en cadenas, se deben informar lo antes posible. Además, según el resultado de la tinción de Gram, se puede indicar la realización de procedimientos adicionales a la rutina de trabajo (inoculación de la muestra en medios especiales, incubar los medios en determinadas condiciones o prolongar la incubación).

Los resultados de la tinción, especialmente cuando la muestra se considera crítica, se deben informar con rapidez. La observación de microorganismos dentro de los leucocitos es patognomónica de infección por dichos microorganismos. El índice Q se puede aplicar a todo tipo de heridas abiertas, ya que ha demostrado que permite estandarizar y optimizar el procesamiento de muestras de todo tipo de heridas (tabla 3). La presencia de microorganismos en la extensión de Gram de las muestras recogidas para cultivo semicuantitativo o cuantitativo se debe informar, ya que se correlacionan con recuentos bacterianos significativos, como se ha indicado anteriormente.

Tabla 3. Expresión de resultados de la tinción de Gram según el índice Q (*adaptado de Matkoski C, et al; referencia. 73*)

		Células Epiteliales (-)				Q score
		0	-1	-2	-3	
PMNs	0	3	0	0	0	
	1	3	0	0	0	
	2	3	1	0	0	
	3	3	2	1	0	

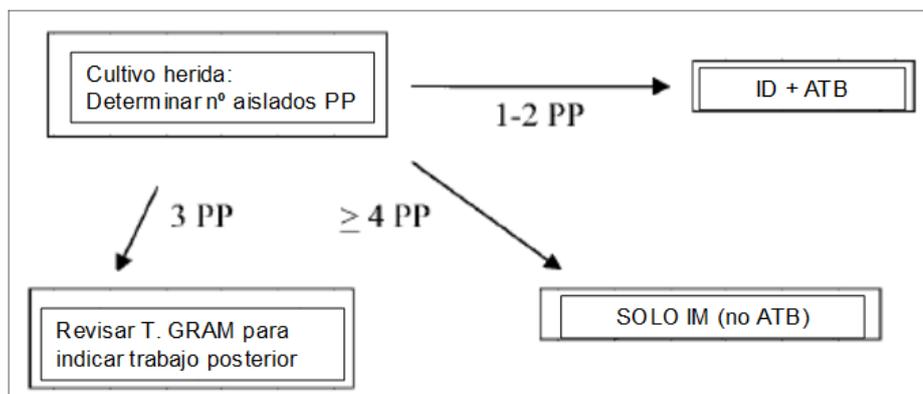
0= no células; 1= 1-9 células/campo 10-20x; 2=10-24 células/campo 10-20x; 3=>24 células/campo 10-20x

Por otro lado, algunos laboratorios han aplicado otros métodos más prácticos, con criterios multicanal o multi-flujo en función del resultado del cultivo y del número de aislamientos del mismo, como el sistema Q234 (73) que no requiere de cambios en los criterios de la tinción de Gram ni una validación facultativa de la muestra, siendo más independiente y estructurado, informando todos los patógenos aislados, bien con identificación definitiva o sólo morfológica. En este sistema, la presencia escasa o no, de más de 3 patógenos potenciales (PP) en cultivo junto con microbiota normal variada, implica sólo realizar identificación morfológica (descriptiva) sin antibiograma. En caso de aislar un solo patógeno potencial o dos, se realiza en ambos casos identificación completa y antibiograma. Si se aíslan en cultivo 3 patógenos potenciales (en recuento moderado o alto; es decir, entre 10 y 20 colonias o más a partir del tercer cuadrante), se revisa la tinción de Gram para ver la mor-

fología predominante y la celularidad y decidir cuál de los aislados se identificará y realizará antibiograma (figura 16).

Figura 16. Sistema Q234: flujo de interpretación y trabajo.

PP: patógeno potencial; IM: identificación morfológica; ID y ATB: identificación y antibiograma (*modificado de Matkoski C, et al; referencia. 73*).



Cada laboratorio en función de sus características, personal y posibilidades, debe adoptar o crear su propio flujo de trabajo con los criterios que se recomiendan, aplicando escalas de mayor o menor complejidad a la hora de evaluar la tinción de Gram y los cultivos (tabla 4). Hay valoraciones de la tinción de Gram (NL: ausencia de leucocitos, L0 aislados leucocitos, L1 escasos leucocitos, L2 moderados leucocitos, AL: abundantes leucocitos), con C1 escasas células epiteliales o C2 abundantes células) aplicables a todo tipo de cultivos (crecimiento escaso, crecimiento moderado 1º y 2º cuadrante, crecimiento abundante 3º y 4º cuadrante), con infinidad de formas de describir el resultado conjunto de ambas valoraciones de una forma práctica y comprensible para el personal técnico que debe desarrollar las tareas posteriores (subcultivos, identificación de género y especie, pruebas de aglutinación, antibiogramas, etc.) (NE-2, GR-1).

Tabla 4. Valoración de la tinción de Gram y crecimiento según técnica de cultivo y tipo de muestra (*modificado de Burillo A, et al; referencia 2*).

TÉCNICA DIAGNÓSTICA	CUALITATIVO		SEMICUANTITATIVO	CUANTITATIVO
Tipo de muestra	No invasiva hisopo	Invasiva Biopsia, PAAF	Exudados de herida crónica hisopo, PAAF	Biopsia tejido, PAAF
Tinción de Gram	1) ML moderados ó AL abundantes PMNs con predominio de uno/dos morfotipos CGP o BGN, valorar cultivo significativo* 2) Si NL no o EL escasos PMNs sin observar morfotipos, valorar cultivo** 3) EL o ML con varios morfotipos, valorar cultivo si <=3 aislados*** si >3 probable contaminación.	Se informan todos los morfotipos	1) ML moderados ó AL abundantes PMNs con predominio de uno/dos morfotipos CGP o BGN, valorar cultivo significativo* Visión mo => 10 ⁵ ufc/g significativo 2) Si NL no o EL escasos PMNs sin observar morfotipos, valorar cultivo** 3) EL o ML con varios morfotipos, valorar cultivo si <=3 aislados*** si >3 probable contaminación.	Visión mo =>10 ⁵ ufc/g significativo
Cultivo aerobio	PP patógenos potenciales: S. aureus, S. pyogenes, S. agalactiae, BGN Pseudomonas, Bacillus anthracis. Contaminantes: difteroides, SCN, neisserias no patógenas, estreptococos alfa hemolíticos y no hemolíticos. ****	Toma correcta sin contaminación superficial ID+ATB de todos los mo aislados	ID+ATB de todos los mo aislados en los cuadrantes 3º y 4º que se correlacionan con cargas bacterianas de => 10 ⁴ ufc/g (3C) y =>10 ⁵ ufc/g (4C) Significativo	Hacer recuento n en placa de un único morfotipo con aislamiento entre 3-300 ufc Cálculo : $n \times 5 \times \frac{10}{100/1000}$ Peso biopsia Significativo de infección si cálculo =>10 ⁵ ufc/g
Cultivo anaerobio	Identificación morfológica de Peptoestreptococcus Clostridium sp. BGN tipo Bacteroides, Prevotella y Fusobacterium	Toma correcta sin contaminación superficial Identificación morfológica de todos los mo aislados	Identificación morfológica de los mo aislados en recuento similar a los aerobios ID+ ATB de especies de Clostridium en recuento significativo	

*Valorar localización, sospecha de infección y aislamientos previos;** Valorar inmunodepresión o antibiótico previo y si cultivo negativo valorar bacterias con deficiencias nutricionales o anaerobias o micobacterias; *** Valorar datos clínicos y especies aisladas, correlacionar con la microbiota local; NL: No leucocitos; EL: escasos leucocitos; ML: moderados leucocitos; AL: abundantes leucocitos; CGP: cocos grampositivos; BGN: bacilos gramnegativos; ID+ATB: identificación y antibiograma; mo: microorganismos; ufc: unidades formadoras de colonias. **** Existen excepciones con enterococos, estreptococos y otros (ver texto).

Cualquier aislamiento que pueda tener significado clínico y pueda reconducir la actitud terapéutica frente al enfermo se debe informar con la mayor rapidez y a ser posible mediante informes provisionales. En muestras de buena calidad, cuando los microorganismos observados en la tinción de Gram concuerdan con los aislados en el cultivo, se valora el aislamiento de hasta 3 patógenos potenciales, a los que se realiza identificación a nivel de género y especie y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. Se valora siempre el crecimiento de microorganismos considerados esencialmente patógenos como *S. aureus*, estreptococos beta-hemolíticos, *P. aeruginosa* y *Bacillus anthracis*. El aislamiento de enterobacterias y de otros bacilos gram-negativos no fermentadores se considera significativo cuando se aísla un número de especies ≤ 3 , y siempre que la muestra sea de buena calidad. Cuando se aíslan en número >3 y la muestra no está bien recogida, se identifican morfológicamente y se informan como microbiota mixta gramnegativa. Tienen valor los aislados de enteropatógenos como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp. aislados rara vez en este tipo de muestras. Entre los microorganismos oxidasa positivos son valorables los aislados de *Aeromonas* spp., *Plesiomonas* spp., *Vibrio* spp. y los pigmentados *Chromobacterium violaceum* y *Sphingobacterium* spp.

Se consideran microbiota habitual los difteroides, estafilococos coagulasa-negativos, especies del género *Neisseria* no patógenas y estreptococos alfa- y no-hemolíticos. No obstante, existen excepciones, tal y como se ha mencionado anteriormente. El aislamiento de estreptococos del grupo *viridans* y de *Enterococcus* spp. se considera significativo cuando se aíslan de muestras invasivas en cultivo puro o claramente predominante y la tinción de Gram sugiere su implicación. La identificación de los anaerobios se hará sólo a nivel de morfotipos bacterianos, según la tinción de Gram, en *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp. y bacilos gramnegativos pigmentados o no, de los géneros *Bacteroides*, *Prevotella* y *Fusobacterium*. Con la excepción de *Clostridium perfringens*, el aislamiento de anaerobios se suele informar como microbiota mixta aerobia/anaerobia y la identificación a nivel de género y especie se reserva para los aerobios. El aislamiento de *Candida* spp. se considera significativo si está en cultivo puro o en muestras invasivas tomadas correctamente de zonas habitualmente estériles.

En casos de cultivos sin aislamientos, se informará con resultado "Cultivo negativo" o "No se aíslan microorganismos", especificando los días (5, 7, 10 o 14) que han estado en incubación. Se procederá del mismo modo con los medios de enriquecimiento. En cultivos con aislamiento de más de tres especies, sin predominio de ninguna, en función de las mismas, el resultado se informará como "Microbiota mixta polimicrobiana aerobia y anaerobia" o "Microbiota mixta gramnegativa" o "Microbiota grampositiva habitual de piel". Es recomendable (NE-3 GR-2) si la muestra se ha recogido en condiciones inadecuadas o es de mala calidad agregar un comentario solicitando nueva muestra e insistiendo en realizar una buena limpieza previa de la zona y si procede realizarla con un método de toma invasivo o semi-invasivo.

En la figura 17 transcribimos otra forma práctica de valorar los cultivos e informar los resultados en función de la visualización del Gram, la calidad de la muestra y la calidad y cantidad de los cultivos, modificado del Manual de Microbiología de la *American Society for Microbiology* (ASM)(56).

Es muy importante mantener un contacto permanente con el clínico peticionario. Para ellos, nuestros resultados son la prueba definitiva de la presencia de infección (56). Hay que recordar que hay infinidad de patologías de base que afectan a los pacientes con heridas crónicas y a veces un resultado negativo no es un fracaso del laboratorio sino un éxito en el diagnóstico diferencial de otros procesos. El laboratorio debe ser estricto en la valoración microbiológica de los aislados (tabla 5) ya que la emisión de un informe con el aislamiento (identificación) y perfil de sensibilidad o antibiograma de uno o más microorganismos, se interpretaría como diagnóstico de infección, provocando una actitud clínica a favor de la administración de tratamiento antimicrobiano de forma innecesaria (74,75).

Este es uno de los retos más difíciles a conseguir a través de la intervención del microbiólogo clínico, el cambio de mentalidad en la prescripción de antibióticos en este tipo de infecciones de heridas crónicas, objetivo integrado dentro de los programas PROA. Pueden ser intervenciones de escaso impacto en la prescripción, pero de un significativo valor para el papel de la enfermería especializada en el cuidado de este tipo de lesiones, donde la higiene en sus diversas etapas (limpieza, desbridamiento, refrescamiento de los márgenes y adecuado uso de apósitos) debe ser el elemento clave (76,77).

Figura 17. Evaluación inicial de los cultivos de herida positivos para microorganismos aerobios (*adaptado de Carson JA, et al; referencia 56*).

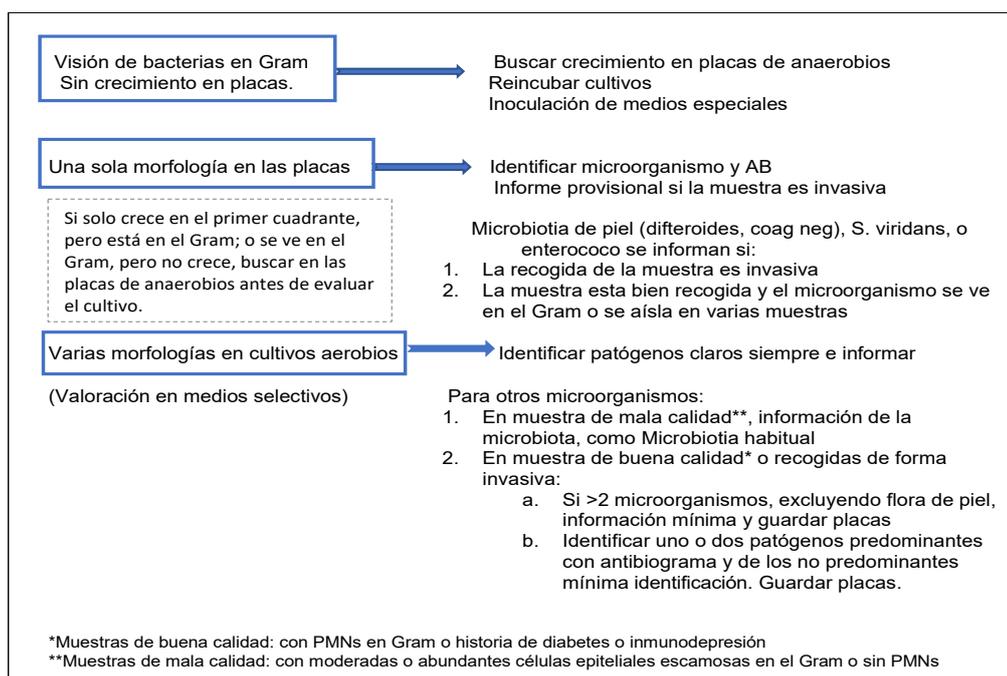


Tabla 5. Información de cultivos mixtos polimicrobianos. Ejemplos de valoración para antibiograma (*adaptada de Bowler PG, et al; referencia 1*).

Datos clínicos y Análisis	Ejemplos de diferentes muestras enviadas con cultivo mixto polimicrobiano			
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4
Signos clínicos de infección	Ninguno	Dolor, inflamación, exudado verdoso	Dolor, fiebre, exudado purulento	Ninguno
Mal olor	1+	-	4+	-
PMNs en T. GRAM	-	2+	3+	1+
Bacterias en T. GRAM	3+ BGN	3+ BGN	3+BGN, BGP	No m.o.
Bacterias en cultivo				
<i>S. aureus</i>	1+	2+	1+	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	3+	-	-
Estreptococos beta-hemolíticos	-	-	-	1+ SBH grupo A
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	-	1+	1+	1+
<i>Clostridium</i> spp.	1+	-	3+	-
Anaerobios GN pigmentados	-	-	3+	-
Anaerobios GN no pigmentados	1+	-	1+	-
Informe microbiológico	Moderado crecimiento de flora mixta aerobia y anaerobia, incluyendo <i>S. aureus</i> . No ATB*	Moderado crecimiento de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> , con su ATB	Crecimiento moderado-abundante de flora mixta aerobia y anaerobia, incluyendo <i>S. aureus</i> *. No ATB. Se aconseja usar antibióticos con cobertura aerobia y anaerobia	Ligero crecimiento de flora mixta aerobia y anaerobia, incluyendo <i>S. pyogenes</i> . No ATB. Signos precoces de infección.

* En caso de *S. aureus*, descartar resistencia a meticilina (por motivos epidemiológicos); BGN: bacilos gramnegativos; BGP: bacilos grampositivos; 1+ crecimiento escaso; 2+ moderado; 3+ abundante; ATB antibiograma; SBH estreptococo beta-hemolítico.

3.6. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

1. La tinción de Gram de muestras invasivas o semi-invasivas y en solicitudes del clínico que así lo hagan constar, es una técnica rápida que se debe realizar e informar lo antes posible y transmite una información preliminar de utilidad.
2. Hay pruebas rápidas de diagnóstico preliminar que orientan sobre el género bacteriano de los aislados en cultivo (catalasa, oxidasa, coagulasa) que luego se puede confirmar mediante identificación definitiva por MALDI-TOF.
3. Se ha demostrado que la presencia de heridas crónicas en residentes en centros sociosanitarios o unidades especiales de hospitalización, especialmente las úlceras por presión (78), son un factor de riesgo absoluto para la presencia de bacterias resistentes a múltiples antibióticos especialmente SAMR. Por ello, en estas muestras, es de interés epidemiológico poder utilizar medios cromogénicos específicos, técnicas inmunocromatográficas, métodos colorimétricos o técnicas rápidas de PCR comerciales automatizadas para la detección de genes de resistencia especialmente para SARM y enterococos resistentes a vancomicina, y para bacilos gramnegativos portadores de carbapenemasas.
4. La aplicación directa sobre muestras de tejido de heridas crónicas, de técnicas de secuenciación del 16S ADN ribosómico, ha producido controvertidos resultados en comparación con el cultivo, debido a la mayor sensibilidad de la PCR. Sin embargo, aplicando criterios cuantitativos a la detección molecular, se puede interpretar que a mayor contenido bacteriano, mayor probabilidad de que la bacteria se aísle en cultivo, y a mayor abundancia de taxones detectados por PCR mayor probabilidad de significación clínica (79). La utilización rutinaria de estas técnicas detecta gran parte de la microbiota de la herida crónica y su papel en la biopelícula y en el retraso del cierre de la misma está lleno de interrogantes por lo cual no se recomienda su uso rutinario (NE-3, GR-3).
5. La aplicación indirecta de biomarcadores, escalas clínicas o directa sobre la herida crónica de otros métodos como los métodos de imagen de la fluorescencia bacteriana (80), para verificar o no la presencia de infección, aunque muy desarrollados y coste-efectivos, requieren de mayor número de ensayos comparativos con las técnicas estándar, para poder realizar una recomendación favorable (77,80) (NE-3, GR-3).

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:244-69.
2. Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. *Procedimientos en Microbiología Clínica SEIMC* 2006. ISBN: 84-611-3539-3.
3. OCEBM Levels of Evidence Working Group. The Oxford Levels of Evidence 2. <http://www.cebm.net/index.aspx>, 2017.
4. Stallard Y. When and how to perform cultures on chronic wounds? *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2018; 45:179-186.
5. Bowers S, Franco E. Chronic wounds: evaluation and management. *Am Fam Physician.* 2020; 101:159-166.
6. Landis SJ. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv Skin Wound Care* 2008; 21:531-540.
7. Leaper D, Assadian O, Edmiston CE. Approach to chronic wound infection. *Br J Dermatol.* 2015; 173:1-8.
8. Swanson T, Angel D, Sussman G, Cooper R, et al. International Wound Infection Institute (IWII) *Las infecciones de las heridas en la práctica clínica.* Wounds International, Londres 2016; 3-30.
9. Guía para la prevención y manejo de las UPP y heridas crónicas. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad 2015. http://gneaupp1fb3.kxcdn.com/wpcontent/uploads/2015/10/Guia_Preencion_UPP.pdf
10. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infections: facts and controversies. *J Clin Dermatol.* 2010; 28:519-526.
11. Assadian O, Kammerlander G, Geyrhofer C, Lunch G, Doppler S, Tuchmann F, et al. Use of wet-to-moist cleansing with different irrigation solutions to reduce bacterial bioburden in chronic wounds. *J Wound Care.* 2018; 27:S10-S16.

12. Percival SL, McCarty SM, Lipsky B. Biofilms and wounds: an overview of the evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015; 4:373-481.
13. Kamaruzzaman NF, Tan LP, Mat Yazid KA, Saeed SI, Hamdan RH, Choong SS, et al. Targeting the bacterial protective armour; challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. *Materials (Basel)*. 2018;11(9):1705.
14. Guía terapéutica antimicrobiana del área de Aljarafe 3ª edición. Manual de obtención de muestras para diagnóstico microbiológico en Atención Primaria. Junio 2016 y úlceras por presión en ancianos institucionalizados Abril 2018. <http://guiaterapeuticaaljarafe.sas.junta-andalucia.es/guiaTerapeuticaAljarafe/guia/viewApartado>
15. Wang P, Long Z, Yu Z, Liu P, Wei D, Fang Q, Ma D, Wang J. The efficacy of topical gentamicin application on prophylaxis and treatment of wound infection: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2019; 73: e13334.
16. Kallstrom G, Doern GV. Are quantitative bacterial wound cultures useful? *J Clin Microbiol*. 2014;52:2753-2756.
17. Dissemmond J, Bülte A, Gerber V, Jäger B, Kröger K. Diagnosis and treatment of chronic wounds: current standards of Germany's initiative for chronic wounds. *J Wound Care*. 2017; 26:727-732.
18. European Pressure Ulcer Advisory Panel, National Pressure Injury Advisory Panel and Pan Pacific Pressure Injury Alliance. Prevención y tratamiento de las lesiones / úlceras por presión. Guía de consulta rápida. (edición en español). Emily Haesler (Ed.). EPUAP/NPIAP/PPPIA:2019.
19. Sibbald, RG, Elliott, JA, Persaud-Jaimangal R, Goodman L, Armstrong DG, Harley C, et al. Wound bed preparation 2021. *Adv. Skin Wound Care*. 2021; 34:183-195.
20. Pressure ulcer prevention. The prevention and management of pressure ulcers in primary and secondary care. Clinical Guideline 179. Londres: National Institute for Health and Care Excellence, 2014 [<http://www.nice.org.uk/guidance/cg179>]
21. Prevención y tratamiento de las úlceras por presión. Servicio de Salud de las Illes Balears 2018. <http://gneaupp-1fb3.kxcdn.com/wpcontent/uploads/2018/05/guiaXbaleares.pdf>.
22. Pancorbo-Hidalgo PL, García-Fernández FP, Pérez-López C, Soldevilla JJ. Prevalencia de lesiones por presión y otras lesiones cutáneas relacionadas con la dependencia en población adulta en hospitales españoles: resultados del 5º Estudio Nacional de 2017. *Gerokomos*. 2019; 30:76-86.
23. Subcomisión de Lesiones por Presión del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Guía de Práctica Clínica: Prevención y Tratamiento de las Lesiones por Presión. Zaragoza 2013. <https://portal.guiasalud.es/wpcontent/uploads/2018/12/GPC527Prev%20y%20trat%20LPAactualizacion2013.pdf>.
24. Drinka P, Bonham P, Crnich CJ. Controversies in long term care. Swab culture of purulent skin infection to detect infection or colonization with antibiotic-resistant bacteria. *J Am Med Dir Assoc*. 2012;13:75-79.
25. Davies CE, Hill KE, Newcombe RG, Stephens P, Wilson MJ, Harding KG, et al. A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. *Wound Rep Reg*. 2007; 15:17-22.
26. Haalboom M, Blokhuis-Arkes MHE, Beuk RJ, Klont R, Guebitz G, Heinzele A, van der Palen J. Wound swab and wound biopsy yield similar culture results. *Wound Rep Reg*. 2018; 26:192-196.
27. Tedeschi S, Negosanti L, Sgarzani R, Trapani F, Pignarelli S, Battilana M, et al. Superficial swab versus deep-tissue biopsy for the microbiological diagnosis of local infection in advanced-stage pressure ulcers of spinal-cord-injured patients: a prospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23:943-947.
28. Muñoz-Algarra MM, Sánchez-Romero I, Segovia T, Bermejo M, Ramos A, Portero F. Surface swab versus fine needle aspiration to diagnose chronic wound infection. Dissenting results? *Gerokomos* 2015; 26:98-103.
29. Chicco M, Singh P, Beitverda Y, Williams G, Hirji H, Rao GG. Diagnosing pelvic osteomyelitis in patients with pressure ulcers: a systematic review comparing bone histology with alternative diagnostic modalities. *J Bone Joint Infect*. 2020; 6:21-32.
30. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Protocol version 5.3. ECDC PPS 2016–2017.
31. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. *J Burn Care Res*. 2017; 38:e469-e481.
32. Informe de lesionados por quemaduras en España (2011-2017). Asociación Española de Quemaduras y Traumatismo Eléctrico (AEQUE) y Área de prevención y seguridad vial de Fundación MAPFRE 2020.
33. Lachiewicz AM, Hauck CG, Weber DJ, Cairns BA, van Duijn D. Bacterial infections after burn injuries: impact of multidrug resistance. *Clin Infect Dis*. 2017; 65:2130-2136.
34. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19:403-434
35. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in burns. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016; 17:250-255.

36. Greenhalgh DG, Saffle JR, Holmes JH 4th, Gamelli RL, Palmieri TL, Horton JW, et al. American Burn Association consensus conference to define sepsis and infection in burns. *J Burn Care Res.* 2007; 28:776-790.
37. Azzopardi EA, Azzopardi E, Camilleri L, Villalpalos J, Joyce DE, Dziewulski P. et al. Gram-negative wound infection in hospitalised adult burn patients--systematic review and metanalysis. *PLoS One.* 2014; 9(4):e95042.
38. Kwei J, Halstead FD, Dretzke J, Oppenheim BA, Moiemmen NS. Protocol for a systematic review of quantitative burn wound microbiology in the management of burns patients. *Syst Rev.* 2015; 4:150.
39. Copeland-Halperin LR, Kaminsky AJ, Bluefeld N, Miraliakbari R. Sample procurement for cultures of infected wounds: a systematic review. *J Wound Care.* 2016; 25(4):S4-S10.
40. Blanes JI, Clará A, Lozano F, Alcalá D, Doiz E, Merino R, et al. Documento de consenso sobre el tratamiento de las infecciones en el pie diabético. *Angiología.* 2012; 64:31-59.
41. Bravo-Molina A, Linares-Palomino JP, Lozano-Alonso S, Asensio-García R, Ros-Die, Hernández-Quero J. Influence of wound scores and microbiology on the outcome of the diabetic foot síndrome. *J Diabetes Complicat.* 2016; 30:329-334.
42. Chastain CA, Klopfenstein N, Serezani CH, Aronoff DM. A clinical review of diabetic foot infections. *Clin Podiatr Med Surg.* 2019; 36:381-395.
43. Monteiro-Soares M, Russell D, Boyko EJ, Jeffcoate W, Mills JL, Morbach S, et al. Guidelines on the classification of diabetic foot ulcers (IWGDF 2019). *Diabetes Metab Res Rev.* 2020; 36(Suppl 1):e3273.
44. Ghotaslou R, Memar MY, Alizadeh N. Classification, microbiology and treatment of diabetic foot infections. *J Wound Care.* 2018; 27:434-441.
45. Travis J, Malone M, Hu H, Baten A, Johani K, Huygens F, Vickery K, Benkendorff K. The microbiome of diabetic foot ulcers: a comparison of swab and tissue biopsy wound sampling techniques using 16s rRNA gene sequencing. *BMC Microbiology.* 2020; 20(1):163.
46. Jnana A, Muthuraman V, Varghese V, Chakrabarti S, Murali TS, Ramachandra L, et al. Microbial community distribution and core microbiome in successive wound grades of individual with diabetic foot ulcers. *Appl Environ Microbiol.* 2020; 86:e02608-19.
47. Schmidt BM, Erb-Downward J, Ranjan P, Dickson R. Metagenomics to identify pathogens in diabetic foot ulcers and the potential impact for clinical care. *Cur Diabetes Rep.* 2021; 21:26-34.
48. García-Zafra V, Hernández-Torres A, García-Vázquez E, Soria-Cogollos T, Canteras-Jordana M, Ruiz-Gómez J, et al. Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales in patients with diabetic foot infections requiring hospital admission. *Rev Esp Quimioter.* 2020; 33:430-435.
49. Nelson A, Wright-Hughes, Backhouse MR, Lipsky BA, Nixon J, Bhogal MS, et al. CODIFI (Concordance in Diabetic Foot Ulcer Infection): a cross-sectional study of wound swab versus tissue sampling in infected diabetic foot ulcers in England. *BMJ Open.* 2018; 8:e019437.
50. Senneville E, Lipsky B, Abbas ZG. Diagnosis of infection in the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2020; 36(Suppl1):e3281.
51. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJ, Armstrong DG, Deery HG, et al. Infectious Diseases Society of America clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis.* 2012; 54:132-173.
52. Mutluoglu M, Uzun G, Turhan V, Gorenek L, Ay H, Lipsky BA. How reliable are cultures of specimens from superficial swabs compared with those of deep tissue in patients with diabetic foot ulcers? *J Diabetes Complications.* 2012; 26:225-229.
53. Saeed K, Esposito S, Akram A, Ascione T, Bal AM, Bassetti M, et al. Hot topics in diabetic foot infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 55(6):105942.
54. Chisman R, Lowry D, Saeed MA, Tiwari A, David MD. Prescribing antibiotics in diabetic foot infection: what is the role of initial microscopy and culture of tissue samples? *Int Wound J.* 2017; 14:685-690.
55. Sotto A, Lina G, Richard JL, Combescure C, Bourg G. Virulence potential of *Staphylococcus aureus* strains isolated from diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2008; 31:2318-2324.
56. Carson JA. Wound cultures (cap 3.13). En: Leber A. ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook* 4th edition. ASM Press, Washington DC 2016, pp. 1-20. doi: 10.1128/9781555818814.ch3.13.1.
57. Sánchez-Romero MI, García-Lechuz JM, González-López JJ, Orta N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enferm infecc Microbiol Clin.* 2019; 37:127-134.
58. Verdú J, López-Casanova P, Sánchez-Romero I, Segovia T. Toma de muestras para el laboratorio de microbiología. Procedimientos y recomendaciones. Serie Documentos Técnicos GNEAUPP IV. Grupo Nacional para el estudio

- y asesoramiento en Úlceras por Presión y Heridas Crónicas. 2ª ed. Logroño 2018.
59. García-Fernández FP, Carrascosa MI, Bellido JC, Rodríguez MC, Casa F, Laguna JM, et al. Procedimiento-Toma de muestras para cultivo en úlceras por presión (Código MDT.19). Evidentia 2005 sept; 2 (supl). En: <http://www.index-f.com/evidentia/2005supl/176articulo.php> [ISSN: 1697-638X].
 60. Trial C, Darbas H, Lavigne JP, Sotto A, Simoneau G, Tillet Y, et al. Assessment of the antimicrobial effectiveness of a new silver alginate wound dressing: a RCT. J Wound Care. 2010; 19:20-26.
 61. Sudharsanan S, Sreenath GS, Sureshkumar S, Vijayakumar C, Sujatha S, Vikram K. Does fine-needle aspiration microbiology offer any benefit over wound swab in detecting the causative organisms in surgical site infections? Wounds. 2017; 29:255-261.
 62. Chakraborti C, Le C, Yanofsky A. Sensitivity of superficial cultures in lower extremity wounds. J Hosp Med. 2010; 5:415-420.
 63. Rondas AA, Halfens R, Schols J, Thiesen K, Trienekens T, Stobberingh E. Is a wound swab for microbiological analysis supportive in the clinical assessment of infection of a chronic wound? Future Microbiol. 2015; 10:1815-1824.
 64. Gardner SE, Frantz RA, Saltzman CL, Hillis SL, Park H, Scherubel M. Diagnostic validity of three swab techniques for identifying chronic wound infection. Wound Rep Reg. 2006; 14:548-557.
 65. Haalboom M, Blokhuis-Arkes MHE, Beuk RJ, Meerwaldt R, Klont R, Schijffelen MJ, et al. Culture results from wound biopsy versus wound swab: does it matter for the assessment of wound infection? Clin Microbiol Infect. 2019; 25:629.e7-629.e12.
 66. De Angel E, Lloyd P, Carville K, Santamaria N. The clinical efficacy of two semi-quantitative wound-swabbing techniques in identifying the causative organism(s) in infected cutaneous wounds. Int Wound J. 2011; 8:176-185.
 67. Al Ghazal P, Korber A, Klode J, Schmid EN, Buer J, Dissemond J. Evaluation of the Essen rotary as a new technique for bacterial swabs: results of a prospective controlled clinical investigation in 50 patients with chronic leg ulcers. Int Wound J. 2014; 11:44-49.
 68. Rondas AA, Schols J, Halfens R, Stobberingh E. Swab versus biopsy for the diagnosis of chronic infected wounds. Adv Skin Wound Care. 2013; 26:211-219.
 69. Van Horn KG, Audette CD, Sebeck D, Tucker KA. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies Agar Swab transport systems for maintenance of microorganism viability. J Clin Microbiol. 2008; 46:1655-1658.
 70. Robinson GL, Harris AD, Morgan DJ, Pineles L, Belton BM, Johnson JK, and the BUGG study group. Survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. for an extended period of transport. J Clin Microbiol. 2012; 50:2466-2468.
 71. Sousa R, Carvalho A, Santos AC, Araújo-Abreu M. Optimal microbiological sampling for the diagnosis of osteoarticular infection. EFFORT Open Rev. 2021; 6:390-398.
 72. Goldberg S. Mechanical physical methods of cell distribution and tissue homogenization. Anton Posch (ed.), Proteomic profiling methods and protocols, Methods in molecular biology, vol. 1295, Springer Media New York 2015.
 73. Matkoski C, Sharp SE, Kiska DL. Evaluation of the Q score and Q234 system for cost-effective and clinically relevant interpretation of wound cultures. J Clin Microbiol. 2006; 44:1869-1872.
 74. Marchand-Sénécal X, Brasg IA, Kozak R, Ellingsen M, Vermeiren C, Corbeil AJ, et al. Impact of rejection of low-quality wound swabs on antimicrobial prescribing: a controlled before-after study. Open Forum Infect Dis. 2021; 8:1-4.
 75. Lipsky BA, Dryden M, Gotttrup F, Nathwani D, Seaton RA, Stryja J. Antimicrobial stewardship in wound care: a position paper from the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and European Wound Management Association. J Antimicrob Chemother. 2016; 71:3026-3035.
 76. Ladhani H, Yowler CJ, Claridge JA. Burn wound colonization, infection, and sepsis. Surg Infect. 2021; 22:44-48.
 77. Murphy C, Atkin L, Swanson T, Tachi M, Tan YK, Vega de Ceniga M, Weir D, Wolcott R. International Consensus Document. Defying hard-to-heal wounds with an early antibiofilm intervention strategy: wound hygiene. J Wound Care. 2020; 29(Suppl 3b):S1-S28.
 78. Rodríguez-Villodres A, Martín-Gandul C, Peñalva G, Guisado-Gil AB, Crespo-Rivas JC, Pachón-Ibañez ME, et al. Prevalence and risk factors for multidrug-resistant organisms colonization in long-term care facilities around the world: a review. Antibiotics. 2021; 10:680-702.
 79. Rhoads DD, Cox SB, Rees EJ, Sun Y, Wolcott RD. Clinical identification of bacteria in human chronic wounds infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. BMC Infect Dis. 2012; 12:321-329.
 80. Raizman R, Durham D, Lindvere-Teene L, Jones LM, Tapang K, Linden R, et al. Use of bacterial fluorescence imaging device: wound measurement, bacterial detection and targeted debridement. J Wound Care. 2019; 28: 824-834.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-DMHC-01

Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	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.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el diagnóstico microbiológico en las infecciones de úlceras crónicas, tanto úlceras vasculares como úlceras por presión. Se detalla el tipo de muestra, su procesamiento en el laboratorio y los criterios de interpretación.

2. FUNDAMENTO

La infección es una complicación frecuente en pacientes con úlceras vasculares y úlceras por presión constituyendo una de las principales causas de morbimortalidad. La susceptibilidad a la infección es multifactorial y se ve favorecida principalmente por la destrucción de la barrera mecánica, una inmunidad celular inmediata deprimida casi desaparecida y por la contaminación y colonización bacteriana frecuente de estas heridas procedente de piel, orina, o heces.

El cultivo microbiológico ha de ser valorado junto con el estado clínico de la úlcera y se debe realizar solamente si existe sospecha clínica de infección, ya que, en ausencia de ésta, la presencia de microorganismos indica colonización en la mayoría de los casos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017
2. Carson JA. Wound cultures, 3.13. En: Leber A. ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook 4th edition. ASM Press, Washington DC 2016, pp. 1-20.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

Toda solicitud microbiológica debería contener los siguientes puntos: información demográfica del paciente (nombre y apellidos, número de historia clínica y de identificación personal, fecha de nacimiento y sexo), nombre y apellidos del médico peticionario, servicio solicitante, datos referentes a la muestra (fecha y hora de la toma, tipo y localización anatómica), tipos de pruebas a solicitar, tratamiento antimicrobiano previo, enfermedad de base, juicio o sospecha clínica, número de petición identificativo de la muestra o localizador de la misma (solicitud electrónica).

4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La recogida de una muestra adecuada es determinante para que el diagnóstico microbiológico sea útil. La toma de los tejidos debe incluir los agentes implicados en la infección y evitar el material superficial que puede reflejar tan solo la colonización por microbiota. Las opciones disponibles son la recogida con torunda o hisopo, la aspiración percutánea y la biopsia.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

4.2.1 Hisopo: antes de la toma de muestra, eliminar el tejido desvitalizado y lavar la superficie de la herida con suero fisiológico. Existen fundamentalmente tres técnicas (ver documento científico):

- Técnica rotacional centrípeta de Essen, sin tocar los bordes de la herida y tras liberar la base de esfacelos.
- Técnica de Levine: consiste en la rotación de un hisopo sobre un área de 1 cm², con presión suficiente para extraer fluido desde dentro del tejido de la herida.
- Técnica en zig-zag: desplazamiento con rotación del hisopo por 10 puntos a través de todo el lecho de la herida, sin tocar esfacelo ni los bordes de la lesión.

La técnica de Levine parece tener mejor rendimiento ya que se extrae muestra tanto de la superficie como del interior de la herida, además en heridas pequeñas es difícil lograr diez puntos de contacto. En heridas grandes se recomienda realizar la técnica de Levine en diferentes áreas. Es importante evitar el sangrado. En el caso de heridas muy secas, se recomienda impregnar la torunda en suero salino estéril antes de la toma.

4.2.2. Aspiración percutánea con aguja fina: se puede utilizar en casos de celulitis, tejido muy necrosado en la base e incluso si el tejido subyacente incluido hueso está friable, licuado. Se recomienda aspirar de zonas profundas. En procesos no supurados instilar 0,5 ml de suero fisiológico estéril, inyectándolo y aspirándolo nuevamente con la jeringa. Quitar la aguja y taponar la jeringa con el obturador. Requiere desinfección de la piel y limpieza con suero fisiológico antes de realizarse.

4.2.3. Biopsia: biopsia con sacabocados (Punch): se realiza utilizando un bisturí de forma circular. El instrumento se rota sobre la piel, penetrando todas las capas (epidermis, dermis y parte de la hipodermis) y se obtiene una muestra tisular cilíndrica.

4.2.4. Otras muestras. En enfermos con infección grave o repercusión sistémica se recomienda extraer hemocultivos.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras recogidas para estudios microbiológicos deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio de Microbiología, preferiblemente en las dos horas posteriores a la toma.

Las torundas o hisopos se enviarán en medio de transporte específico. A las biopsias incluidas en contenedores estériles se les añadirán unas gotas de suero salino estéril para prevenir la desecación. Si se demora el transporte, se debe evitar envolver las biopsias en gasas secas. Los aspirados percutáneos se enviarán en la propia jeringa a la que se le habrá quitado la aguja y se habrá tapado con el obturador.

Las muestras se podrán transportar a temperatura ambiente y en caso de no poder ser procesadas inmediatamente y el transporte se demora 24 horas, se deben mantener refrigerarlas (2-8°C) hasta su procesamiento, aunque ello suponga perder viabilidad de los microorganismos anaerobios. Las jeringas con la aguja insertada no deben aceptarse por el riesgo biológico que suponen.

4.4 INCIDENCIAS Y CRITERIOS DE RECHAZO

Cualquier incidencia deberá ser registrada, siendo las más frecuentes:

- Identificación incorrecta: no se aceptará una muestra sin identificar, mal identificada o en la que no

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

coincidan el número de petición con el de la muestra.

- Muestras derramadas: no se aceptarán muestras claramente derramadas y se procederá como en el caso anterior solicitando una nueva muestra.
- Transporte/conservación inadecuados: si no se cumplen los requisitos para el transporte de muestras en el contenedor adecuado y en las condiciones necesarias, se solicitará una nueva muestra.
- Tipo de muestra no adecuada para el estudio solicitado: si la muestra remitida no es adecuada para el estudio solicitado, no se aceptará y se informará al servicio solicitante de la inadecuación de la misma, aclarando el tipo de muestra que se requiere.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

El laboratorio procesará la muestra en función de los protocolos de trabajo y de la información que aporta el servicio solicitante sobre la muestra y el paciente.

La frecuencia de aislamiento de microbiota polimicrobiana en este tipo de muestras y la posibilidad de aislar microorganismos de difícil crecimiento hace necesaria una buena elección de los medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate, agar MacConckey/agar CNA (optativos), agar Sabouraud, agar para anaerobios (Brucella/Schaedler / agar kanamicina-vancomicina / agar FAA). Caldos de enriquecimiento: caldo BHI, caldo TSB o caldo tioglicolato.

Colorantes para la tinción de Gram.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica
- Hojas de bisturí estériles, placas de Petri estériles
- Pinzas estériles
- Asas de siembra estériles
- Sistema para homogeneización de muestras (morteros, sistema de bolas, Stomacher)
- Jarras de incubación (5-7% CO₂, anaerobiosis)
- Estufa de 30-35°C

7. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Recomendable biopsia de tejido profundo. Si no fuera posible procesar hisopos de varias zonas.

7.1. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El pretratamiento de las muestras se recoge en el apartado 7.2. del documento técnico PNT-RTPM-01 del Procedimiento en Microbiología nº 1b de la SEIMC (2017) sobre recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología (<https://seimc.org/contenidos/documentoscien-tificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>), así como en el documento científico del presente procedimiento, apartados 3.4.1 al 3.4.4. No obstante, deben señalarse los siguientes aspectos:

- Las muestras de tejido de gran tamaño no precisan trituración, se debe fraccionar la muestra con bisturí y realizar una impronta con el borde de la muestra recién cortado en los medios de cultivo, empezando

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

por la placa de anaerobios y finalizando con la extensión sobre porta para la tinción de Gram (esto es recomendable si existe sospecha de presencia de hongos filamentosos, muy infrecuente en las infecciones de úlceras crónicas). En la actualidad, por regla general, es aconsejable homogeneizar las muestras con sistemas manuales, semiautomáticos o automatizados descritos en el apartado 3.4.1 del documento científico del presente procedimiento.

- Las muestras muy pequeñas pueden inocularse directamente en el caldo de enriquecimiento.
- En el caso de fragmentos óseos o tejido duro pueden inocularse directamente en caldo de enriquecimiento o si hay fragmentos de tejidos blandos se procede a separarlos del tejido duro sometiéndolos a sonicación previa en buffer PBS.
- Siempre que las condiciones de trabajo lo permitan se debe conservar una alícuota de la muestra original por si son necesarios estudios complementarios.

7.2. INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Ver los apartados 7.2.2. y 7.2.3., del documento técnico PNT-RTPM-01 del Procedimiento en Microbiología nº 1b de la SEIMC (2017) sobre recogida, transporte y procesamiento general de las muestras, antes indicado, y el apartado 3.4.2 del documento científico del presente procedimiento.

7.2.1. Cultivo a partir de torundas: respecto a las muestras recibidas en torundas, que es la opción menos deseable, si solo se recibe una en medio de transporte semisólido, se introduce en 1-2 ml de caldo, se realiza una agitación y se exprime todo el contenido de la torunda. Si el medio de transporte es líquido se procederá a agitar en vórtex antes de la siembra. De ahí con una pipeta estéril se inocularán las placas de cultivo y las extensiones. Alternativamente puede usarse la torunda para inocular directamente las placas, rotándola varias veces en uno de los cuadrantes de la placa. Si se envían dos torundas, utilizar una para realizar las extensiones para la tinción de Gram y la otra para los cultivos. Se debe realizar siempre primero el cultivo anaeróbico, e inocular los medios del menos selectivo al más selectivo.

Los cultivos cualitativo y semicuantitativo se describen en el apartado 3.4 del documento científico del presente procedimiento.

7.2.2. Muestras obtenidas mediante jeringa y aguja: se inoculan 2 ó 3 gotas en uno de los cuadrantes de cada placa de medio de cultivo, realizando estrías mediante un asa estéril por todos los cuadrantes de la placa. Además, se inoculan unas gotas de la muestra en un caldo de cultivo. Por último, se prepara la extensión sobre porta para tinción de Gram.

7.2.3. Muestras de biopsias y tejidos: se homogeneizarán previamente en 1-2 ml de caldo de enriquecimiento durante 30 segundos y se inoculará 0,1 ml del homogeneizado en los medios de cultivo y posteriormente se realizará la extensión sobre porta para tinción de Gram. La forma óptima de elección para procesar la muestra de biopsia es el cultivo cuantitativo, aunque para muestras de biopsias profundas tomadas con técnica impoluta (como en casos de úlceras diabéticas) se aceptan cultivos cualitativos.

7.3 CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar MacConkey, (atmósfera aerobia, 35°C): 48 horas.
- Agar Sabouraud (aerobia, 30°C): 72 horas, aunque puede prolongarse la incubación hasta 7 días si no hay crecimiento en los tres primeros días.
- Agar chocolate, agar sangre, agar CNA (atmósfera húmeda con 5-7% CO₂, 35°C): 48 horas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

- Agar Brucella/ agar Schaedler/agar Columbia/agar KV (anaerobiosis, 35°C): 5 días.
- Caldo de enriquecimiento (atmósfera ambiente, 35°C): 10 días
- Leer las placas y el caldo diariamente

7.4 LECTURA DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

7.4.1. Valoración microbiológica de los cultivos cualitativos: se inicia con la evaluación de la tinción de Gram y, tras la incubación, se procede a la valoración de los aislamientos en los medios de cultivo.

La tinción de Gram orienta sobre la calidad de la muestra en función de la presencia de polimorfonucleares (buena calidad) y de células epiteliales (mala calidad).

Cuando la muestra es de buena calidad, se identifican y se realiza antibiograma de hasta 3 microorganismos que se consideren patógenos potenciales. En determinados casos, como cuando se aísla *Staphylococcus aureus*, aunque sea de muestras contaminadas de mala calidad, puede determinarse la sensibilidad a oxacilina, si se considera necesario, en unidades especiales para el control epidemiológico. Recordar que se consideran potencialmente patógenos los siguientes microorganismos: *S. aureus*, estreptococos beta-hemolíticos, bacilos gramnegativos y *Bacillus anthracis*.

En el caso de muestras invasivas (biopsias y tejidos), cuando se procesan de manera cualitativa, y siempre que la toma se haya realizado de manera correcta sin contaminación superficial, se informan todos los morfotipos observados en la tinción de Gram y se valoran (identificación y antibiograma) todos los microorganismos aislados.

7.4.2. Valoración microbiológica de los cultivos semicuantitativos: se inicia igualmente con la evaluación de la tinción de Gram y, tras la incubación, se procede a la valoración de los aislamientos en los medios de cultivo. El recuento semicuantitativo de una herida crónica si se ha sembrado según el método de los 4 cuadrantes (aplicado originalmente en quemaduras) se realiza como sigue: si se observa crecimiento en el primer cuadrante, se correlaciona con un recuento de $\geq 10^3$ ufc/g; si se observa en el segundo cuadrante, se correlaciona con un recuento de $\geq 10^4$ ufc/g; si se observa crecimiento en el tercer cuadrante, se correlaciona con un recuento de $\geq 10^5$ ufc/g, y, si se observa en el cuarto cuadrante, se correlaciona con un recuento de $\geq 10^6$ ufc/g. Se valoran (identificación y antibiograma) únicamente los microorganismos que se recuperen en recuento significativo, es decir, crecimiento en el tercer y cuarto cuadrante y siempre que sean un máximo de 3 microorganismos (ver apartado 3.5. y tabla 4 del documento científico del presente procedimiento). En ambos casos, los anaerobios se identifican sólo a nivel de morfotipos bacterianos, como se ha mencionado anteriormente.

7.4.3. Valoración microbiológica de los cultivos cuantitativos: la valoración microbiológica de los cultivos cuantitativos de muestras invasivas (biopsias y tejidos) se inicia, igualmente, con la evaluación de la tinción de Gram y, tras la incubación, se procede a la valoración de los aislamientos en los medios de cultivo. La presencia de microorganismos en el Gram directo se correlaciona con $\geq 10^5$ ufc/g de tejido.

El recuento cuantitativo se obtiene a partir de la placa de recuento en la que se observe un crecimiento de entre 30 y 300 colonias de, al menos, un único morfotipo. Para realizar el recuento bacteriano, hay que observar en qué dilución de las sembradas se corresponde con un crecimiento de colonias entre 30 y 300. Se debe multiplicar el número de colonias en la placa x 5, factor de dilución del homogeneizado original, y por la dilución de la placa (1/10, 1/100, 1/1000) y dividirlo por el peso de la biopsia.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los cultivos cualitativos evalúan la microbiota presente en las heridas con infección clínica o que no cicatrizan adecuadamente. Proveen información sobre la diversidad de especies bacterianas existentes y sobre la posibilidad de sinergia entre ellas. Se ha visto que la presencia de microbiota polimicrobiana en una herida tiene más importancia en sí que la presencia de un determinado patógeno, ya que esta microbiota mixta aerobia-anaerobia determina el desarrollo de sinergia entre los distintos microorganismos, lo que facilita el desarrollo de biopelículas y la posterior infección. Los cultivos semicuantitativos y cuantitativos ofrecen información acerca de la densidad o carga bacteriana de la herida. Si se asume que la microbiología de una herida, en términos cualitativos, permanece constante, se ha visto que la probabilidad de infección aumenta a medida que la carga bacteriana aumenta, hasta un dintel crítico en el que muchos autores consideran que la infección o la ausencia de cicatrización serán inevitables. Estos aislados pueden encontrarse desde el principio representando simple colonización o “contaminación”.

El aislamiento de enterobacterias y de otros bacilos gramnegativos no fermentadores se considera significativo cuando se aísla un número de especies ≤ 3 , y siempre que la muestra sea de buena calidad. Cuando se aíslan en número >3 y la muestra no está bien recogida, se identifican morfológicamente y se informan como microbiota mixta gramnegativa.

El aislamiento de levaduras inicialmente se considera como microbiota comensal.

Como ya se ha mencionado, la identificación de los anaerobios se hará sólo a nivel de morfotipos bacterianos, según el resultado de la tinción de Gram. El aislamiento de anaerobios se informa como microbiota mixta aerobia-anaerobia, con la excepción de *Clostridium perfringens*. La identificación a nivel de género y especie y la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se reserva para los aerobios.

9. RESPONSABILIDADES

- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante o del laboratorio de Microbiología según donde se realice la toma de la muestra.
- La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras es responsabilidad del laboratorio de Microbiología de cada centro o sector sanitario correspondiente.
- En el área de preanalítica del laboratorio se realizará la recogida y el procesamiento de muestras, que incluye la recepción, identificación, etiquetado y distribución de las muestras, rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas, incidencias y adopción de medidas correctoras. La muestra pasa a la sección correspondiente para su procesamiento, confirmando su recepción e información por parte del facultativo responsable.
- Personal técnico: valoración de la tinción de Gram, realización de las técnicas microbiológicas de identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica. Registro de resultados.
- Facultativo responsable: valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, supervisión del trabajo del personal técnico, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma del informe de resultados, interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La valoración de los resultados depende en gran medida de indicaciones muy precisas acerca del tipo de muestra (biopsia tejido, aspirado o hisopo) y de la localización anatómica y extensión de la lesión.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de úlceras vasculares y úlceras por presión	PNT-DMHC-01	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

Debido al problema de la contaminación-colonización frecuente de las úlceras crónicas, y las dificultades para practicar biopsias de tejido, se recomienda que la muestra sea un aspirado con jeringa o dos hisopos tomados mediante técnica de Levine (GR-2). Además, sería aconsejable, especialmente en pacientes ingresados en estas unidades especiales como lesionados medulares y centros sociosanitarios, utilizar técnicas rápidas para la detección de determinantes de resistencia en aislados de *S. aureus* y *Pseudomonas* spp., y despistaje de infecciones por hongos levaduriformes, para el ajuste precoz del tratamiento empírico.

11. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

No se deben tomar muestras si no existe evidencia clínica de infección, a no ser que sea como parte de un protocolo de vigilancia epidemiológica de colonización por microorganismos multirresistentes.

El tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico previo a la obtención de la muestra pueden alterar los resultados de los cultivos.

Es imprescindible evidenciar la presencia de signos clínicos de infección en la úlcera ya que, en ausencia de infección clínica, la presencia de microorganismos en muestras superficiales indica en la mayoría de los casos colonización con microbiota de la piel. Se debe seleccionar el lado de la lesión con mayor presencia de tejido de granulación y ausencia de esfacelos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Burillo A (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. 22. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2006.
- Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infections: facts and controversies. J Clin Dermatol 2010; 28: 519-526.
- Rondas AA, Halfens R, Schols J, Thiesen K, Trienekens T, Stobberingh E. Is a wound swab for microbiological analysis supportive in the clinical assessment of infection of a chronic wound? Future Microbiol. 2015; 10:1815-1824. doi: 0.2217/fmb.15.97
- Copeland-Halperin LR, Kaminsky AJ, Bluefeld N, Miraliakbari R. Sample procurement for cultures of infected wounds: a systematic review. J Wound Care 2016;25(4): S4-S10. doi: 10.12968 /jowc.2016.25S4
- Robinson GL, Harris AD, Morgan DJ, Pineles L, Belton BM, Johnson JK, BUGG Study Group. Survival of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. for an extended period of transport. J Clin Microbiol 2012; 50:2466-2468.
- Tedeschi S, Negosanti L, Sgarzani R, Trapani F, Pignarelli S, Battilana M, et al. Superficial swab versus deep-tissue biopsy for the microbiological diagnosis of local infection in advanced-stage pressure ulcers of spinal-cord-injured patients: a prospective study. Clin Microbiol Infect. 2017; 23:943-947.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-DMHC-02

Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	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.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es describir el diagnóstico microbiológico en las infecciones de quemaduras. Se detalla el tipo de muestra, su procesamiento en el laboratorio y los criterios de interpretación.

2. FUNDAMENTO

La infección es la complicación más frecuente en los quemados constituyendo una de las principales causas de morbimortalidad. La susceptibilidad a la infección es multifactorial y se ve favorecida principalmente por la destrucción de la barrera mecánica, una inmunidad celular inmediata deprimida y por la translocación bacteriana por daño en las mucosas.

El cultivo microbiológico ha de ser valorado junto con el resultado histológico y se debe realizar sólo si existe sospecha clínica de infección, ya que, en ausencia de ésta, la presencia de microorganismos indica en la mayoría de los casos colonización de la quemadura con microbiota de la piel.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
2. 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. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

Toda solicitud analítica debería contener los siguientes puntos: filiación, datos administrativos/demográficos del paciente (nombre y apellidos, número de historia clínica y de identificación personal, fecha de nacimiento y sexo), nombre y apellidos del médico peticionario, servicio solicitante, datos clínicos relevantes, datos referentes a la muestra (tipo y localización anatómica), terapéutica seguida, tipos de pruebas a solicitar, así como el número de petición identificativo de la muestra o el localizador de la misma (solicitud electrónica).

4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

Ver apartado 3.1 del documento científico del este procedimiento.

La recogida de una muestra adecuada es determinante para que el diagnóstico microbiológico sea útil. La toma de los tejidos debe incluir los agentes implicados en la infección y evitar el material superficial que puede reflejar tan solo la colonización por la microbiota. Las opciones disponibles son la recogida con torunda o hisopo, la aspiración percutánea y la biopsia.

4.2.1 Hisopo: antes de la toma de muestra, eliminar el tejido desvitalizado y lavar la superficie de la herida con suero fisiológico. En quemaduras, la toma de muestra ante la sospecha de infección, mediante hisopo es un recurso de última elección, por lo que se desaconseja, por su bajo rendimiento y alta probabilidad de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

contaminación.

4.2.2. Aspiración percutánea con aguja fina: se puede utilizar en casos de celulitis, tejido muy necrosado en la base e incluso si el tejido subyacente incluido hueso está friable, licuado. Se recomienda aspirar de zonas profundas. En procesos no supurados instilar 0,5 ml de suero fisiológico estéril, inyectándolo y aspirándolo nuevamente con la jeringa. Quitar la aguja y tapar la jeringa con el obturador. Requiere desinfección de la piel y limpieza con suero fisiológico antes de realizarse.

4.2.3. Biopsia:

- Biopsia con sacabocados (Punch): se realiza utilizando un bisturí de forma circular. El instrumento se rota sobre la piel, penetrando todas las capas (epidermis, dermis y parte de la hipodermis) y se obtiene una muestra tisular cilíndrica.

- **Biopsia incisional:** limpiar previamente la superficie de la quemadura y realizar dos incisiones paralelas en la piel de aproximadamente 1 o 2 cm de longitud, separadas 1,5 cm. Posteriormente, con bisturí y pinzas estériles, se obtendrá una muestra lo suficientemente profunda como para llegar hasta el tejido viable.

4.2.4. Otras muestras. En enfermos con infección grave o repercusión sistémica se recomienda extraer hemocultivos.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras recogidas para estudios microbiológicos deben enviarse lo más rápido posible al laboratorio de Microbiología, preferiblemente en las dos horas posteriores a la toma.

Las torundas o hisopos se enviarán en medio de transporte específico (medio de transporte Stuart o Amies, que tienen demostrada capacidad para recuperar la viabilidad de microorganismos como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) o enterococos resistentes a la vancomicina hasta 14 días después de su recogida. Las biopsias se depositarán en contenedores estériles con unas gotas de suero salino estéril para prevenir la desecación. Si se demora el transporte, se debe evitar envolver las biopsias en gasas secas. Los aspirados percutáneos se enviarán en la propia jeringa a la que se le habrá quitado la aguja y se habrá tapado con el obturador.

Las muestras se podrán transportar a temperatura ambiente y en caso de que su procesamiento no sea inmediato, se recomienda guardarlas refrigeradas (2-8°C) hasta su procesamiento, que no debe superar las 24 horas desde la toma de la muestra. Las jeringas con la aguja insertada no deben aceptarse por el riesgo biológico que suponen.

4.4. INCIDENCIAS Y CRITERIOS DE RECHAZO

Cualquier incidencia deberá ser registrada, siendo las más frecuentes:

- Identificación incorrecta: no se aceptará una muestra sin identificar, mal identificada o en la que no coincidan el número de petición con el de la muestra.
- Muestras derramadas: no se aceptarán muestras claramente derramadas y se procederá como en el caso anterior solicitando una nueva muestra. En el caso de no ser posible la recogida de una nueva muestra, se debe desinfectar externamente el envase o trasvasar la muestra a un contenedor estéril. En este caso, se indicará en el informe de resultados que la muestra estaba derramada y que los resultados deben ser interpretados con la debida precaución.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

- Transporte/conservación inadecuados: si no se cumplen los requisitos para el transporte de muestras en el contenedor adecuado y en las condiciones necesarias, se solicitará una nueva muestra. En el caso de muestras que no se puedan volver a recoger, se puede optar por procesarlas informando de la incidencia en la recogida/transporte de la muestra y alertando de que los resultados obtenidos deben ser interpretados con la precaución correspondiente.

- Tipo de muestra no adecuada para el estudio solicitado: si la muestra remitida no es adecuada para el estudio solicitado, no se aceptará y se informará al servicio solicitante de la inadecuación de la misma, aclarando el tipo de muestra que se requiere.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Medios de cultivo:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar MacConkey
- Agar CNA (optativo)
- Agar Sabouraud
- Agar Schaedler o Brucella
- Agar kanamicina-vancomicina
- Caldo de enriquecimiento, para muestras invasivas

Reactivos y productos:

- Sistemas de transporte para anaerobios
- Colorantes para tinción de Gram
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera (con 5-7% de CO₂ y de anaerobiosis)

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica
- Hojas de bisturí estériles, placas de Petri estériles
- Pinzas estériles
- Asas de siembra estériles
- Sistema para homogeneización de muestras
- Jarras de incubación (5-7% CO₂, anaerobiosis)
- Estufa a 30°C y a 35°C

7. PROCEDIMIENTO

Recomendable biopsia de tejido profundo. Si no fuera posible procesar hisopos de varias zonas.

7.1. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Las biopsias se homogenizan mediante hoja de bisturí, traspasando la muestra a una placa de Petri estéril y desmenuzando el tejido hasta obtener una consistencia homogénea. También puede realizarse en mortero estéril, con 1-2 ml de caldo de cultivo, utilizando un dispositivo triturador tipo Stomacher o mediante sistema de triturado con bolas estériles. Las muestras muy pequeñas pueden inocularse directamente en el caldo de enriquecimiento.

Si el tejido es grande, se corta con el bisturí por la mitad, cortando de nuevo por la mitad una de las piezas y tocando con esta superficie cortada la placa de anaerobiosis, incubándola inmediatamente; después se

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

Las muestras de tejidos duros o adheridos a tejidos duros plantean más dificultades. Siempre que la muestra lo permita se procede a la homogenización o la extracción de pequeños fragmentos de muestra, procesándose como se ha descrito. En el caso de fragmentos óseos pueden inocularse directamente en caldo de enriquecimiento, aunque si es posible se homogeneizan como se ha descrito anteriormente. También es recomendable sonicarlos en buffer PBS para desprender parte del biofilm. Si hay fragmentos de tejidos blandos se procede a separarlos del tejido duro y procesarlos, de forma paralela, como otra muestra.

Las biopsias se procesan de manera cuantitativa, como se describe en el apartado 3.4.3 del documento científico de este procedimiento.

De las muestras obtenidas mediante jeringa y aguja se inoculan 2 ó 3 gotas en uno de los cuadrantes de cada agar, realizando estrías mediante un asa estéril por todos los cuadrantes de la placa. Además, se inoculan unas gotas de la muestra en un caldo de cultivo. Por último, se prepara la extensión sobre porta para tinción de Gram.

Respecto a las muestras recibidas en torundas, que es la opción menos deseable, si solo se recibe una en medio de transporte semisólido, se introduce en 1-2 ml de caldo, se realiza una agitación y se exprime todo el contenido de la torunda. Si el medio de transporte es líquido se procederá a agitar en vórtex antes de la siembra. De ahí con una pipeta estéril se inocularán las placas de cultivo y las extensiones. Alternativamente puede usarse la torunda para inocular directamente las placas, rotándola varias veces en uno de los cuadrantes de la placa (técnica de los 4 cuadrantes) como se describe en el apartado 3.4.3 del documento científico de este procedimiento. Idealmente en quemaduras, debe realizarse cultivo cuantitativo en placa de agar chocolate, sembrando la muestra exprimida de la torunda o del homogeneizado del tejido con asa calibrada de 1 o 10 μ L, inoculando una estría vertical y extendiendo en todos los cuadrantes (tal como se realiza en la siembra del urocultivo), y aplicando la dilución correspondiente para cuantificar el número de colonias en la placa. Si se envían dos torundas, utilizar una para realizar las extensiones para la tinción de Gram y la otra para los cultivos.

Se debe realizar siempre primero el cultivo anaeróbico, e inocular los medios del menos selectivo al más selectivo.

7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar MacConkey, (atmósfera aerobia, 35°C): 48 horas.
 - Agar Sabouraud (aerobia, 30°C): 72 horas, aunque puede prolongarse la incubación hasta 7 días si no hay crecimiento en los tres primeros días.
 - Agar chocolate, agar sangre, agar CNA (atmósfera húmeda con 5-7% CO₂, 35°C): 48 horas.
 - Agar Brucella/ agar Schaedler/agar Columbia/agar KV (anaerobiosis, 35°C): 5 días.
 - Caldo de enriquecimiento (atmósfera ambiente, 35°C): 10 días.
- Leer las placas y el caldo diariamente

7.3. LECTURA DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Esta información se detalla en el texto del documento científico del presente procedimiento en el apartado 3.5 y se resume en las tablas 4 y 5 del mismo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La valoración microbiológica de los cultivos cuantitativos de biopsias y tejidos se describe en los apartados 3.4.2. y 3.4.3. del documento científico del presente procedimiento.

Los cultivos obtenidos con torunda se pueden interpretar de manera cualitativa o de manera semicuantitativa. Para la interpretación cualitativa, se valora la celularidad y la presencia de leucocitos polimorfonucleares a través de la tinción de Gram, tal y como se describe en las tablas 4 y 5 del documento científico, y se valoran (identificación y antibiograma) 1 o 2 patógenos. La interpretación de los cultivos semicuantitativos se describe en los apartados 3.4.2. y 3.4.3. del documento científico.

Cuando se aíslan 3 o más microorganismos potencialmente patógenos, se incluirá la siguiente observación en el informe: “Se han aislado varios microorganismos de valor dudoso. Estos aislados pueden representar colonización o contaminación. Se ruega envíen nueva muestra previa limpieza de la herida”.

Se valora siempre e independientemente de otras consideraciones, el crecimiento de microorganismos considerados esencialmente patógenos como *Staphylococcus aureus*, estreptococos beta-hemolíticos y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque esta última puede representar únicamente colonización superficial de la herida.

En muestras de hisopos no se realizará identificación ni estudio de sensibilidad de los microorganismos que forman parte de la microbiota cutánea (diferoides, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus* grupo *viridans* o *Enterococcus* spp.), además, en raras ocasiones estarán en cultivo puro. En estos casos, se informa como microbiota grampositiva habitual de piel. La presencia en cultivo puro puede reflejar la patogenicidad de un microorganismo, especialmente en muestras invasivas, y cuando la tinción de Gram es sugestiva de su presencia, o si cultivos repetidos son positivos para ese microorganismo. En ese caso, se realizará identificación y estudio de sensibilidad antibiótica.

Los cultivos negativos se informan como “No se aíslan microorganismos tras X (5-10) días de incubación”.

9. RESPONSABILIDADES

- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante o del laboratorio de Microbiología según donde se realice la toma de la muestra.
- La información sobre las normas de recogida, transporte y conservación de las muestras es responsabilidad del laboratorio de Microbiología de cada centro o sector sanitario correspondiente.
- En el área de preanalítica del laboratorio se realizará la recogida y el procesamiento de muestras, que incluye la recepción, identificación, etiquetado y distribución de las muestras, así como el rechazo de las muestras remitidas en condiciones defectuosas, la anotación de las incidencias y adopción de medidas correctoras. La muestra se transfiere a la sección correspondiente para su procesado, confirmando su recepción e información por parte del facultativo responsable.
- Personal técnico: realización de las técnicas microbiológicas de identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica. Registro de resultados.
- Facultativo responsable: valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar. Supervisión del trabajo del personal técnico, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma del informe de resultados, interconsultas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones de quemaduras	PNT-DMHC-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La valoración de los resultados depende en gran medida de indicaciones muy precisas acerca del tipo de muestra (biopsia, aspirado percutáneo o hisopo), de la localización anatómica y de la extensión de la lesión. Debido al problema de la contaminación-colonización frecuente de las heridas de quemaduras, es recomendable que la muestra sea biopsia (GR-1). Además, sería aconsejable, especialmente en pacientes ingresados en unidades especiales de quemados, utilizar técnicas rápidas para la detección de determinantes de resistencia en aislados de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp., y despistaje de infecciones por hongos levaduriformes, para el ajuste precoz del tratamiento empírico.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se deben tomar muestras si no existe evidencia clínica de infección, a no ser que sea como parte de un protocolo de vigilancia epidemiológica de colonización por microorganismos multirresistentes. El tratamiento antimicrobiano tópico y el uso de sulfadiazina argéntica previo a la obtención de la muestra pueden alterar los resultados de los cultivos.

Es imprescindible evidenciar la presencia de signos clínicos de infección de la quemadura ya que, en ausencia de infección clínica, la presencia de microorganismos en muestras superficiales indica en la mayoría de los casos colonización de la quemadura con microbiota de la piel. Se debe seleccionar el lado de la lesión con mayor presencia de tejido de granulación o ausencia de esfacelos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. *J Burn Care Res.* 2017; 38:e469-e481. doi: 10.1097/BCR.0000000000000355.
2. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *J Wound Care.* 2017; 26:5-19. doi: 10.12968/jowc.2017.26.1.5.
3. Ramírez CE, Ramírez-Blanco CE, González LF, Ramírez N, Vélez K. Fisiopatología del paciente quemado. *Rev Univ Ind Santander.* 2010; 42:55-65.
4. Azzopardi EA, Azzopardi E, Camilleri L, et al. Gram- negative wound infection in hospitalised adult burn patients--systematic review and metanalysis. *PLoS One.* 2014; 9(4):e95042. doi: 10.1371/journal.pone.0095042.
5. Burillo A, Moreno A, Salas C. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos. Burillo A (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 22. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2006.
6. Kwei J, Halstead FD, Dretzke J, Oppenheim BA, Moimen NS. Protocol for a systematic review of quantitative burn wound microbiology in the management of burns patients. *Syst Rev.* 2015; 4:150. doi:10.1186/s13643-015-0137-9.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-DMHC-03

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	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.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir los métodos de diagnóstico microbiológico en las infecciones del pie diabético. Se describen los tipos de muestras, su procesamiento en el laboratorio y los criterios de interpretación de los cultivos.

2. FUNDAMENTO

Las infecciones del pie que afectan a la piel y tejidos blandos, y al hueso, con o sin repercusión sistémica, son la causa más frecuente de hospitalización de los diabéticos, y provocan estancias prolongadas.

El diagnóstico de la infección es clínico, no microbiológico. Sin embargo, es necesario conocer la etiología de la infección para administrar un tratamiento antimicrobiano dirigido que cubra todos los patógenos implicados, ya que la microbiología de la infección del pie diabético varía según la localización geográfica, la gravedad de la enfermedad y las características del paciente (antibióticos previos, hospitalización reciente). En enfermos con tratamiento antibiótico reciente, hospitalización previa o que residen en unidades de cuidados crónicos, es más frecuente la implicación de microorganismos multirresistentes.

Las úlceras crónicas siempre están colonizadas, lo que hace que el diagnóstico microbiológico sólo esté indicado cuando hay criterios clínicos de infección. Los cultivos cuantitativos no han demostrado ser útiles como método para el diagnóstico de la infección del pie diabético.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
2. Manual de instrucciones de las técnicas aplicadas
3. Normas de bioseguridad

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición que acompaña a cada muestra debe ser estrictamente cumplimentado y en el deberá constar la filiación, edad, número de historia, servicio de procedencia, tipo de muestra (de forma muy específica), localización anatómica de la muestra, tratamiento previo y diagnóstico del enfermo, así como el código del clínico que realiza la petición

4.2. RECOGIDA DE LA MUESTRA

La recogida de una muestra adecuada es determinante para que el diagnóstico microbiológico sea útil. La toma de los tejidos debe incluir los agentes implicados en la infección y evitar el material superficial que puede reflejar tan solo la colonización por microbiota. Las opciones disponibles son la biopsia, el raspado, la aspiración percutánea y la recogida con torunda profunda.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

4.2.1. Biopsia: se realiza del fondo de la úlcera, eliminando en lo posible las bacterias colonizadoras superficiales. Tras realizar un desbridamiento quirúrgico, se procede a una limpieza con una gasa empapada con suero fisiológico, o a la desinfección con un desinfectante que se elimina con suero fisiológico.

En la osteomielitis la biopsia ósea es la muestra de referencia. Se puede tomar por cirugía abierta o por aspiración percutánea guiada por imagen, pero debe realizarse fuera de heridas o úlceras para evitar la contaminación con la microbiota que las coloniza. El paciente debe haber estado, idealmente, sin recibir antibióticos de 2 a 4 semanas antes de la realización de la toma.

4.2.2. Raspado: se realiza preparando la úlcera como se ha descrito para la biopsia. Tras dejar secar se toma con una legra o cureta estéril una muestra de tejido (1-1,5 mm³) del fondo.

4.2.3. Aspiración percutánea con aguja fina: se puede utilizar en casos de celulitis, colecciones purulentas y osteomielitis cuando haya hueso licuado. Requiere desinfección de la piel y limpieza con suero fisiológico antes de realizarse.

4.2.4. Recogida profunda con torunda: es el método menos adecuado. Si no existe otra posibilidad, debe realizarse con una preparación previa como en la descrita para la biopsia. La muestra se toma del fondo de la úlcera rotando con una cierta presión el hisopo para conseguir exprimir los tejidos durante 5 segundos.

4.2.5. Otras muestras. En enfermos con infección grave o repercusión sistémica se recomienda extraer hemocultivos.

4.3. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Los resultados del cultivo dependen de la demora en el transporte y de las condiciones de conservación de la muestra.

Las biopsias pequeñas se inoculan en un vial de transporte para anaerobios. Si son más grandes, se introducen en contenedores estériles sobre una gasa estéril humedecida en suero salino estéril para evitar su desecación.

En el caso de muestras óseas, se recomienda recoger varios fragmentos y enviarlos por separado en contenedores estériles diferentes.

Las muestras recogidas mediante el uso de una jeringa y una aguja deben colocarse en un recipiente estéril o un tubo de recolección de sangre sin anticoagulante. Una parte de las muestras debería inocularse en un vial de transporte para anaerobios. Las jeringas con la aguja insertada no deben aceptarse por el riesgo biológico que suponen.

Las muestras recogidas mediante torunda se enviarán en viales que contengan medio de transporte Stuart o Amies.

Las muestras se enviarán inmediatamente al laboratorio, preferiblemente en las dos horas posteriores a la toma. Si el transporte se demora, se mantendrán a temperatura ambiente.

4.4. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se deben observar cuidadosamente las siguientes incidencias relacionadas con la muestra:

- Defectos encontrados en la identificación de la misma: etiquetado erróneo e inadecuada o incompleta cumplimentación de la hoja de petición.
- Mala conservación (temperatura inapropiada, muestras en contenedor no apropiado, torundas sin medio de transporte).
- Muestras con aspecto de mala conservación (biopsias secas).
- Muestra insuficiente para todas las determinaciones solicitadas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

Todas estas incidencias se deben comunicar al clínico correspondiente, indicando el procesamiento o no de la muestra e incidiendo en la interpretación de los resultados si se llevara a cabo el mismo.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Medios de cultivo:

- Agar chocolate
- Agar MacConkey
- Agar CNA
- Agar Sabouraud
- Agar en anaerobios
- Caldo de enriquecimiento, para muestras invasivas

Reactivos y productos:

- Sistemas de transporte para anaerobios
- Colorantes para tinción de Gram
- Sistemas comerciales generadores de atmósfera (con 5-7% de CO₂ y de anaerobiosis)

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica
- Hojas de bisturí estériles, placas de Petri estériles
- Pinzas estériles
- Asas de siembra estériles
- Sistema para homogeneización de muestras
- Jarras de incubación (5-7% CO₂, anaerobiosis)
- Estufa a 30°C y a 35°C

7. PROCEDIMIENTO

No se recomienda el cultivo cuantitativo de las muestras del pie diabético.

7.1. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Las biopsias se homogenizan mediante hoja de bisturí, traspasando la muestra a una placa de Petri estéril y desmenuzando el tejido hasta obtener una consistencia homogénea. También puede realizarse en mortero estéril, con 1-2 ml de caldo de cultivo, o utilizando un triturador tipo Stomacher. Las muestras muy pequeñas pueden inocularse directamente en el caldo de enriquecimiento.

Si el tejido es grande, se corta con el bisturí por la mitad, cortando de nuevo por la mitad una de las piezas y tocando con esta superficie cortada la placa de anaerobiosis, incubándola inmediatamente; después se procederá a realizar una impronta en el resto de los medios y la extensión sobre porta para tinción de Gram.

Las muestras de tejidos duros o adheridos a tejidos duros plantean más dificultades. Siempre que la muestra lo permita se procede a la homogeneización o la extracción de pequeños fragmentos de muestra, procesándose seguidamente como se ha descrito. En el caso de fragmentos óseos pueden inocularse directamente en caldo de enriquecimiento, aunque si es posible se homogeneizan como se ha descrito anteriormente. También es recomendable someterlos a sonicación para desprender parte de la biopelícula.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

Si hay fragmentos de tejidos blandos se procede a separarlos del tejido duro y procesarlos, de forma paralela, como otra muestra.

De las muestras obtenidas mediante jeringa y aguja se inoculan 2 ó 3 gotas en uno de los cuadrantes de cada placa de agar, realizando estrías mediante un asa estéril por todos los cuadrantes de la placa. Además, se inoculan unas gotas de la muestra en un caldo de cultivo. Por último, se prepara la extensión sobre porta para tinción de Gram.

Respecto a las muestras recibidas en torundas, que es la opción menos deseable, si solo se recibe una en medio de transporte semisólido, se introduce en 1-2 ml de caldo, se realiza una agitación y se exprime todo el contenido de la torunda. De ahí con una pipeta estéril se inocularán las placas de cultivo y las extensiones. Alternativamente puede usarse la torunda para inocular directamente las placas, rotándola varias veces en uno de los cuadrantes de la placa. Si el medio de transporte es líquido se procederá a agitar en vórtex antes de la siembra. Si se envían dos torundas, utilizar una para realizar las extensiones para la tinción de Gram y la otra para los cultivos.

Se debe realizar siempre primero el cultivo anaeróbico, e inocular los medios del menos selectivo al más selectivo.

7.2. CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar MacConkey, agar Sabouraud (atmósfera ambiente, 35°C): 48 horas.
- Agar chocolate, agar sangre, agar CNA (atmósfera húmeda con 5-7% CO₂, 35°C): 72 horas, aunque puede prolongarse la incubación 48 horas más si no hay crecimiento en los tres primeros días.
- Agar Brucella/ agar kanamicina-vancomicina/ agar BBE (anaerobiosis, 35°C): 5 días.
- Caldo de enriquecimiento (atmósfera ambiente, 35°C): 5 días
- Leer las placas y el caldo diariamente

7.3. LECTURA DE LOS CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Esta información se detalla en el texto del documento científico del presente procedimiento en el apartado 3.5 y se resume en las tablas 4 y 5 del mismo.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. MUESTRAS NO INVASIVAS (torundas)

Se calcula el índice Q a partir de la tinción de Gram, tal y como se describe en los apartados 3.4 y 3.5 del documento científico de este procedimiento, y se valoran (identificación y antibiograma) hasta 3 patógenos.

Cuando se aíslan más de 3 microorganismos potencialmente patógenos (ver apartado 8.3) se recomienda identificarlos a nivel de especie, incluyendo la siguiente observación en el informe: "Se han aislado varios microorganismos potencialmente patógenos (especificar), y no es posible asignar un papel patógeno claro a ninguno de ellos. Estos aislados pueden representar colonización o contaminación".

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

8.2.MUESTRAS INVASIVAS

En el caso de biopsias y otras muestras invasivas, y siempre que la toma se haya realizado de manera correcta sin contaminación superficial, se valoran (identificación y antibiograma) todos los microorganismos aislados (ver apartado 8.3).

8.3.PARA TODO TIPO DE MUESTRAS

Los microorganismos causantes de estas infecciones proceden principalmente de la microbiota cutánea e intestinal del propio paciente.

Hay que tener en cuenta que la complejidad de la microbiota encontrada aumenta con los ingresos hospitalarios, la duración clínica de la úlcera, la profundidad/gravedad de la lesión y los antecedentes de antibioterapia, por lo que es imprescindible una buena comunicación con el clínico responsable del paciente para una correcta interpretación del cultivo.

Se valora siempre el crecimiento de microorganismos considerados esencialmente patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolíticos y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque esta última puede representar únicamente colonización superficial de la herida, excepto en el caso de osteomielitis.

Respecto a los bacilos gramnegativos entéricos, si se aíslan una o dos especies, y son predominantes, se deben identificar y realizar antibiograma.

Se realizará identificación y estudio de sensibilidad de los microorganismos que forman parte de la microbiota cutánea (difteroides, estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus* grupo *viridans* o *Enterococcus* spp.) en aquellas muestras en las que se aíslan en cultivo puro, especialmente en muestras invasivas y cuando la tinción de Gram es sugestiva de su presencia, o si cultivos repetidos son positivos para estos microorganismos.

Las levaduras pueden formar parte de la microbiota normal, salvo que sean predominantes o muy abundantes.

Los cultivos sin aislamientos se informan como “No se aíslan microorganismos tras X (5-7) días de incubación”.

9. RESPONSABILIDADES

- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante o del laboratorio de Microbiología, si se realiza en él la toma de la muestra.
- 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.

En el área de preanalítica, de recogida y procesamiento de muestras del laboratorio de Microbiología, se realizará la recepción, identificación y procesamiento de las muestras, el rechazo de las muestras remitidas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

en condiciones defectuosas (medios de transporte inadecuados, derramadas) y la adopción de medidas correctoras.

Personal técnico: realización de las técnicas microbiológicas de identificación y determinación de la sensibilidad antibiótica.

Facultativo responsable: valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar. Supervisión del trabajo del personal técnico, adopción de medidas correctoras de errores cometidos, firma del informe de resultados, interconsultas.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

La valoración de los resultados depende en gran medida de indicaciones muy precisas acerca del tipo de muestra y de la localización anatómica y extensión de la lesión (superficial o profunda).

El rendimiento de las muestras correctamente tomadas y transportadas, puede ser muy alto y pueden aplicarse métodos de cultivo cualitativos.

Debido al problema de la multirresistencia en los microorganismos más frecuentemente implicados en la infección del pie diabético, sería aconsejable, especialmente en pacientes ingresados y si la epidemiología local lo justifica, utilizar técnicas rápidas para la detección de determinantes de resistencia en aislados de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, para el ajuste precoz del tratamiento empírico.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

No se deben tomar muestras si no existe evidencia clínica de infección del pie diabético, a no ser que sea como parte de un protocolo de vigilancia de colonización por microorganismos multirresistentes.

El tratamiento antimicrobiano tópico o sistémico previo a la obtención de la muestra puede alterar los resultados de los cultivos.

No se recomienda rechazar o no procesar ninguna muestra sin consultar previamente con el clínico.

Se recomienda recoger más de una muestra de diferentes zonas de la herida, porque una única muestra puede no reflejar todos los microorganismos productores de infección.

Se debe evitar tomar muestras superficiales mediante torunda. Así tomadas, con frecuencia están contaminadas con microbiota colonizadora e incluso con microorganismos potencialmente patógenos que no participan en la infección, y no reflejan toda la microbiota que produce infección en la profundidad de la herida.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Blanes JI, Clará A, Lozano F, Alcalá D, Doiz E, Merino R, et al. Documento de consenso sobre el tratamiento de las infecciones en el pie diabético. *Angiología* 2012; 64:31-59.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del pie diabético	PNT-DMHC-03	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

2. Nelson A, Wright-Hughes, Backhouse MR, Lipsky BA, Nixon J, Bhogal MS, et al. CODIFI (Concordance in diabetic foot ulcer infection): a cross-sectional study of wound swab versus tissue sampling in infected diabetic foot ulcers in England. *BMJ Open* 2018; 8(1):e019437.
3. Carson JA. Wound cultures (cap 3.13). En: Leber A. ed. *Clinical Microbiology Procedures Handbook* 4th edition. ASM Press, Washington DC 2016, pp. 1-20. doi: 10.1128/9781555818814.ch3.13.1.